

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del

**Instituto Politécnico Nacional
Unidad Zacatenco**

Departamento de Farmacología

“El núcleo accumbens como un nodo integrador de las redes neuronales de la alimentación y del sueño: *comparación con la actividad neuronal del hipotálamo lateral y regiones corticales*”

Tesis que presenta

M. en C. Isaac Obed Pérez Martínez

para obtener el grado de Doctor en Ciencias

en la especialidad de farmacología

Director de tesis: **Dr. Ranier Gutiérrez**

Distrito Federal, México

Junio 2013

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el Laboratorio de Neurobiología del Apetito del Departamento de Farmacología, bajo la tutoría del Dr. Ranier Gutiérrez, con apoyo del CONACYT a través de la beca con No. de registro: 215642 y apoyo de CONACYT ciencia básica 179484, Salud2010-02-151001, ICYTDF-PICSA12-126, y Productos Medix 1275 (para RG)

Índice

Resumen • 6

Abstract • 7

Primer proyecto

Introducción

- I. Generalidades de la conducta de ingesta • 9
- II. Circuito homeostático • 10
 1. Núcleo arcuato • 10
 - A) Neuronas y péptidos orexigénicos • 11
 - B) Neuronas y péptidos anorexigénicos • 11
 2. Área hipotalámica lateral • 12
- III. Circuito de recompensa en la alimentación • 12
 1. Área tegmental ventral • 13
 2. Núcleo accumbens • 13
 3. Teoría de la compuerta, relación de las proyecciones NAc-HL • 15
 4. Corteza orbitofrontal • 16
- IV. Circuito motor de la alimentación, corteza motora anterolateral y la formación reticular • 17
- V. Cambios neuronales que incrementan el deseo por los alimentos • 19
- VI. Circuito del sueño • 20
- VII. El NAc modula y es modulado por el circuito del sueño en el hipotálamo lateral • 23
- VIII. Regiones corticales y su relación con el sueño • 24
- IX. Relación entre el sueño y la alimentación

Planteamiento del problema • 27

Hipótesis • 28

Objetivos • 29

Materiales y métodos

- I. Animales • 30
- II. Cirugía de implantación del electrodo • 30
- III. Consumo *ad libitum* de ensure sabor chocolate • 30
- IV. Mediciones del comportamiento asociados con la ingesta de ensure • 31
- V. Registros electrofisiológicos • 32
- VI. Hipnogramas • 32
- VII. Neuronas relacionadas a la alimentación • 33
- VIII. Neuronas moduladas por el sueño de ondas lentas • 34

Resultados

- I. Estados conductuales, alimentación y ciclo sueño-vigilia • 35
- II. Macro estructura de la alimentación • 38
- III. Microestructura del lengüeteo • 38
- IV. Electrofisiología e histología • 39
- V. Modulación de la actividad neuronal durante la alimentación
 - A) Núcleo accumbens • 40
 - B) Hipotálamo lateral • 42
 - C) Corteza motora anterolateral • 43
 - D) Corteza orbitofrontal • 44

- VI. Actividad de sobrelape durante la alimentación y el sueño de ondas lentas • 44
 - A) Actividad poblacional del núcleo accumbens • 46
 - B) Hipotálamo lateral • 47
 - C) Corteza motora anterolateral • 47
 - D) Corteza orbitofrontal • 47

Discusión • 53

Conclusión • 58

Segundo proyecto

Introducción

- I. Neuronas aferentes que modulan patrones motores de alimentación, expresan GABA e influyen directamente sobre el hipotálamo lateral • 59
- II. Neuronas que median el impacto hedónico de los alimentos altamente palatables (azúcar/grasa) • 61

Planteamiento del problema • 62

Hipótesis • 62

Objetivos • 63

Materiales y métodos • 64

- I. Sistema conductual para estudiar elementos hedónicos de la percepción gustativa • 64
- II. Descripción del bebedero • 65
- III. Sistema de liberación de sabores • 66
- IV. Lick reaction task, tarea de reacción del lengüeteo • 67
- V. Lengüeteos adicionales en el puerto central • 68

Resultados • 69

- I. Caracterización conductual (LRT) • 69
- II. Recompensa gradual a la reacción del lengüeteo después de recibir una gota • 70
- III. Las neuronas del núcleo accumbens son moduladas por el componente motor y no por el estímulo hedónico • 75

Discusión • 78

Conclusiones generales • 79

Bibliografía • 79

Índice de figuras y tablas

Fig. 1 Representación de estados conductuales •	37
Fig. 2 Distribución normalizada de intervalo entre lengüeteos •	39
Fig. 3 Histología •	40
Fig. 4 Ejemplos representativos de neuronas en núcleo accumbens •	42
Fig. 5 Ejemplo de neuronas que se modulan en la alimentación en corteza motora anterolateral •	43
Fig. 6 Neurona en núcleo accumbens que es modulada inactivándose en ambos estados conductuales •	46
Fig. 7 Representación de 2 neuronas que se modulan selectivamente durante la alimentación y no durante el sueño de ondas lentas •	49
Fig. 8 Actividad poblacional en núcleo accumbens, hipotálamo lateral, corteza motora anterolateral y corteza orbitofrontal •	
Fig. 9 Proporción de neuronas de acuerdo a su modulación •	
Fig. 10 Sistema conductual •	64
Fig. 11 Bebedero •	65
Fig. 12 Validación del sistema •	65
Fig. 13 Tarea de reacción al lengüeteo •	71
Fig. 14 Fases de la tarea conductual de reacción al lengüeteo •	72
Fig. 15 Los lengüeteos adicionales son modulados por el volumen •	73
Fig. 16 El lengüeteo es modulado por el valor hedónico de los estímulos •	74
Fig. 17 Raster plot de la sesión de registro durante la tarea de reacción del lengüeteo •	76
Fig. 18 neurona de núcleo accumbens modulada por el lengüeteo •	77
Tabla 1 •	45
Tabla 2 •	5
Tabla 3 •	47

Abreviaturas

AGRP: *péptido relacionado agouti*
alMC: *corteza motora anterolateral*
Als: *lengüeteos adicionales (después del estímulo)*
AP: *antero-posterior*
BMT: *tiempo de movimiento corporal*
CART: *transcrito regulado por cocaína y anfetamina*
CDF: *función de densidad acumulada*
CE: *cluster end (ultimo lengüeteo de un grupo de lengüeteos)*
CMA: *corteza motora anterolateral*
COF: *corteza orbitofrontal*
CS: *cluster start (primer lengüeteo de un grupo de lengüeteos)*
DV: *dorso-ventral*
FR: *formación reticular*
GABA: *ácido gamma aminobutírico*
H: *movimiento de la cabeza de la rata*
Hcrt+: *neuronas que expresan hipocretinas*
HL: *hipotálamo lateral*
HMT: *tiempo de movimiento de la cabeza*
ICI: *intervalo entre clústeres de lengüeteos*
ILI: *intervalo entre lengüeteos*
IQR: *rango intercuantil*
L: *en histología significa lateral*
L: *en conducta significa lengüeteos*
LH: *hipotálamo lateral*
LHa: *área hipotalámica lateral*
LRT: *tarea de reacción del lengüeteo*
MCH+: *neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina*
mOFC: *corteza orbitofrontal*
MOR: *sueño de movimientos oculares rápidos*
NAc: *núcleo accumbens*
NPY: *Neuropéptido Y*
OFC: *corteza orbitofrontal*
PCA: *análisis de componentes principales*
POMC: *Proopiomelanocortina*
QHCL: *quinina, estímulo aversivo*
QW: *estado despierto y en reposo*
SPN: *neuronas espinosas de proyección*
Suc: *sacarosa*
SWS: *sueño de ondas lentas*
SWS-off: *neuronas inactivadas durante el sueño de ondas lentas*
SWS-on: *neuronas activadas durante el sueño de ondas lentas*
W: *agua*

Resumen

Proyecto 1: La conducta de sueño y de la alimentación son conductas relacionadas, ya que al modificar una se altera la otra: por ejemplo, se ha demostrado que la privación de sueño produce

una disminución en la expresión del receptor a dopamina D2 en el núcleo accumbens (NAc), lo que resulta en un incremento en la motivación por comer. Asimismo, el consumo de alimentos ricos en grasas también disminuye la expresión de este receptor en el NAc, lo que podría explicar por qué las ratas obesas son más somnolientas y letárgicas. En este sentido y basados en que el sueño y la alimentación interactúan nosotros hipotetizamos que deben existir, en el cerebro, “**neuronas de convergencia**” que integren ambos estados cerebrales, por otro lado también deben existir “**neuronas especializadas**” que se modulen de manera específica con cada una de estas conductas por separado, quizá para coordinar que no ocurran al mismo tiempo, entre otras cosas. Sin embargo, aún se desconoce si estas poblaciones neuronales existan o si estén presentes en el NAc o en otras regiones cerebrales involucradas en la regulación del sueño y/o de la alimentación. En este proyecto abordamos estas preguntas registrando la actividad neuronal en ratas que voluntariamente transitaron entre periodos naturales de alimentación y de sueño, específicamente registramos 264 neuronas en el NAc y comparamos estos resultados con la actividad neuronal en el hipotálamo lateral (HL, n=84), en la corteza orbitofrontal (COF, n=328) y la corteza motora anterolateral (CMA, n=433). Como lo hipotetizamos encontramos una población neuronal en el NAc (24%) que se modulo con ambos estados conductuales sugiriendo que estas neuronas probablemente desempeñen una función integradora (o de convergencia), de igual forma en el HL también se observó una gran proporción de neuronas de convergencia las cuales se modularon en ambos estados conductuales (31.9%). En contraste, en las dos regiones corticales registradas, la CMA y la COF, se encontraron principalmente poblaciones “neuronales especializadas” moduladas por una conducta o la otra, pero muy pocas neuronas (<10%) se modularon en ambos estados conductuales. Estos resultados demostraron por primera vez la existencia de poblaciones neuronales principalmente en las regiones subcorticales que integran la información de circuitos neurales que modulan la alimentación y el sueño, esta convergencia en la actividad neuronal podría explicar por qué ambos estados conductuales están relacionados, y porque alteraciones celulares producidas por una de estas conductas produce cambios a nivel neurofisiológico y conductual en la otra conducta. Por otra parte a nivel cortical se encontraron principalmente neuronas especializadas en ambas regiones registradas las cuales nosotros proponemos podrían participar en la coordinación de un estado conductual específico. Estos resultados abren una gama de posibilidades que permitirán en un futuro encontrar nuevos blancos terapéuticos que modulen la conducta de ingesta sin afectar el sueño como sucede actualmente con la gran mayoría de los fármacos anorexigénicos. Asimismo, nuestros resultados sugieren que para abordar el tratamiento de la obesidad no sólo se debe de tomar en cuenta el componente alimenticio sino también mejorar la higiene del sueño.

Proyecto 2. En un segundo proyecto de mi tesis de doctorado también evalué que elementos de la alimentación modula la actividad de las neuronas del NAc, basado en la idea de que las neuronas del NAc se modulan diferencialmente por alimentos palatables (se inhiben) o aversivos (se activan), sin embargo esta idea ha sido controversial ya que también se ha propuesto que esta modulación neuronal se debe en realidad no al componente hedónico de los alimentos (apetitivo-aversivo) sino a las diferencias motoras que se evocan al comer estos alimentos (aceptación-rechazo), para resolver este problema diseñamos una tarea conductual novedosa para separar el componente oro-motor del hedónico de un estímulo gustativo. Para esto también registramos la actividad del NAc en esta tarea conductual y encontramos que las neuronas de esta región se inhibieron en todo momento que el animal lengüeteo un bebedero vacío (seco) y no cuando se liberó una gota de sacarosa (estímulo apetitivo) o quinina (aversivo). Estos resultados demostraron sin lugar a dudas que la actividad de las neuronas del NAc es modula por el componente motor de la ingesta y no por el componente hedónico de los alimentos.

Abstract

Project 1: Sleep and feeding behaviors are both intertwined: Indeed alterations in sleep behavior alters feeding and vice versa : i.e., sleep deprivation leads to a decrease in the expression of dopamine D2 receptor in the nucleus accumbens (NAc) that in turn this change increases the motivation to eat. Likewise, chronic intake of a high fat diet also decreased the expression of this receptor in the NAc which in turn can explain why obese rats are more somnolent and lethargic. We hypothesize that some brain regions must integrate and coordinate both behavioral states at a single neuronal level; thus we propose the existence of “**convergence neurons**” that integrate both sleep and feeding signals and the existence of “**specialized neurons**” that modulate its activity during each behavioral state separately, perhaps to prevent that they do not occur simultaneously. However, it is unknown whether these neuronal populations are present in the NAc or in other brain regions involved in the regulation of both sleep and/or feeding behaviors. In this Ph.D. thesis I addressed these issues by recording the neuronal activity in freely moving rats that voluntarily transit between naturally feeding and sleep periods. We recorded 264 neurons in the NAc, and compared these results with neural activity in lateral hypothalamus (LH, n = 84), orbitofrontal cortex (OFC, n = 328) and anterolateral motor cortex (alMC, n = 433). Our data showed for the first time there is a neural population in the NAc (24%) that is modulated by both behavioral states suggesting that they integrate (or convergence) both sleep and feeding signals. Likewise, in the LH we found that a large proportion of neurons integrate information from both behavioral states (31.9%). In contrast, in both cortical regions, we found mainly “specialized neurons” and very few (<10%) were modulated in both behavioral states (“convergence neurons”). These results demonstrated that neuronal populations in subcortical regions mainly integrate information from neural circuits involved in feeding and sleep. It is tempting to propose that this physiological convergence explains how both behavioral states related to each other, and to understand why changes at cellular level produced by one of these behaviors alters at both neurophysiological and behavioral level. Moreover at cortical regions we found mainly “specialized neurons” which could be involved in the coordination of specific behavioral states. These results open a range of possibilities in the future allowing new therapeutic targets that modulate eating behavior without affecting sleep as currently occurs in the vast majority of anorectic drugs. Our results also suggest that to address the treatment of obesity should not only consider the dietary treatment but also improve sleep hygiene.

Project 2: In a second part of this thesis we studied what component of feeding modulate the activity of NAc neurons. Based on that NAc neurons are modulated differentially by both palatables (it inhibits activity) or aversive (it produce activation) stimuli, however this idea has been controversial since it has been proposed that neuronal modulations of the NAc are not related to the hedonic component of food (appetitive-aversive) *per se* but to motor differences evoked by eating these foods (acceptance-rejection, respectively), to solve this issue we designed a novel behavioral task to separate both hedonic and motor component of feeding called lick reaction task and record the NAc activity in this behavioral task. We found that neurons in this region were inhibited when the rat licks to an empty sipper and not when it receives a drop of sucrose or quinine. These results undoubtedly demonstrated that the NAc is modulated by the motor component of feeding and not by the hedonic components of food.

Introducción (primer proyecto)

I. Generalidades de la conducta de ingesta:

“Nuestro cerebro es quien decide qué comer, cuándo y cuánto comer, así como cuando dejar de hacerlo”: a esta serie de procesos modulados por el cerebro mediante los cuales los mamíferos se nutren de líquidos y alimentos sólidos, se conoce como **conducta de ingesta**¹. La conducta de ingesta es modulada por mecanismos cerebrales que responden a factores sensoriales de los alimentos (**mediado por el sistema gustativo y el circuito de recompensa**) y a señales que inducen saciedad o hambre (**circuito homeostático**)². La **homeostasis** energética mantiene el peso corporal a largo plazo, este proceso implica un balance entre el gasto y consumo energético³. Este balance es resultado de la actividad coordinada del sistema endocrino y del eje cerebro-intestino⁴. Una de las principales funciones del cerebro durante periodos de ayuno es hacer prioritaria la necesidad de comer, de esta manera se garantiza que los niveles de energía perdidos durante la noche sean restaurados⁵, por tal motivo el cerebro debe constantemente monitorear los niveles energéticos del organismo e iniciar o inhibir la conducta de ingesta (modular el apetito y la motivación por comer), por lo que el circuito homeostático y el hedónico deben trabajar de forma coordinada para mantener el peso corporal⁵⁻⁸.

II. Circuito homeostático

El circuito homeostático, está constituido principalmente por varios núcleos hipotalámicos y del tallo cerebral; regula el balance energético a largo plazo y estos núcleos son modulados por señales hormonales periféricas que producen hambre o saciedad⁷⁻¹⁰. Aunque hay muchas estructuras cerebrales que participan en este circuito, en esta tesis sólo revisaremos las más relevantes a nuestro proyecto.

El hipotálamo forma parte de un sistema en el cual se integra el peso corporal con la ingesta y el gasto de energía ¹¹⁻¹⁵. El hipotálamo contiene varios núcleos que median funciones homeostáticas^{12, 16} como veremos a continuación:

1) El núcleo arcuato

Es quizá el elemento más importante del circuito homeostático, es una región muy pequeña del hipotálamo que monitorea los niveles energéticos del organismo, por ejemplo contiene neuronas que son sensibles a los niveles periféricos de glucosa, tiene neuronas que sintetizan péptidos y proteínas que inducen hambre cuando hay disminución de energía (orexigénicos) y saciedad (anorexigénicos) cuando los niveles energéticos son óptimos o están excedidos^{2, 5}. En particular este núcleo contiene dos tipos neuronales que no sobrelapan entre sí; unas neuronas llamadas orexigénicas ya que expresan NPY/AGRP (ver abajo definición) y otro grupo de neuronas llamadas anorexigénicas que expresan POMC/CART (ver abajo definición):

A) Neuronas y péptidos orexigénicos

Neuropéptido Y (NPY): sintetizado por los cuerpos celulares de éste núcleo y transportados axonalmente al núcleo paraventricular ¹⁷, las neuronas que lo expresan en el núcleo arcuato, se activan en respuesta a señales originadas por la depleción de los depósitos de grasa corporal, o con disminución del componente energético como ocurre en el ayuno prolongado o en estados patológicos como la diabetes mellitus ¹⁸.

AGRP: es el péptido identificado en el gen *agrp* o el péptido relacionado agouti (AGRP), el AGRP estimula el apetito al bloquear el receptor de melanocortina del tipo 3 (MC3) en el núcleo paraventricular¹⁹. La estimulación de neuronas que expresan este

péptido induce el consumo y la búsqueda de alimentos²⁰, estas neuronas proyectan al hipotálamo paraventricular e inhiben a neuronas que expresan oxitocina. Se sabe que en el síndrome de Prader-Willi estas neuronas (oxitocina+) están disminuidas produciendo un hambre insaciable, por lo que se han caracterizado como las neuronas responsables de iniciar la búsqueda de alimentos en estados de hambre ²¹.

B) Neuronas y péptidos anorexigénicos

Proopiomelanocortina (POMC): suprime la ingesta, es un precursor molecular que al ser cortado da origen a péptidos más pequeños como la hormona estimulante de los melanocitos –alfa (α -MSH) y que ejercen sus efectos por unirse a miembros de una familia de receptores a melanocortinas MC-3 y MC-4⁷. POMC es expresado por neuronas propiomelanocortinas, estas expresan el precursor molecular cuyos productos son modificados en distintas neuronas con los cuales se obtienen distintos péptidos ²².

El transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) suprime la ingesta y promueve un balance energético negativo. CART también se expresa en las neuronas anorexigénicas que expresan POMC.

2) El área hipotalámica lateral (HL)

La lesión de esta región produce disminución en la ingesta y anorexia, modificando la capacidad de identificación entre estímulos gustativos palatables y aversivos ^{23, 24}. En este núcleo hay poblaciones neuronales que expresan hipocretinas (neuropeptidos que inducen sueño), también se les conoce como orexinas (ya que también inducen hambre), proyectan extensamente a todas las partes del cerebro, estas neuronas junto con las neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH+) son responsables de regular el ciclo sueño-vigilia, sin embargo; también como ya se mencionó se han relacionado con los procesos de alimentación ^{11, 25, 26}.

Estos reguladores homeostáticos también pueden actuar sobre el **circuito de recompensa** del cerebro, más notablemente sobre el NAc para incrementar o disminuir el incentivo de los alimentos en función a los niveles de energía⁵. Esto se debe a que el NAc Shell es la única región del estriado ventral que envía axones al hipotálamo lateral.²⁷

III. Circuito de recompensa en la alimentación

En el caso del **circuito de recompensa** se conoce que la alimentación está influenciada por el placer que se produce al consumir los alimentos, la recompensa por obtener un alimento puede motivar fuertemente su consumo incluso cuando el animal se encuentre saciado^{28 29}, de tal forma que el circuito de recompensa tiene la capacidad de ignorar al sistema homeostático. En ésta tesis hablaremos del área tegmental ventral, el NAc y la COF ya que son las regiones cerebrales más importantes del circuito de recompensa, en relación a la alimentación.

1) Área tegmental ventral

Este circuito está formado por un conjunto de neuronas dopaminérgicas que tiene sus cuerpos celulares en el área tegmental ventral cuyos axones terminan en el NAc, se ha propuesto que cualquier mecanismo conductual o farmacológico que produzca la liberación de dopamina en el NAc es percibido como un estímulo positivo o placentero, sin embargo esta función del neurotransmisor de la dopamina *per se* ha sido puesta en duda en varias ocasiones^{2, 30}. No obstante, estudios recientes, con métodos optogenéticos, han demostrado que la activación selectiva de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral es

recompensante para el animal³¹. Lo que comprueba que la actividad de estas neuronas dopaminérgicas (ya sea mediado únicamente por la dopamina que liberan o por otro mecanismo desconocido) es *suficiente* para producir placer, y demuestra que estas neuronas son un componente fundamental del circuito de recompensa del cerebro.

2) El núcleo accumbens (NAc)

El **NAc** que significa “núcleo que yace sobre el septum” está localizado en la parte ventral del estriado y se subdivide en dos regiones su parte core y su parte shell; particularmente su porción shell se ha involucrado en la regulación del valor hedónico de los alimentos³². La mayor parte de la población neuronal (alrededor del 95%) del accumbens está conformada por neuronas espinosas de proyección (SPN; spiny projection neurons), estas neuronas son moduladas por dopamina ya que expresan varios receptores dopaminérgicos (particularmente D1 o D2, ver abajo), sin embargo son neuronas inhibitorias (es decir que producen el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico GABA), y tienen un extenso y largo árbol dendrítico, cada ramificación de este árbol dendrítico tiene numerosas espinas las cuales reciben inputs excitatorios, es decir son sinapsis glutamatérgicas, éstas proyecciones vienen de otras regiones del sistema límbico, por ejemplo de la COF, el hipocampo y la amígdala. Debido a la gran cantidad de inputs que recibe el NAc le confieren la característica de ser un centro integrador de información motivacional, y ya que el NAc proyecta a regiones motoras como el pálido ventral, se le conoce como una interface que transforma la información motivacional en movimiento³³.

Como ya lo mencionamos, las neuronas SPN se dividen en dos poblaciones principales, las que expresan el receptor a dopamina D1 (SPN D1+) y las que expresan el receptor a dopamina D2 (SPN D2+)³⁴. La consecuencia fisiológica de la activación de los receptores a

dopamina D1 o D2 sobre estas neuronas no está bien entendido, estudios de fijación de voltaje (patch-clamp) han reportado que la activación de estos receptores sobre las neuronas espinosas medianas puede modular canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , sin embargo estos efectos pueden variar de célula a célula³⁵. Como ya se mencionó, se propone que las proyecciones dopaminérgicas que modulan al NAc (e.g., las proyecciones que vienen del área tegmental ventral) incrementan la liberación de dopamina durante el proceso de alimentación^{6, 36}, sin embargo; no se sabe cuál es el efecto de la liberación de dopamina sobre las neuronas del NAc. En algún momento se propuso la posibilidad de que esta liberación de dopamina en el NAc modulará directamente la actividad de interneuronas colinérgicas, las cuales representan menos del 2% de las neuronas del NAc³⁵. Es importante resaltar que hay dos tipos de proyecciones desde el área tegmental ventral al NAc, unas que proyectan a las interneuronas colinérgicas del NAc y las inhiben (ya que expresan ácido gamma-aminobutírico, GABA)^{2, 34, 37, 38} y otras proyecciones que ya mencionamos son dopaminérgicas las cuales modulan directamente a las SPNs del NAc, entonces en forma directa (neuronas dopaminérgicas) e indirecta (neuronas GABAérgicas) el área tegmental ventral puede modular de forma compleja y no lineal a la actividad de las neuronas SPND1+ D2^{2, 34, 38}.

El área tegmental ventral también recibe proyecciones del circuito neuronal que modula la homeostasis energética específicamente de las neuronas del HL², de esta manera el circuito de la alimentación (ambos el homeostático y el de recompensa) trabajan en tándem para coordinar la anticipación y el consumo de un alimento. De forma simplificada se puede decir que cuando los niveles de energía son óptimos, el sistema de recompensa disminuye el placer y la expectancia por la recompensa, por lo que se disminuye la motivación por comer^{6, 39, 40}. Por otro lado si los niveles de energía disminuyen (por

ejemplo al privar de alimento a un animal), las neuronas orexigénicas en el arcuato se activan y a su vez también activan a las neuronas hipocretinas (Hcrt+) del HL^{41, 42} lo que produce hambre. En conclusión estas evidencias indican que los circuitos homeostáticos y hedónicos están relacionados y podrían actuar en conjunto al modular la alimentación.

3) Teoría de la “compuerta”, relación de las proyecciones NAc-HL

Hay dos tipos de respuestas neuronales en el NAc durante la alimentación, unas neuronas incrementan su frecuencia de disparo (tipo 2) y otras lo disminuyen (tipo 1), las neuronas tipo 1 son necesarias para que se genere la conducta del lengüeteo, se ha propuesto por el grupo del Dr. Howard Fields que estas neuronas al ser inactivadas sirven como una “compuerta” de entrada que permite que la conducta motora de ingesta ocurra. Este resultado se sustenta en el hecho de que cuando estimulan eléctricamente al NAc, el lengüeteo se detiene o simplemente no se puede llevar a cabo, en relación a lo anterior se ha demostrado que la inhibición farmacológica de las neuronas del NAc (con Muscimol agonista de los receptores tipo GABA A) incrementa la ingesta en una relación dosis-respuesta en animales saciados⁴³. Las neuronas SPN del NAc Shell envían proyecciones al pálido ventral^{32, 44, 45}, estas conexiones transmiten información desde el accumbens a aferencias tálamo-corticales que eventualmente inciden sobre sistemas motores voluntarios localizados en el tallo cerebral, se ha postulado que estas proyecciones son inhibitorias, son neuronas SPN que expresan el receptor a dopamina D1 y son activadas durante el lengüeteo (tipo 2 de acuerdo a la clasificación de Howard Fields)⁴⁶, esta activación en principio generaría una desinhibición de la inhibición que va desde el pálido ventral hacia el HL, esto produce la activación del HL y permitiría la conducta del lengüeteo²⁷. Por otro lado el NAc shell también envía axones directamente al HL, estas proyecciones son inhibitorias, algunos han postulado que estas proyecciones son de neuronas SPN que expresan el

receptor a dopamina D2²⁷, estas neuronas se inactivan durante el lengüeteo (probablemente las neuronas tipo 1 descritas por Howard Fields)⁴⁶, al inactivar la inhibición de estas neuronas resultaría en la activación del HL, ya que las proyecciones desde el HL modulan estructuras que directamente controlan generadores de patrones motores en el tallo cerebral relacionadas a la conducta de alimentación⁴⁷⁻⁴⁹, en resumen a lo anterior, para que se inicie el proceso de alimentación el NAc modula la actividad de sus neuronas para permitir la activación del HL, y esta activación produce la conducta motora de ingesta^{33, 43, 50, 51}. De tal forma que de estas evidencias de la literatura se puede esperar que durante el consumo de un alimento palatable la mayoría de las neuronas del NAc se encuentren inhibidas mientras que las neuronas del HL se activen.

4) La corteza orbitofrontal

La COF es una región del lóbulo frontal del cerebro relacionada con el procesamiento cognitivo de la toma de decisiones. Lesiones de la COF produce conductas persistentes inapropiadas a respuestas que previamente fueron recompensadas, incluso después de un proceso de extinción o de aprendizaje de regla invertida (reversal learning)⁵²⁻⁵⁴. Lo anterior se ha visto en cualquier tipo de recompensa (monetaria, alimenticia o por drogas) asociada a una respuesta. La COF codifica la elección en la toma de una decisión⁵⁵, este es el papel más importante que se le ha atribuido a la COF. En el caso de la alimentación se ha demostrado que codifica la expectancia por el consumo de alimentos y la decisión al elegir que recompensa obtener^{44, 56}, en humanos se ha visto que la activación de esta región correlaciona con el efecto placentero que produce el comer alimentos líquidos⁵⁷, también se ha demostrado que la actividad neuronal de la COF codifica la viscosidad y la astringencia de algunos alimentos⁵⁸, así como es modulada por el hambre y

por el contenido calórico de los mismos ^{59, 60}, en general la COF participa en la codificación del valor hedónico de la recompensa, la expectancia y la toma de decisiones relacionada con la conducta de ingesta ⁴³.

IV. Circuito motor de la alimentación

CMA y formación reticular (FR)

Aunque la CMA no forma parte del sistema de recompensa, si es modulada por este circuito ³⁴, debido a que en este proyecto registramos la actividad de esta corteza explicaremos brevemente las generalidades de esta región y su relación con la alimentación. La CMA es la única región cortical que puede directamente modular a las conductas estereotipadas oro-motoras como la masticación y el lengüeteo ⁶¹. Esta región proyecta directamente a la FR, en donde se encuentra el centro generador de patrones del lengüeteo⁶², de esta manera puede iniciar y mantener un estado motor consecutivo ⁶³. Desde el punto de vista morfológico la FR está constituida por una red neuronal que se encuentra presente en gran parte del sistema nervioso central. Las neuronas de la FR del tronco encefálico forma una red cuyos axones proyectan de forma rostral y caudal. Es así como sus proyecciones se extienden hacia el tálamo, el hipotálamo, cerebelo y médula espinal. En general la FR recibe una continua información sensorial y sensitiva tanto de nervios craneanos como de médula espinal, luego la información se propaga ampliamente a diferentes áreas del sistema nervioso⁶⁴. Se ha descrito que la FR participa en diferentes funciones. Entre ellas destacan:

- 1) El control de la actividad de la musculatura estriada (vía retículo-espinal y retículo-bulbar) controla conductas motoras estereotipadas como el lengüeteo, manteniendo el tono

de la musculatura anti-gravitatoria o regulando la musculatura respiratoria por medio del centro respiratorio del bulbo raquídeo ^{65, 66}.

2) Control de la sensibilidad somática y visceral, por ejemplo a través de mecanismos de compuerta de control de la entrada del dolor ⁶⁴.

3) Control del sistema nervioso autonómico como por ejemplo en la regulación de la presión sanguínea por activación del centro cardiovascular ⁶⁷.

4) Control del sistema endocrino ya sea directa o indirectamente vía hipotálamo, influyendo en la regulación de la liberación de los factores tróficos hormonales ⁶⁷

5) Influencia sobre los relojes biológicos, regulando los ritmos circadianos ⁶⁸.

6) Control del ciclo sueño vigilia por medio del sistema reticular activador ascendente⁶⁹.

De la FR dos ramas del nervio hipogloso, inervan la lengua modulando el ciclo de lengüeteo (protrusión y retracción), el lengüeteo al igual que la masticación es rítmico y estereotipado ⁷⁰, este patrón rítmico del lengüeteo se origina en el centro generador de patrones motores, las neuronas en la FR generan el lengüeteo a una frecuencia theta (4-7 Hz), de esta manera la CMA está conectada casi directamente a los núcleos motores que controlan el movimiento de la lengua, de tal forma que manipulaciones de la CMA afectan el ritmo del lengüeteo ^{71, 72}.

V. Cambios neuronales que incrementan el deseo por los alimentos

Debido a que las drogas y los alimentos pueden activar circuitos comunes de recompensa en el cerebro, el estudio de la adicción a drogas de abuso humano ofrece una

ventana para el entendimiento de los circuitos neuronales que median la motivación por comer y cómo este circuito puede sufrir alteraciones que den como resultado conductas patológicas del apetito ⁷³.

La regulación del consumo de los alimentos es mucho más compleja que el consumo de drogas porque la ingesta de alimentos esta modulada por múltiples señales periféricas y centrales mientras el consumo de drogas es modulado por aspectos locales del sistema nervioso central, sin embargo; tanto la adicción de drogas como la adicción por los alimentos, activa al circuito de recompensa y a mecanismos involucrados en la toma de decisiones ^{28, 73-75}. Se ha propuesto que el cerebro sufre adaptaciones que inician al exponerse a condiciones supra fisiológicas en el sistema dopaminérgico ⁷³, por ejemplo, al consumir un alimento apetitoso (o una droga de abuso humano) de forma crónica termina por reducir la expresión del receptor a dopamina D2 en el NAc y este cambio incrementa la conducta compulsiva de alimentación y el desarrollo de adicciones, por otro lado se ha observado que manipulaciones de las subpoblaciones SPN D1+ y SPN D2+ del NAc, modulan la respuesta conductual a la cocaína, lo cual sugiere que estas poblaciones participan activamente en el desarrollo de la conducta compulsiva ^{28, 76}, estos cambios también están asociados a alteraciones en la actividad de la corteza prefrontal y orbitofrontal, ya que el NAc recibe proyecciones de ambas cortezas ⁷⁷.

En el caso de los adictos a alguna droga de abuso humano se ha observado que presentan una hipoactividad de la COF en proporción directa a los niveles del receptor a dopamina D2 en el estriado, en contraste, cuando los adictos a las drogas son examinados inmediatamente después de la administración de cocaína o durante la ansiedad inducida por la abstinencia a la cocaína, la COF es hipermetabólica en proporción a la intensidad de la ansiedad ^{78, 79}. El placer *per se* no es suficiente para iniciar y sostener la conducta

compulsiva, sino que la estimulación intermitente de dopamina secundaria al uso crónico de drogas parece alterar al circuito **estriado-tálamo-orbitofrontal** el cual está involucrado en la toma de decisiones y por lo tanto se generan conducta compulsivas que terminan incrementando el consumo de alimentos o drogas ⁷⁶.

VI. Circuito del sueño

El HL también juega un papel importante en la integración del sueño con la alimentación y estas funciones son mediadas vía dos poblaciones neuronales complementarias, unas expresan hipocretinas (Hcrt+) y la otra población expresa la hormona concentradora de melanina (MCH+) ⁸⁰. La actividad de estos dos tipos de neuronas es fundamental para la regulación del sueño, la homeostasis de energía, adicción a sustancias de abuso, y en la alimentación. Las hipocretinas, también conocidas como orexinas, son neuropeptidos derivados de preprohipocretina, son producidas por células localizadas en el HL y en el área perifornical (comprenden más o menos el 5% de todas las neuronas en el HL). Las Hcrt+ proyectan extensamente a gran parte del cerebro, incluyendo estructuras del cerebro medio, estructuras que regulan el despertar como el **rafe dorsal** y **locus ceruleus** y en menor proporción se extiende a regiones cerebrales asociadas a la recompensa como son a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y al NAc shell ^{81, 82}.

El sistema de hipocretinas ha sido asociado al mantenimiento y estabilidad del estado de vigilia. Estudios electrofisiológicos han demostrado que las neuronas Hcrt+ son silenciosas durante el sueño, están activas principalmente durante estados de actividad o durante transiciones de sueño a vigilia, lo cual sugiere que pueden promover el despertar

⁸². Recientemente el grupo de Lecea et. al. 2009, ha demostrado que la activación selectiva de las neuronas Hcrt+ incrementa la probabilidad de que un ratón transite entre un estado de sueño a un estado de vigilia, de tal forma que la actividad de este pequeño grupo de neuronas Hcrt+ es suficiente para llevar a un roedor de un estado de sueño a vigilia ⁸³. Además, del papel de las Hcrt+ en la estabilización del estado de vigilia, también se han relacionado a la recompensa y adicción, un ejemplo es el hecho de que a los pacientes con narcolepsia (pacientes que tienen lesionado a las neuronas Hcrt+) son tratados con fármacos similares a las anfetaminas, sin embargo es raro que desarrollen farmacodependencia, infusiones intracraneales del péptido Hcrt-1 elevan el umbral de auto estimulación eléctrica, indicando que las neuronas Hcrt+ pueden desensibilizar al sistema de recompensa ⁸¹.

Interesantemente la sobre activación de las neuronas Hcrt+ induce un estado de hiperexcitación (llamado en inglés craving) caracterizado por estados de ansiedad y deseo incontrolable por drogas o alimentos^{84, 85}. También se ha demostrado que este estado es mediado por la interacción con vías cerebrales encargadas de regular estados de estrés, de tal forma que la infusión de un antagonista del factor liberador de corticotropina atenúa severamente la recaída a un estado de búsqueda de cocaína que previamente había sido extinguido ⁸⁶. Observaciones adicionales han mostrado que el número de neuronas Hcrt+ activadas en el HL correlacionó con el aumento de preferencia de lugar en el cual se les administraba cocaína, anfetamina y alimentos altamente palatables⁸⁷. La activación directa de las neuronas Hcrt+ restablece la conducta de búsqueda de drogas previamente extinguida. Además del papel de las neuronas Hcrt+ en el estrés y recaída de la adicción a drogas, la interacción entre neuronas Hcrt+ y neuronas dopaminérgicas localizadas en el área tegmental ventral parece relevante para mediar la participación de Hcrt+ en el

procesamiento de la recompensa, ya que la administración directa de la hipocretina-1 en el área ventral tegmental también reinstala la conducta de búsqueda inducida por la anfetamina⁸⁴.

Por otra parte, las neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH+), están selectivamente localizadas en el HL y envían proyecciones a la corteza, al hipocampo, amígdala basolateral y al NAc. También proyectan a neuronas en el arcuato, y a neuronas Hcrt+ en el mismo núcleo. Registros de la actividad eléctrica de las neuronas MCH+ a través del ciclo sueño-vigilia han demostrado que responden en forma recíproca a las neuronas Hcrt+, específicamente las MCH+ son silenciosas durante la vigilia y disparan poco durante el sueño de ondas lentas, y paradójicamente su máxima frecuencia de disparo se observa durante el sueño MOR (sueño de movimientos oculares rápidos), en contraste las neuronas Hcrt+ aumentan su frecuencia de disparo durante periodos de actividad y pocos segundos antes de la transición de sueño a vigilia⁸². Por lo que la activación de las neuronas MCH+ promueve el sueño mientras que las Hcrt+ evocan el estado de alerta y atención ⁸². El sistema MCH es definido como el péptido MCH y sus receptores MCH-1 y MCH-2 (este último no es funcional en ratas). Este sistema se ha relacionado con el aumento de funciones cognitivas como la consolidación de la memoria durante el sueño ⁸⁸. Además de su participación en el aprendizaje, las neuronas MCH+ y Hcrt+ pueden también servir como sensores metabólicos ya que se modulan ante los distintos niveles de glucosa periférica, por lo que pueden ser importantes para coordinar funciones metabólicas ^{89, 90}. Por ejemplo el estado de hiper-activación es normalmente desencadenado por un periodo prolongado de privación de alimento. La relevancia particular de la relación entre la activación locomotora y el metabolismo es el hecho de que las hipocretinas son también sensibles a la leptina y a otras hormonas relacionadas a la alimentación ⁹⁰

VII. El NAc modula y es modulado por el circuito que modula el ciclo sueño-vigilia en el HL

Las neuronas SPN del NAc shell y neuronas MCH+ desde el HL reciben proyecciones recíprocas y participan en la codificación de una recompensa en la alimentación ⁹¹, las neuronas MCH+ localizadas en el HL regulan la transición de la vigilia al sueño⁹², las neuronas SPN que proyectan del NAc al hipotálamo lateral, modulan a las neuronas glutamatérgicas del HL que forman parte de un circuito local del hipotálamo, estas proyecciones locales del hipotálamo hacen sinapsis en las neuronas Hcrt+ y MCH+, la relación entre el NAc y estas neuronas HL que participan en el sueño forman un circuito cerrado. Finalmente las Hcrt+ mandan axones eferentes a casi todo el cerebro, pero principalmente a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral ⁴¹. En resumen el NAc shell modula al HL y al mismo tiempo integra información de la homeostasis interna ³², mientras que las neuronas del HL que llevan la información del hipotálamo al NAc también modulan el ciclo sueño vigilia ⁹², estos hallazgos corroboran lo que se observa en los experimentos clásicos, en los que se demuestra que el estado de saciedad promueve la conducta de sueño, sin embargo el ayuno prolongado inhibe el sueño y produce la conducta de búsqueda de alimentos⁹³, estos resultados proponen una relación entre el estado homeostático y la motivación por dormir o comer, el estado homeostático produce la motivación por comer en el ayuno prolongado o por dormir en el estado de saciedad, justo porque el NAc está íntimamente relacionado a ambos al circuito del sueño y al circuito homeostático, y al mismo tiempo es la parte central del circuito de recompensa⁴¹.

VIII. Regiones corticales y su relación con el sueño

En 1935, la revista Science publicó por primera vez , que el laboratorio del Dr. Loomis había encontrado oscilaciones a baja frecuencia durante el sueño usando un electroencefalograma ⁹⁴, este descubrimiento abrió una serie de experimentos que comenzaron a inferir que la corteza cerebral era relevante para la modulación de la conducta de sueño. Por ejemplo al disecar la corteza de un hemisferio cerebral de un gato, produjo alteraciones en la conducta del sueño durante 4 meses posteriores a la cirugía, sin embargo estas alteraciones en la conducta desaparecieron posteriormente, y se postuló que era porque la corteza del hemisferio opuesto logró restaurar la función de la corteza faltante ⁹⁵, estos estudios ahora clásicos demostraron por primera vez que la corteza cerebral sin duda juega un papel importante en el mantenimiento de la conducta de sueño.

En el caso de la COF se demostró que la eliminación inespecífica de inhibiciones, causada por la inyección de la toxina del tétanos en el gato, produjo un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas de esta región, esta activación altera la estructura del sueño ⁹⁶. En particular, se demostró que la inhibición de la COF es necesaria para inducir la conducta de sueño ⁹⁷. Aún más, la privación de sueño produce disminución del metabolismo de la glucosa y del flujo sanguíneo en la COF, esto correlaciona con problemas en procesos cognitivos como la percepción e identificación de un sabor⁹⁸, lo que indica que los periodos de sueño son necesarios para el mantenimiento de las capacidades cognitivas moduladas por esta corteza. A diferencia de la COF, la corteza prefrontal medial incrementa su frecuencia de disparo durante el sueño⁹⁹, lo cual habla de que regiones corticales cercanas no necesariamente presentan la misma actividad durante el sueño. Otro ejemplo de este mismo principio se observa en la CMA. la CMA sufre cambios plásticos asociados a un aprendizaje motor, en este sentido alteraciones en la conducta del sueño como la apnea inhiben estos cambios plásticos, se propone que las oscilaciones provocadas

por la respiración rítmica ayudan a la reparación y adaptación a nivel celular en la CMA¹⁰⁰,¹⁰¹. En el caso de la CMA cabe resaltar que es muy importante la conducta de sueño en la consolidación de cambios plásticos relacionados al aprendizaje motor, pese a estos estudios aún se desconoce cómo se modulan las neuronas de la CMA en animales dormidos no anestesiados. En conclusión, diversas regiones corticales participan en la conducta de sueño, pero aún hay mucho que dilucidar a nivel de actividad neuronal en animales que voluntariamente van a dormir de forma natural, es decir que no son restringidos ni anestesiados.

IX. Relación entre el sueño y alimentación

También es interesante que las neuronas Hcrt+ y/o MCH+ del HL pueden proveer una relación crucial entre el balance de energía, la motivación y el sueño, explicando en cierta forma por qué el sueño y el metabolismo están intrínsecamente relacionados, por ejemplo: la privación de sueño altera el metabolismo y disminuye la liberación de leptina (hormona que incrementa el estado de saciedad y es producida por el tejido adiposo) e incrementa la liberación de hormonas que inducen apetito como la grelina (hormona liberada por células del fundus del estómago que produce hambre), por lo que es bien sabido que la falta de sueño incrementa las señales de hambre y suprime las señales de saciedad¹⁰². Aunque se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas para curar el sobrepeso y la obesidad, actualmente se propone que es necesario modular también los hábitos del sueño en función de obtener un mejor resultado en el control de la obesidad^{92, 103-108}.

Por otra parte se sabe que manipulaciones en la ingesta de alimentos pueden alterar patrones de sueño^{93, 109}, también se ha determinado que una mala alimentación y una mala

higiene de sueño podrían contribuir al desarrollo de obesidad ^{103, 108}, esto indica que ambas conductas deben ser integradas y coordinadas, ya que ambas conductas compiten entre sí y generalmente no ocurren al mismo tiempo, entonces surge la siguiente pregunta ¿cómo y dónde se integran y coordinan en el cerebro? Cómo ya se mencionó alteraciones en una de estas dos conductas produce cambios neuronales que modifican a la otra ^{93, 105, 108, 110} y estas modificaciones celulares y fisiológicas ocurren, entre otras regiones, en el NAc shell ¹¹¹⁻¹¹³. En este sentido tenemos como propósito principal de esta tesis de doctorado dilucidar como la función cerebral integra (relaciona) y modula selectivamente ambas conductas a nivel de la actividad de una neurona. En primer lugar en este proyecto caracterizamos la actividad neuronal en NAc en su porción shell durante el sueño y la alimentación, también realizamos una comparación con la actividad neuronal en HL y dos regiones corticales (motora y orbitofrontal). Proponemos que la relación entre sueño y alimentación a nivel de la actividad neuronal se da principalmente en regiones subcorticales, mientras que las regiones corticales tendrán poblaciones que se modulen selectivamente en cada estado conductual ^{5, 12, 41, 43, 46, 79, 108, 114-118}.

Planteamiento del problema

El índice de obesidad en el mundo está aumentando considerablemente, en México se predice que en diez años el 90% de la población tendrá obesidad ¹¹⁹. La obesidad ha emergido como uno de los problemas de salud mundial concernientes a la era moderna, de la misma manera han aumentado los requerimientos para generar terapias seguras y efectivas para combatir esta pandemia global ¹²⁰. Ante tal panorama es imperativo desarrollar estrategias terapéuticas para prevenir y tratar el problema de obesidad, sin

embargo; para lograr este objetivo primero es necesario dilucidar el funcionamiento fisiológico del cerebro de animales sanos que se alimentan libremente para entonces entender las alteraciones que inducen el desarrollo de la obesidad ^{74, 121}. En este proyecto partimos de la premisa que : *“nuestro cerebro es quien decide qué comer, cuánto comer y cuando dejar de hacerlo,”* de tal forma que es probable que alteraciones en los sistemas cerebrales que modulan la alimentación podrían producir trastornos que inducen el sobrepeso y la obesidad, el dilucidar estas alteraciones permitirá encontrar herramientas específicas para tratar al sobre peso y la obesidad ¹²². Estudios epidemiológicos han propuesto que las alteraciones en los hábitos del sueño son un factor de riesgo para comer de más y para desarrollar obesidad¹⁰⁸ sugiriendo que la conducta del sueño y de la alimentación están relacionadas fisiológicamente⁹³, sin embargo se conoce muy poco acerca de cuáles son los grupos neuronales que coordinan y/o integran la conducta del sueño y de la alimentación. En este sentido y pese a que el sueño y la alimentación son conductas que no ocurren simultáneamente, de alguna manera deben ser integradas por el sistema nervioso central, algunos trabajos proponen que estas alteraciones por cambios en la conducta del sueño y/o alimentación se dan en el NAc^{92, 103, 105, 108, 111-113}, pero en muy pocos trabajos han relacionado ambas conductas en el mismo experimento, por esta razón propusimos un protocolo en el que pudiéramos estudiar ambas conductas en el mismo animal y en la misma sesión. Igualmente se desconoce si la actividad neuronal de regiones corticales y subcorticales es diferente a la del NAc, lo que nos ayudará a entender de mejor forma cómo funciona el cerebro cuando un animal transita voluntariamente entre comer o dormir.

Hipótesis

Basados en que el sueño y la alimentación tienen que ser integrados, pero al mismo tiempo coordinados para que no ocurran al mismo tiempo, nosotros hipotetizamos que deben de existir neuronas de “**convergencia**” que relacionen ambas conductas y neuronas “**especializadas**” que mantengan cada estado conductual por separado. Basados en estudios electrofisiológicos y anatómicos, proponemos que en el NAc y el HL las señales de alimentación y del sueño convergerán en las mismas neuronas, mientras que en regiones corticales (CMA y COF) distintos ensambles neuronales se modularán durante la alimentación y el sueño.

Objetivo General

Caracterizar si la actividad neuronal del NAc, HL, CMA y COF integran (o coordinan) señales de las redes de alimentación y/o del sueño.

Objetivos Específicos

1. Demostrar usando registros electrofisiológicos que el NAc es un nodo de integración de las conductas de sueño y alimentación a nivel de actividad neuronal.
2. Asimismo, registrar la actividad neuronal en HL, CMA y COF durante el sueño y la alimentación, y comparar con los resultados en NAc.

Materiales y métodos

I. Animales:

En estos experimentos se utilizaron 50 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre 300 y 350 g. Los animales se ubicaron en cajas de laboratorio estándar en cuartos con temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), manteniéndolos en ciclos de 12/12 horas día /noche (luces de 0600-1800), 23 ratas fueron utilizadas para registros electrofisiológicos, el resto para las caracterizaciones conductuales.

II. Cirugía para implantar el electrodo:

En el momento de la cirugía los animales fueron anestesiados usando inyecciones intraperitoneales de pentobarbital sódico (50mg/kg) y 0.1 ml de sulfato de atropina,

después se les implanto unilateralmente un arreglo de electrodos móviles, el cual consiste de 32 electrodos (35 μm de diámetro) en NAc (AP = 1.5, L = +1, y DV = 6.5 mm Bregma), HL (AP = -1.8, L = 1.2 DV = -8), CMA (AP = 4.2, L = 3, DV = 2.5), COF (AP = 3.7, L = 1.8, DV = 4.2). La localización de los electrodos se verificó histológicamente empleando secciones de cerebro teñidas con azul de cresilo (Fig. 1 panel derecho). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV (protocolo # 469).

III. Consumo ad libitum de Ensure® sabor chocolate:

Decidimos usar este alimento ya que contiene una mezcla de macronutrientes conformada por grasa, proteínas, azúcar carbohidratos, vitaminas y minerales, esto debido a que es un alimento líquido completo que asemeja a la mayoría de las propiedades de un alimento sólido agradable al paladar ¹²³. Todos los experimentos se llevaron a cabo diariamente, aproximadamente al mismo tiempo (11:00 AM) en una caja de experimentación cerrada conocida como caja de Skinner, en un cubículo ventilado y aislado de sonido. Cada caja contenía un bebedero en el compartimento central, y un foto sensor (photobeam) para medir los lengüeteos (Med Associates)¹²⁴. Además, se entrenaron a los animales a comer grandes cantidades sin privar de agua o alimento. Una semana después de implantarles el electrodo, los animales fueron habituados a beber ensure y al menos 4 sesiones de entrenamiento fueron necesarias para este propósito.

Protocolo experimental utilizando ensure ad libitum: El acceso a los compartimentos con ensure fue restringido por una puerta deslizante; después de 30 minutos la puerta se abre dando el libre acceso a ensure hasta el final del experimento. Es importante resaltar que las ratas no fueron privadas ni de agua o alimento, pero fueron

entrenadas a ingerir ensure diariamente al mismo tiempo del día y pudieron decidir por voluntad propia el comienzo y el término de la alimentación. En los días de experimentos, la actividad neuronal fue registrada y los animales permanecieron en la caja hasta que completaron, al menos, una comida y varios ciclos vigilia-sueño.

IV. Mediciones del comportamiento asociados con la ingestión de ensure.

Microestructura del lengüeteo: Llevamos a cabo un análisis detallado de la microestructura del lengüeteo. La conducta del lengüeteo es rítmica a 6 ó 7 Hz, marcada por pausas ≥ 500 ms entre grupos de lengüeteos (también llamados clúster)⁷⁰.

Análisis de comidas y alimentación: Las comidas fueron definidas por intervalos de interlengüeteos (ILI) mayores a 10 minutos¹²⁵. Se llamó “comida” a un grupo de lengüeteos con un ILI >10 minutos.

V. Registros electrofisiológicos:

Los procedimientos fueron básicamente los mismos descritos previamente¹²⁶. Brevemente, la actividad eléctrica fue registrada utilizando un arreglo de 32 microelectrodos movibles (4x8) de tungsteno usando un procesador de adquisición multicanal (Plexon, Dallas, TX). Sólo las neuronas individuales con potenciales de acción con razones señal/ruido mayores a 3:1 fueron analizadas. Los potenciales de acción fueron aislados en línea mediante un umbral de ventanas tiempo-voltaje y utilizando templeados del análisis de componentes principales. Las espigas o potenciales de acción fueron reordenados usando Off-line Sorter software (Plexon). Los potenciales de campo local fueron amplificados 1000X, filtradas de 0.7-300 Hz y digitalizadas a 1kHz usando una

tarjeta de adquisición digital (National Instruments, Austin, TX) y un procesador de adquisición multineuronas (Plexon).

VI. Hipnogramas:

Utilizando la señal filtrada a baja frecuencia de los potenciales de campo local, se definieron tres estados de comportamiento:

(1) Vigilia; en este estado cerebral, el análisis espectral del potencial de campo local (LFP) se caracteriza por tener una mayor densidad de poder en la banda theta (5-9 Hz) y a frecuencias altas como en la banda gamma (30-55 Hz). En nuestras condiciones experimentales en este estado los animales presentaron poco o ningún comportamiento exploratorio. Además, durante la mayoría de su tiempo de vigilia estaba de pie o en reposo y algunas veces acicalándose.

(2) sueño de ondas lentas (SWS; slow wave sleep), con frecuencias de 10-14 Hz sobrepuestas en ondas delta (1-4Hz).

(3) Alimentación, este estado fue obtenido directamente desde el registro de lengüeteo.

Los estados de vigilia y SWS se asignaron usando los potenciales de campo local y la metodología utilizada por Gervasoni¹²⁷. En resumen esta metodología consiste en eliminar los segmentos con saturación de amplitud, una ventana de desplazamiento con una transformada de Fourier se aplicó para cada señal del potencial de campo local, lo anterior para calcular dos coeficientes de amplitud espectral (0.7-20/0.7-55 Hz y 0.7- 4.5/0.7-9 Hz para coeficientes de 1 y 2, respectivamente). El análisis de componentes principales (PCA) se aplicó después a los coeficientes obtenidos de todos los canales del potencial de campo local y el primer componente principal se utilizó como medida de coeficientes en general

127

Estas medidas obtenidas para cada segundo de los datos se suavizaron aún más con una ventana Hanning (20 sec de longitud). Finalmente, estos dos primeros componentes de amplitudes espectrales se graficaron uno contra el otro para construir el espacio del estado bidimensional (2-D). En este espacio de estado 2-D, la densidad de los puntos refleja la abundancia relativa de los diferentes estados del cerebro. Nosotros notamos que en todos nuestros experimentos no se registraron suficientes cantidades de sueño movimientos oculares rápidos (MOR). Por lo tanto el sueño MOR no fue considerado en ninguno de nuestros análisis.

VII. Neuronas relacionadas a la alimentación:

Utilizando el criterio de Krause en el 2010, nombramos a las neuronas como inactivas y activas durante el periodo de alimentación. Nosotros agregamos más propiedades a esta clasificación, ya que hubo una modulación neuronal en todas las regiones registradas durante el sueño de ondas lentas, (activas (SWS-on) e inactivas (SWS-off)). Para definir que fueron activas o inactivas durante el lengüeteo, utilizamos como línea base desde -5 a -2 segundos antes del inicio del lengüeteo, este periodo se comparó con los tres primeros lengüeteos después del inicio del lengüeteo. Usando una prueba estadística (Wicolxon Rank-test $\alpha < 0.05$) categorizamos a las neuronas como activas cuando presentaron un incremento estadísticamente significativo respecto a la línea base, las que presentaron una disminución estadísticamente significativa en comparación con la línea base se consideraron inactivas, para este análisis consideramos “clúster” aquellos grupos de lengüeteos que tuvieron un intervalo entre lengüeteos menor a 5 segundos, con mínimo 20 lengüeteos.

VIII. Neuronas moduladas por el sueño de ondas lentas:

Para determinar si las neuronas se modulaban durante el sueño utilizamos una línea base de -15 a -5 segundos antes del inicio del sueño de ondas lentas (determinado por el hipnograma), este tiempo lo comparamos con los primeros 10 segundos después del inicio del sueño de ondas lentas usando una prueba estadística (Wicolxon signed Rank-test $\alpha < 0.05$), todas las neuronas que mostraron una disminución significativa en su frecuencia de disparo se clasificaron como SWS-off, las que mostraron un incremento significativo se clasificaron como SWS-on.

Resultados

I. Estados conductuales; alimentación y ciclo de sueño-vigilia

El protocolo experimental permitió estudiar los estados conductuales de sueño y alimentación en el mismo animal y en la misma sesión (Fig. 1). Después de treinta minutos de línea base las ratas tuvieron acceso a ensure y realizaron una comida (Meal 1, lengüeteos en rojo), posterior a este tiempo fueron a dormir (gris) y cuando las ratas decidieron, regresaron a comer para hacer una segunda comida (Meal 2), de ésta manera las ratas transitaron entre el estado despierto-comida (azul-rojo) y despierto-sueño (azul-gris) de forma natural y voluntaria. Estas son transiciones voluntarias de la rata, porque las ratas no

estuvieron privadas de agua ni alimento, ni tuvieron ninguna restricción física. La rata asoció la caja experimental con el acceso a ensure lo cual generó expectación por el ensure, pero ella fue en todo momento quien decidió cuando dejar de comer, cuándo dormir y cuando regresar a comer, por lo que este protocolo conductual fue ideal para estudiar el componente motivacional de la alimentación y las transiciones naturales que ocurren durante el sueño de ondas lentas.

Potencial de campo local (determinación automática del hipnograma)

En todas las regiones registradas (NAc, HL, CMA y COF) se observó una modulación similar en el potencial de campo local (LFP), durante el sueño se observaron oscilaciones de gran amplitud a frecuencias bajas (1-4 Hz) que corresponden al sueño de ondas lentas (ver Fig. 1 gris, inset SWS), y durante los periodos en los que la rata estaba despierta (azul) se ve que el potencial de campo local presenta oscilaciones desincronizadas de baja amplitud a altas frecuencias (ver Fig. 1 inset Awake), es interesante hacer notar que sin importar la región en la que se registró y pese a las diferencias entre regiones en la actividad eléctrica del LFP, se pudo diferenciar cada estado conductual¹²⁷ utilizando el LFP de cada una de las regiones registradas, lo cual habla de una misma modulación eléctrica global en el cerebro característica del ciclo sueño-vigilia.

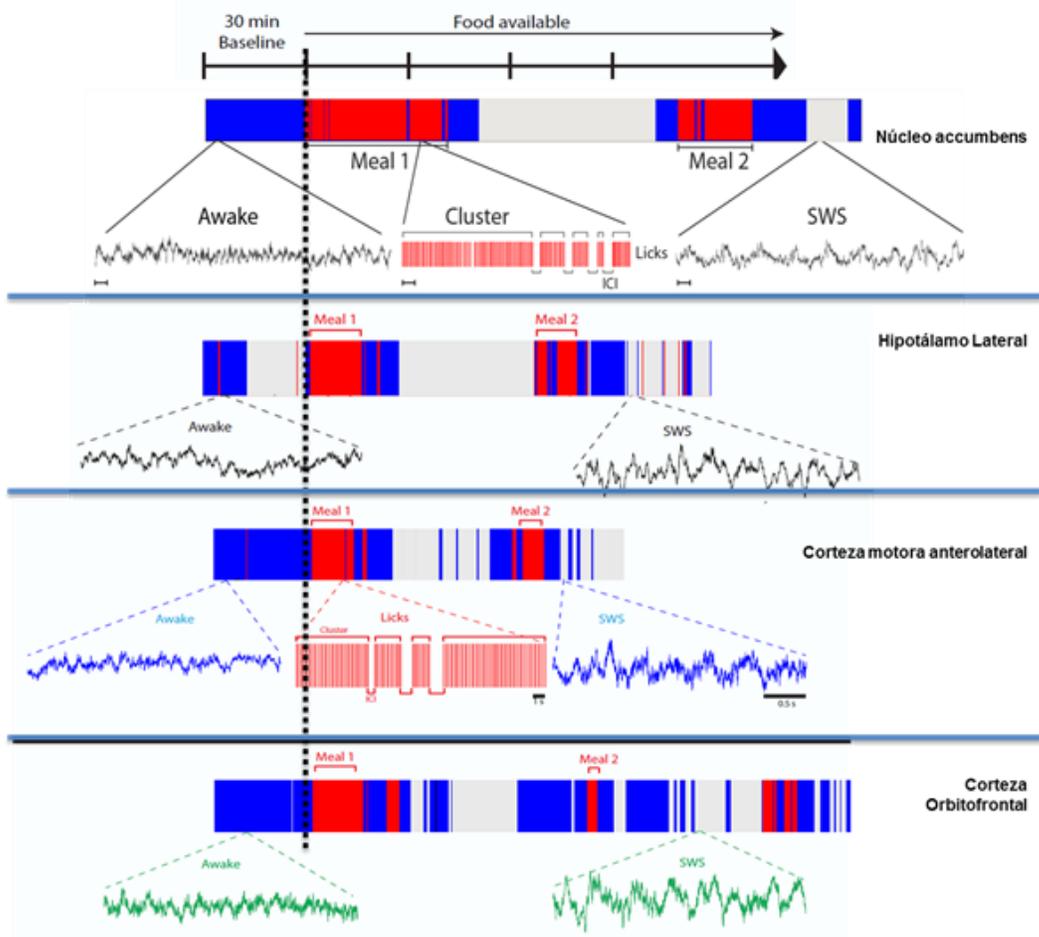


Figura 1. Representación de los estados conductuales: alimentación y ciclo sueño-vigilia (awake-SWS), en orden de arriba hacia abajo, están representadas: NAc, HL, CMA, COF, la parte superior de esta gráfica muestra que después de 30 minutos de línea base las ratas tuvieron acceso a ensue sabor chocolate todo el tiempo de la sesión, en la parte media se muestra el hipnograma, en el que se representan los estados conductuales que correlacionan con el potencial de campo local, en azul cuando la rata esta despierta (awake), en rojo se muestran los lengüeteos y en gris el estado de sueño de ondas lentas (SWS), en la parte inferior se muestra el potencial de campo local, en cada uno de los estados conductuales, el potencial de campo local correlaciona con cada estado conductual, en rojo se muestra la microestructura del lengüeteo, los lengüeteos se agrupan en ráfagas de lengüeteo (cluster) a una frecuencia theta con pequeñas pausas (ICI), si el intervalo intercluster (ICI) fue mayor a 10 minutos se

II. Macro estructura de la alimentación

Como ya se mencionó la sesión experimental también incluye periodos donde la rata lengüetea por ensure (Fig. 1, rojo), la conducta del lengüeteo es estereotipada, rítmica a una frecuencia theta, y genera una serie de grupos pequeños del lengüeteos continuos separados por pequeñas pausas (clúster)⁷⁰, cuando el intervalo entre lengüeteos es mayor a 10 minutos se consideran comidas completas¹²⁵. En todas las sesiones la primer comida fue mayor a la segunda, esto puede deberse a que la segunda comida representa un estado conductual diferente⁶⁰.

III. Microestructura del lengüeteo

Las ratas lengüetean rítmicamente a una frecuencia theta cuando consumen alimentos palatables como el ensure ¹²⁸, en experimentos anteriores (datos no mostrados), nosotros demostramos que el ensure es un alimento más palatable incluso en comparación con altas concentraciones de sacarosa. En estos experimentos las ratas lengüetearon con un intervalo promedio entre lengüeteos de 165 ms (Fig. 2, pico de la distribución de ILI, línea roja) lo que corresponde a una frecuencia de ~6 Hz (1s/165ms; Figura 2), la microestructura del lengüeteo muestra el índice de palatabilidad de los estímulos dados ¹²⁵. Por ejemplo para un alimento palatable las ratas lengüetean más tiempo con menos pausas, menor número de

grupos del lengüeteo y con más lengüeteos por grupo, sin embargo para un estímulo aversivo la rata lengüetea menos tiempo, hace más pausas y por lo tanto hace menos lengüeteos por grupo. En estos experimentos el ritmo del lengüeteo por ensure es similar al consumo de agua o sacarosa, pero los grupos de lengüeteo fueron más largos que los observados por sacarosa lo que indica que el ensure es un estímulo gustativo altamente palatable.

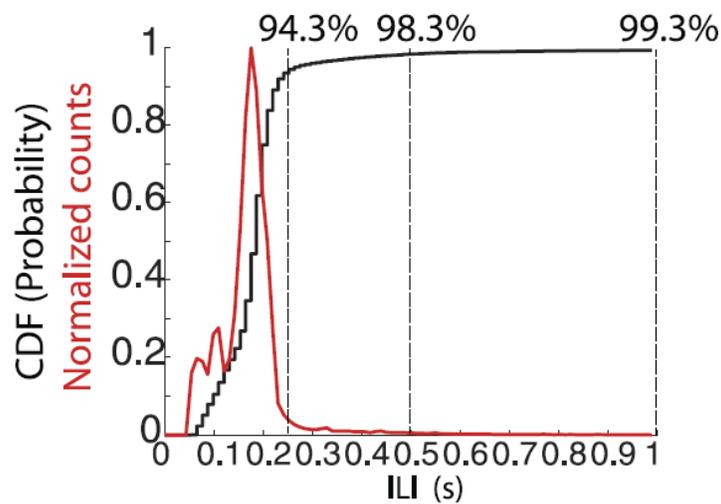


Figura 2. Distribución normalizada del Intervalo entre lengüeteos (ILI) (línea roja), la línea negra muestra la función de densidad acumulada para los lengüeteos de toda la sesión.

IV. Electrofisiología e histología

Se registraron 264 neuronas en NAc, 84 en HL, 433 en CMA y 328 en COF. La Figura 3 muestra la localización de los electrodos en las diferentes regiones después del análisis histológico. Las áreas corticales están muy cerca, separadas sólo por algunos milímetros.

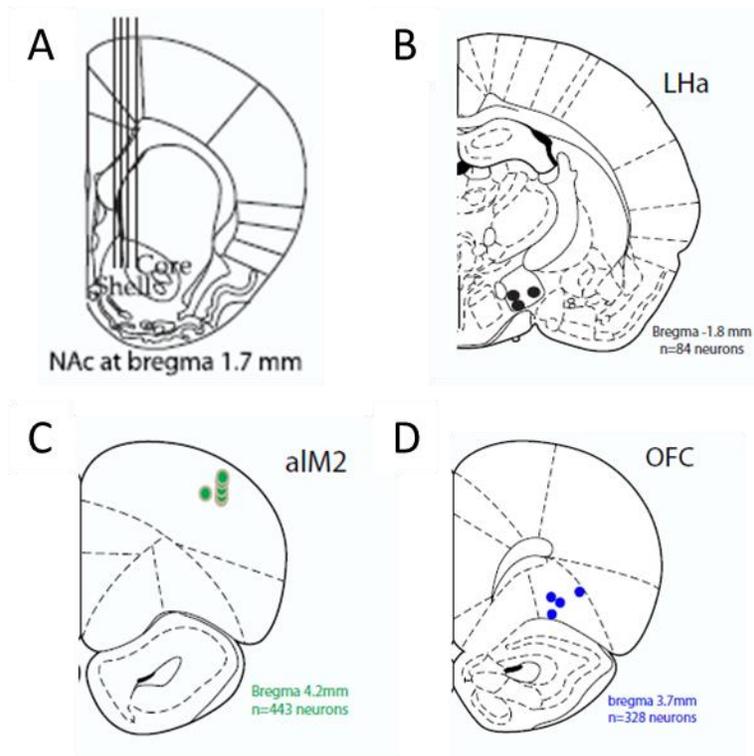


Figura 3. Se muestran los cortes histológicos de cada región, A) NAc: también muestra el arreglo de electrodos putativamente implantados, B) HL, C) CMA, D) COF.

V. Modulación de la actividad neuronal durante la alimentación

a) **NAc:** encontramos que la proporción de neuronas moduladas por la alimentación fue del 47%, esta proporción fue dividida en dos formas de modulación, las que se activan (11%, 30/264) y las que se inactivan (36%, 94/264, Fig. 8A recuadro rojo) durante el lengüeteo de ensure, utilizamos estos términos porque intuitivamente dan a conocer el tipo de modulación que sufren durante la alimentación, una prueba de chi square encontró que las neuronas inactivas fueron significativamente más frecuentes que las neuronas activas [Chi-square =33.03 $p < 0.001$]. La Figura 4 muestra el raster plot de una neurona que se activa y otra que se inactiva durante el lengüeteo con ensure, en el panel A (superior) se representa una gráfica tipo raster,

y un histograma peri-estimulo (inferior), cada marca negra representa un potencial de acción, mientras que cada marca roja representa un lengüeteo, tenemos entonces representados los potenciales de acción y su relación con el lengüeteo (en función ensayos, tiempo), el tiempo cero significa cada inicio de una ráfaga de lengüeteos (CS, cluster start) a la izquierda, a la derecha el término de una ráfaga de lengüeteos (CE, cluster end). En la parte inferior del panel A, se observa el histograma de los potenciales de acción (marcas negras en el raster), es muy notorio que la neurona aquí representada se inactiva durante el periodo de alimentación. Neuronas como ésta representan el 36% (94/264) de las neuronas registradas en el NAc shell. En el panel B se muestra una neurona que se inactiva durante el periodo de alimentación, neuronas como esta representan el 21% (30/264) de todas las neuronas registradas en el NAc. El resto de las neuronas registradas no se moduló con la conducta de ingesta.

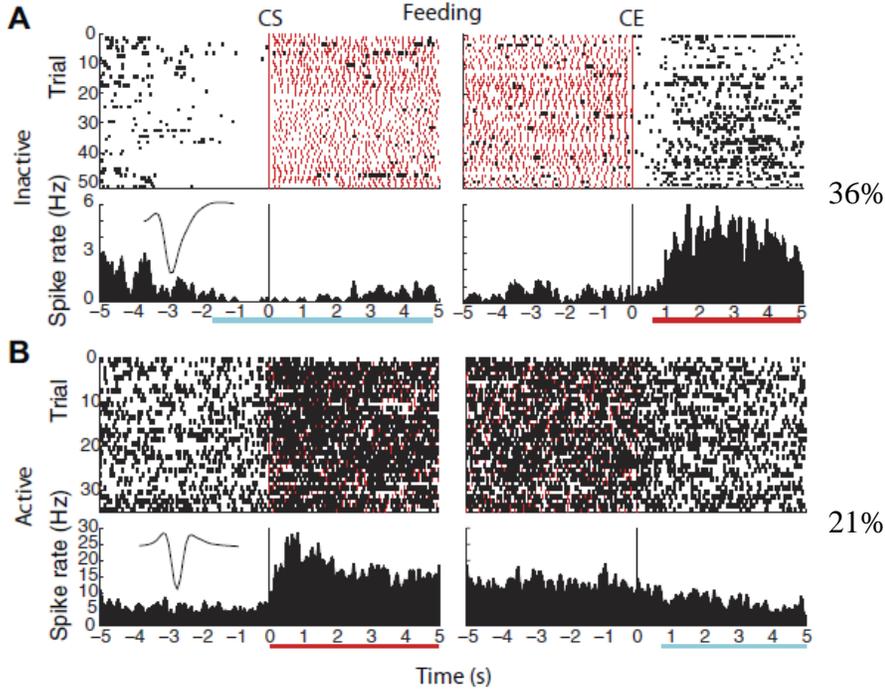


Figura 4 Ejemplos representativos de neuronas en NAc, en el panel A se muestra una neurona que se inactiva durante la alimentación, con su forma de potencial de acción (putativa a neurona espinosa mediana), en el panel B se muestra una neurona que se activa durante la alimentación (putativa interneurona de disparo rápido), ambas graficas están alineadas al inicio de la alimentación (izquierda, CS) y al término de la alimentación (derecha, CE), las gráficas superiores en cada panel muestran el raster plot de actividad neuronal (marcas negras) y el lengüeteo (marcas rojas), las gráficas inferiores muestran el histograma peri estímulo, es un histograma de la actividad neuronal mostrada en el raster plot.

b) **HL:** Contrario a lo que se esperaría de acuerdo a la bibliografía, al igual que en el NAc encontramos una mayor proporción de neuronas que se inactivaron (43.9%, 37/84, Fig. 8B recuadro rojo) en comparación con neuronas activas (9.2%, 8/84). Basados en la idea de que las neuronas SPN del NAc inhiben en todo momento al HL^{32-34, 51} y ya que el NAc se inhibió mayoritariamente durante la ingesta de ensure, entonces era de esperarse encontrar que en el HL se observará mayor excitación que inhibición. Sin embargo, nuestros resultados no confirmaron esta predicción (ver Introducción y Discusión).

c) **CMA:** Esta corteza presentó una mayor proporción de neuronas activas durante la conducta de alimentación (24.1% 105/433, Fig. 8C recuadro rojo), en comparación con la proporción de neuronas que se inactivaron (19.5% 75/433), en la Figura 5 mostramos un ejemplo de neuronas que se activan y se inactivan durante la alimentación en esta corteza, en el panel A se muestra una neurona de CMA, que se inactivó durante el consumo. En la parte superior de éste panel, se muestra la gráfica tipo raster, en negro las marcas de potencial de acción y en rojo los lengüeteos, a la derecha se alinearon al inicio del lengüeteo (CS) y a la derecha al final (CE), en la parte inferior del panel A se muestra el histograma peri-estimulo de los potenciales de acción, claramente se ve que la frecuencia de disparo disminuye durante la ingesta de ensure.

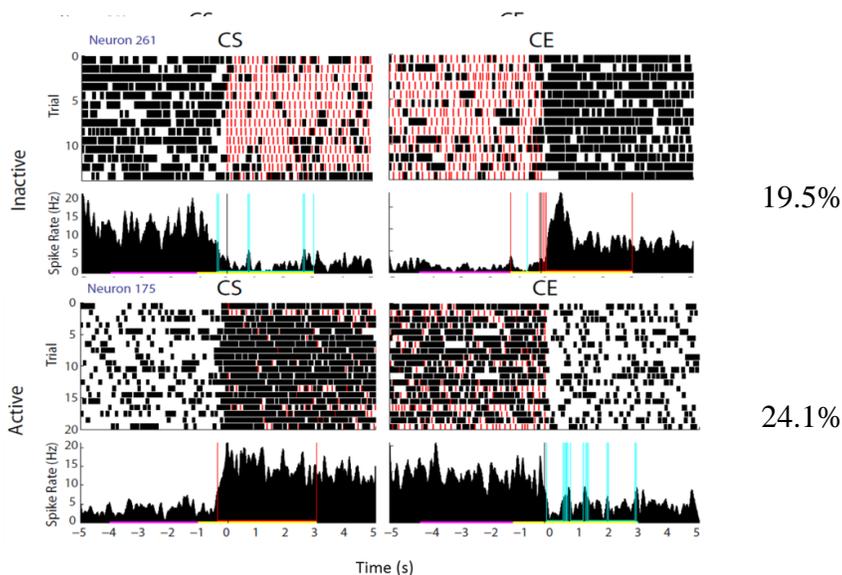


Fig. 5. Ejemplo de neuronas que se modulan en la alimentación en CMA, el panel A muestra una neurona que se inactiva en la alimentación, el panel B muestra una neurona que se activa durante la alimentación, ambas graficas están alineadas al inicio de la alimentación (izquierda, CS) y al término de la alimentación (derecha, CE), las gráficas superiores en cada panel muestran el raster plot de actividad neuronal (marcas negras) y el lengüeteo (marcas rojas), las gráficas inferiores muestran el histograma peri estímulo, es un histograma de la actividad neuronal mostrada en el raster plot, las líneas verticales muestran los cambios inhibitorios y las rojas los cambios excitatorios

d) **COF:** A diferencia de la CMA, la COF mostró mayor inhibición durante la alimentación, 33.4% (110/328) de inactivación contra 6.9% (23/328) de neuronas que se activaron (Fig. 8D el recuadro rojo muestra la proporción de inactivación), es interesante que pese a que la COF anatómicamente está localizada muy cerca de la CMA, separada por tan solo 2-3 mm (Fig. 3) la actividad neuronal durante la alimentación sea tan diferente, este resultado sugiere que estas dos regiones corticales desempeñan funciones diferentes durante la alimentación y demuestran que la actividad cortical es dinámica, dado que cada región cortical tiene circuitos específicos que se modulan para propósitos específicos, es decir, la inhibición en una región cerebral, podría tener un significado fisiológicamente diferente a la inhibición en otra región cortical.

VI. Actividad de solapamiento durante la alimentación y el sueño de ondas lentas

Entiéndase a la actividad de solapamiento, como la actividad de convergencia e integración en la que la misma población neuronal es modulada en ambas conductas. A parte de la clasificación ya mencionada como activas e inactivas durante la alimentación, en el caso del sueño y para poder clasificar la actividad neuronal, llamamos SWS-off (neuronas que se apagan durante el sueño) a las neuronas que disminuyeron su frecuencia de disparo durante el sueño y SWS-on (encendidas durante el sueño) a las que lo incrementan, utilizamos “Only” para clasificar a las neuronas que sólo se modularon en el sueño o en la alimentación en forma específica. La Tabla 1 muestra las diferentes posibilidades de clasificación de la actividad neuronal.

Clasificación	Alimentación	Sueño de ondas lentas
Inactive/SWS-on	Inactivas	Activas
Inactive/SWS-off	Inactivas	Inactivas
Inactive only	Inactivas	Sin modulación
Active/SWS-on	Activas	Activas
Active/SWS-off	Activas	Inactivas
Active only	Activas	Sin modulación
SWS on-only	Sin modulación	Activas
SWS off-only	Sin modulación	Inactivas

Tabla 1. Subcategorías de modulación neuronal durante la alimentación y el sueño de ondas lentas, las clasificaciones en gris representan la actividad de solapamiento, esta clasificación se utilizó para todas las regiones registradas.

La Figura 6 muestra una neurona de NAc que se modula en ambos estados conductuales. Esta es una típica neurona de convergencia entre el sueño y alimentación, en el panel A se muestra como es modulada por la alimentación, la gráfica está dividida en tres partes, la parte superior muestra la frecuencia de lengüeteos, al inicio (CS) y al final (CE), en la parte media se muestra la gráfica tipo raster, las marcas negras corresponden a potenciales de acción y las marcas rojas muestran cada lengüeteo, en la parte inferior se muestra el histograma peri-estímulos, alineado al inicio del lengüeteo

(CS) y al final (CE). En el panel B se muestran también tres partes (de arriba hacia abajo), en la primer parte se muestra un espectrograma de poder, en el que se define usando la actividad del potencial de campo local, el momento en el que la rata inicio el periodo de sueño de ondas lentas, la parte media muestra la gráfica tipo raster, en negro se muestran los potenciales de acción y en la parte inferior el histograma peri-estimulo de estos potenciales de acción, estas graficas están alineadas a todos los momentos en los que la rata transitó entre el estado despierto y sueño de ondas lentas a la izquierda (QW->SWS; quite awake > slow wave sleep) y al momento en el que transitó de estar

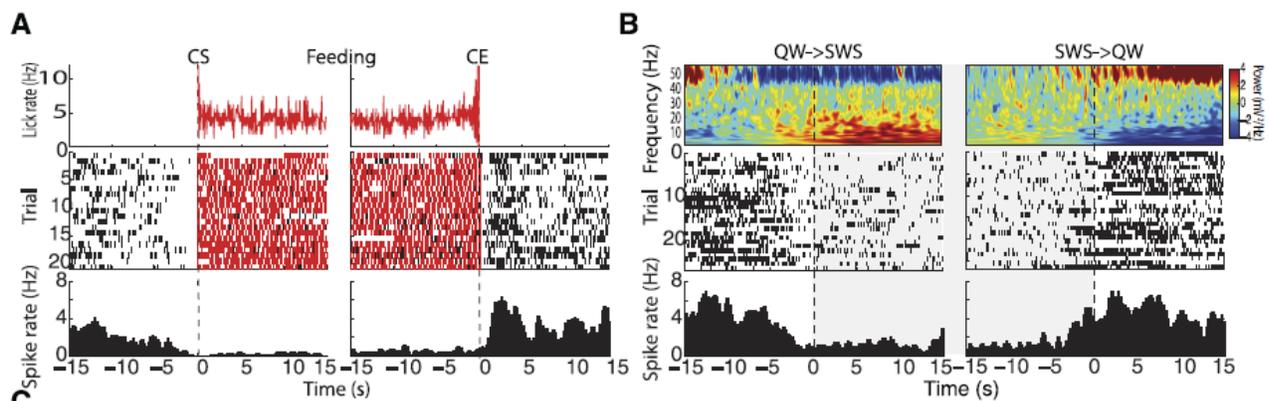


Figura 6. Neurona en NAc que es modulada inactivándose en ambos estados conductuales, en el panel A se muestra el raster plot y el histograma peri estímulo durante la alimentación, en el panel B se muestra el raster plot y el histograma peri estímulo en el periodo de sueño de ondas lentas, en la parte superior de cada panel se muestra en el panel A la tasa de lengüeteos en rojo y en el panel B el espectrograma para determinar con la actividad eléctrica del potencial de campo local el momento en el que la rata inicio (QW->SWS) o termino (SWS->QW) el estado de sueño de ondas lentas.

- a) **Actividad poblacional del NAc:** así como encontramos neuronas que se modulan activándose e inactivándose durante la alimentación, tenemos una proporción de neuronas que se modularon también en el sueño (Fig. 8A recuadro gris), algunas de estas neuronas se modularon en ambos estados conductuales (convergencia en el sueño y la alimentación), la proporción de neuronas de convergencia fue de 28%

(Fig. 6, Fig. 8 A recuadro negro), la proporción de neuronas que se inactivaron en ambos estados (inactive/SWS-off) fue de 14%(39/264), las que se inactivaron en la alimentación y se activaron en el sueño (inactive/SWS-on) fueron el 9%(24/264), las que se activaron en la alimentación y se inactivaron en el sueño (active/SWS-off) representaron el 3%(9/264), finalmente las que se activaron en ambos estados conductuales (active/SWS-on) fueron el 2%(6/264). Las neuronas que sólo se modularon en el sueño representaron el 24% (63/264), de estas se inactivaron 40/264 (15%) (Figura 8A recuadro gris) y fue menor la activación con un 9%(23/264). Estos resultados revelaron que el NAc tiene una gran proporción de neuronas que se modularon en ambos estados, es decir las poblaciones neuronales que integran (comparten modulación) y relacionan ambas conductas a nivel de actividad neuronal unitaria. El tener poblaciones que comparten modulación en ambos estados, aunque el sueño y la alimentación no ocurran al mismo tiempo implica que si estas poblaciones sufren adaptaciones moleculares, celulares o fisiológicas puedan afectar a cualquiera de las conductas con las que se modulan, por lo que se puede hablar de integración de la información en la misma población 92, 93, 103-113.

- b) **HL:** en esta región encontramos una mayor proporción de neuronas que tuvieron sobrelape de actividad (31.9%; ver Figura 8B recuadros negros) en comparación con el NAc (24%; ver Figura 8A recuadros negros). Es importante remarcar la gran proporción de neuronas inactivas en HL, las cuales se modularon en ambos estados conductuales 24.9%(21/84; ver Figura 8B recuadros negros), mientras la activación corresponde a una proporción de tan solo el 7% (6/84 ver Figura 8B porción inferior de ambos recuadros negros). Finalmente el 30%(26/84 only SWS Fig. 8B) se

inactivó exclusivamente durante el sueño de ondas lentas contra el 3.5%(3/84 (Fig. 8B recuadro gris) de neuronas que se activaron, entre ambas poblaciones hay diferencias significativas [Chi-square, $p < 0.001$]. Es notorio que tanto en el sueño como en la alimentación encontramos mayor inhibición (Fig. 8B recuadros rojo (alimentación) y gris (sueño)).

- c) **CMA:** a diferencia de las regiones subcorticales registradas en este proyecto, la CMA presentó muy poca actividad de solapamiento (11.4%, Fig.8C recuadros negros) de la cual el 5.9%(26/433) representa inactivación y el 5.7%(25/433) activación, como era de esperarse ya que la CMA es una región efectora del movimiento lingual, las poblaciones en CMA no integran ambos estados conductuales, sino que esta región tiene poblaciones neuronales con actividad evocada especializada a cada estado conductual. En el caso de la modulación en el sueño de ondas lentas (SWS) el 16%(73/433; Only SWS ver Fig. 8C recuadro gris y SWS-on only) fueron moduladas sólo por el sueño de ondas lentas, sin embargo cabe destacar que en esta modulación significativamente prevaleció la inhibición (12%,52/433 vs activación 4.8%,21/433) [Chi-square=35.34, $p < 0.05$]. La Figura 7 muestra dos neuronas, una que se activa (A) y otra que se inactiva (B) pero que no son moduladas durante el sueño de ondas lentas.

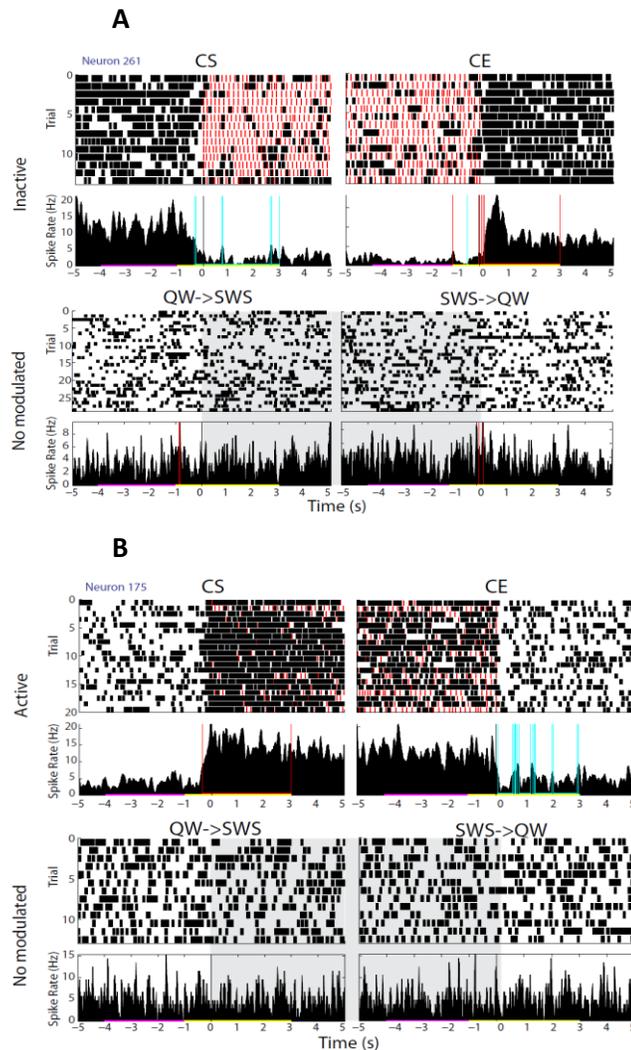


Fig. 7. Representación de dos neuronas de CMA que se modulan selectivamente durante la alimentación y no durante el sueño de ondas lentas. Uno se inactiva (A) y la otra se activa durante la alimentación, puede apreciarse que durante el sueño de ondas lentas no se modula (no modulated), nótese que son las mismas neuronas representadas en la figura 8

d) COF: la COF presentó menor actividad de solapamiento que todas las demás regiones registradas (7.8%, Fig.8D recuadros negros), y al igual que la CMA la proporción de neuronas que se modularon sólo por el sueño fue en su mayoría inactivas (19.2%,63/328, Fig. 8D recuadro gris). La COF difirió significativamente de la CMA, en que esta presentó mayor inactivación neuronal, mientras que la CMA mostró más

activación durante el consumo de ensure [Chi-square test=31.05, $p<0.05$] (2.1%, 7/328; ver Figura 8C y D en los recuadros rojos). En general se puede observar que las regiones corticales no compartieron modulación durante el sueño y la alimentación, sino que presentaron poblaciones que modularon su frecuencia de disparo de forma específica para cada estado conductual, sin embargo es muy claro que las regiones subcorticales si integraron señales provenientes de los circuitos que modulan ambos estados conductuales. En la Figura 8 (NAc, HL, CMA y COF respectivamente), se muestra un histograma de la frecuencia de disparo normalizada (z-score) durante la alimentación y el sueño de ondas lentas, la actividad de todas las neuronas están ordenadas en subcategorías de modulación (como se explica en la Tabla 1). La Tabla 2 y 3, muestra un resumen de la comparación estadística de proporciones (Chi-square test). La Tabla 2 muestra el resumen de la comparación de todas las regiones utilizando la subcategoría de clasificación sin convergencia o solapamiento, y en la Tabla 3 se muestra la comparación respecto a la actividad de convergencia en todas las regiones, en negritas se resaltan las poblaciones que fueron significativamente diferentes a las demás poblaciones. Es claro que el mayor solapamiento de actividad se observó en las regiones subcorticales, tanto en el NAc como en el HL y en COF presentaron mayor inhibición que activación durante la alimentación (Fig. 8A,B,C recuadros rojos), mientras que la CMA tuvo mayor excitación durante la alimentación (Fig. 8D recuadro rojo), sin embargo en todas las regiones registradas presentaron mayor inhibición durante el sueño de ondas lentas y muy poca activación (Fig. 8A,B,C y D recuadros grises), esto sugiere que el estado cerebral del sueño probablemente consista de una inhibición generalizada del cerebro y en el estado de alimentación cada núcleo responda en función de los circuitos locales de forma más heterogénea y compleja.

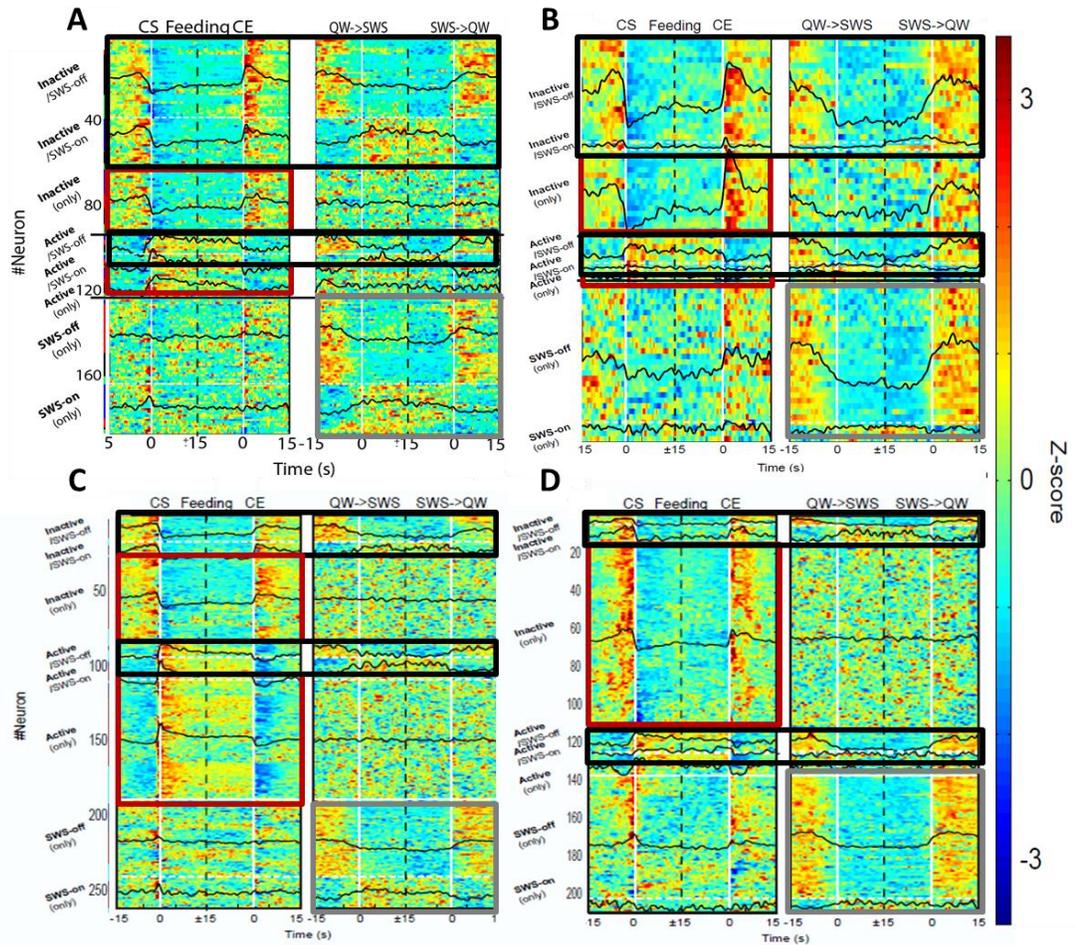


Figura 8. Actividad poblacional de neuronas en NAc (A), HL (B), CMA (C), COF (D), en estas graficas se muestra la frecuencia de disparo (normalizada a Z-score) de las neuronas que se modularon significativamente durante la alimentación, alineadas al inicio de la alimentación (CS) y a la terminación (CE), así como al inicio del sueño de ondas lentas (QW->SWS) y a la finalización (SWS->QW), todas las neuronas fueron clasificadas según su actividad en ambos estados conductuales (tabla 1), en el recuadro negro se resalta la proporción de **“neuronas de convergencia”** en cada región, en rojo la proporción de **“neuronas especializadas”** moduladas por la ingesta en cada región (NAc, HL, COF = inactivadas, en CMA = activadas), en gris se muestra la proporción de **“neuronas especializadas”** al sueño en todas las regiones registradas.

Tabla 2. Comparación estadística de las proporciones en cada región registrada usando la clasificación en función de su actividad de solapamiento (Chi-square, p<0,05)**

Response type	mOFC n = 328	ALM n = 433	LHa n = 84	NAc n = 264	
Neurons modulated by feeding and SWS					
Overlap	Inactive / SWS -off	5/328 (1.5%)	18/433 (4.1%)	20/84 (23.8%) #	39/264(14%)
	Inactive / SWS -on	9/328 (2.7%)	8/433 (1.84%)	1/84 (1.1%)	24/264(9%)*
	Active / SWS -off	11/328 (3.3%)	10/433 (2.3%)	5/84 (5.9%)	9/264(13%)
	Active / SWS -on	1/328 (0.3%)	15/433 (3.4%)	1/84 (1.1%)	6/264(2%)

Tabla 3. Comparación estadística de las proporciones en cada región registrada usando la clasificación en función de su actividad selectiva (Chi-square test, p<0,05)**

Response type	mOFC n = 328	ALM n = 433	LHa n = 84	NAc n = 264	
Neurons selectively modulated by feeding					
No-overlap	Inactive only	96/328 (29.2%)#	59/433 (13.6%)	16/84 (19%) #	31/264(13%) #
	Active only	11/328 (3.3%)	80/433 (18.4%)*	2/84 (2.2%)	15/264(6%)
Neurons selectively modulated by SWS					
SWS off-only	63/328 (19.2%) #	52/433 (12%) #	26/84 (30.9%)**	40/264(15%) #	
SWS on-only	7/328 (2.1%)	21/433 (4.8%)	3/84 (3.5%)	23/264(9%)	

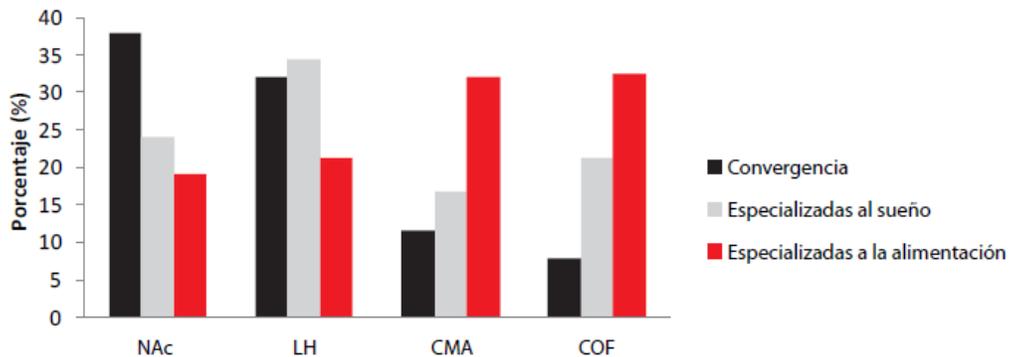


Figura 9: Proporción de neuronas de convergencia (negro), especializadas al sueño (gris) y a la alimentación (rojo).

Discusión

En esta tesis reportamos por primera vez la existencia de “neuronas de convergencia” y “neuronas especializadas” para el sueño y la alimentación. En particular encontramos que las neuronas de convergencia se encuentran de forma predominante en regiones subcorticales principalmente en el HL seguido del NAc Shell (ver Figura 9 barras negras), mientras que las cortezas registradas mostraron la menor proporción de estas neuronas (ver Figura 9 barras negras, CAM y OFC). Finalmente, encontramos que las “neuronas especializadas” para la alimentación se encuentran principalmente en regiones corticales CMA y COF (Figura 9 barras rojas), mientras que las “neuronas especializadas” al sueño fueron encontradas en proporciones similares en las 4 regiones del cerebro, aunque fueron más en el HL (Figura 9 barras grises) y en menor grado en CMA. Estos resultados abren la posibilidad de explicar por qué el sueño y la alimentación a pesar de que no ocurren al mismo tiempo ambos estados están relacionados, incluso a nivel de actividad unitaria. Lo que podría ayudarnos en un futuro a desarrollar nuevas terapias farmacológicas que reduzcan selectivamente el apetito sin afectar al sueño.

Finalmente, también encontramos que el patrón de modulación más común durante el sueño fue el de inhibición, en las cuatro regiones del cerebro, lo que indica que es un estado cerebral aparentemente homogéneo a través del cerebro. Por otra parte el estado de la alimentación es más complejo y moduló a cada región del cerebro de forma más específica. Por ejemplo, la gran mayoría de las neuronas del NAc, el HL y de la COF mostraron actividad anticipatoria antes o inhibición durante del periodo de alimentación, mientras que la corteza motora, CMA, fue la única región que mostró principalmente

activación durante la alimentación (ver Fig. 8). Quizá esta actividad se deba a que la CMA controla el movimiento de la lengua, lo cual concuerda con la activación observada en este proyecto.

De acuerdo a lo esperado basados en los trabajos de Howard Fields, nuestros resultados confirmaron que una gran cantidad de neuronas del NAc se inactivaron durante la alimentación, pero demostraron por primera vez que una gran proporción de las neuronas que se modularon con la alimentación también se modularon durante el sueño (“neuronas de convergencia”). Basados en este resultado proponemos en esta tesis que el NAc es un nodo de integración de información de las redes neuronales que modulan el sueño y la alimentación. Este es un resultado inesperado ya que a pesar de que existe una gran evidencia de que el NAc es importante para la alimentación existen muy pocos trabajos que relacionen al NAc con el sueño.

En verdad anteriormente se había demostrado que la inactivación farmacológica de este núcleo hace que los animales saciados se alimenten de más ^{43, 46}, lo que concuerda con nuestros resultados, sin embargo la hipótesis de compuerta (ver introducción) también propone que la inhibición del NAc debería de activar al HL²⁷, generando un circuito que sirve de compuerta para la alimentación, esto está basado en que el NAc y el HL proyectan y se modulan recíprocamente⁴¹. Nuestros datos no confirmaron esta predicción pues durante la alimentación la mayoría de las neuronas del HL se inhibieron lo que sugiere que la comunicación NAc-HL no parece estar mediada por un es un circuito simple (o lineal), dado que el HL también se inhibe durante el estado de alimentación. Es probable que el circuito que estamos registrando sea un circuito local y su inactivación generará la activación de otra parte del HL (la cual no registramos) y que en teoría propiciaría el

consumo de alimentos. También es posible que las neuronas que estamos registrando no sean las que son moduladas por las proyecciones que vienen del NAc, y tal vez sean interneuronas del HL que modulan circuitos locales independientes del circuito NAc-HL. Aunque esta posibilidad es poco probable ya que los electrodos fueron implantados precisamente en la región que anatómicamente se ha demostrado que envía axones directamente al HL ²⁷.

Por otro lado la discrepancia entre nuestros registros y lo esperado por la bibliografía, denota el hecho de que hay diferencias entre lo propuesto utilizando técnicas de biología celular y anatomía para determinar circuitos²⁷ y la fisiología funcional. Por esta razón es importante determinar si los circuitos propuestos son fisiológicamente relevantes. De cualquier forma nuestros resultados indican que la inactivación neuronal en HL normalmente ocurre durante ambos estados conductuales y por tanto el HL debe de ser al igual que el NAc un nodo integrador de las redes neuronales del sueño y de la alimentación.

El HL recibe información del estado homeostático de las neuronas del arcuato ³², pero también recibe proyecciones del NAc las cuales se piensa son importantes para generar la alimentación^{32, 41}. En relación al circuito del sueño; las neuronas que modulan el sueño y la alimentación como las Hcrt+ y las MCH+ también están modulando al sistema de recompensa y al NAc. A pesar de que en este momento no es posible entender la relación causal que la inactivación del HL pudiera jugar tanto en el sueño como en la alimentación, nuestros correlatos neuronales sugieren que esta inactivación podría tener un papel importante para integrar información de ambos estados. Finalmente, es interesante remarcar que el HL fue la región registrada con la mayor proporción de “neuronas especializadas” para el sueño, lo que concuerda con el papel fundamental que se le ha atribuido en la regulación de esta conducta⁴¹.

Es importante resaltar que una desventaja del registro extracelular es que no puede determinar con 100% de certeza qué tipo de neuronas está registrando, sólo se podría hacer una clasificación putativa, sin embargo; sería ideal confirmar en un futuro con técnicas de biología celular y molecular qué neuronas estamos registrando. Por ejemplo, estudios futuros usando la técnica llamada “optogenetic tagging” o marcaje optogenético de distintos tipos celulares en combinación con nuestros registros multielectrodo podrían ayudarnos a identificar si las neuronas Hcrt+ o MCH+ del HL están siendo inactivas o activas durante la alimentación y el sueño.

Comparando la actividad de estas regiones subcorticales con las regiones corticales registradas, es claro que en la corteza cerebral hay pocas neuronas de convergencia y más neuronas especializadas para cada conducta (en especial neuronas relacionadas a la alimentación ver Figura 9), en CMA hay una gran proporción de neuronas que se activan durante la alimentación y no se modulan en el sueño de ondas lentas, en COF hay una gran proporción de neuronas que se inactivan durante la alimentación sin modularse en el sueño de ondas lentas. Adicionalmente la modulación neuronal en la corteza durante la alimentación es opuesta en ambas cortezas, pese a que estas cortezas son muy cercanas y están separadas por algunos milímetros, no obstante la dinámica de actividad neuronal es diferente. Aunque de alguna forma es esperado que la CMA tenga poblaciones selectivas a los procesos motores de la alimentación, ya que la inactivación de esta región produce que el lengüeteo no se pueda llevar a cabo en ratones ^{71, 72}. Sin embargo, en la COF no se había determinado si había poblaciones que compartieran modulación en ambos estados conductuales, aunque si se había propuesto que la COF se modulaba con el sueño de ondas lentas ⁹⁶, es muy interesante que exista modulación especializada de las cortezas en ambos

estados conductuales, cuando la rata transita a un estado conductual de sueño o alimentación la actividad neuronal de cada corteza mantiene una conducta específica. También resulta interesante que la modulación cortical durante el sueño de ondas lentas sea similar para ambas cortezas, es decir en el caso del sueño se produce una inhibición generalizada de las regiones corticales e incluso de las regiones subcorticales en las que también hubo mayor inhibición. Otro aspecto que llama la atención es que ambas cortezas se modularon de forma similar durante el sueño de ondas lentas, e incluso las regiones subcorticales también presentaron mayor inhibición, por lo que es probable que el estado de sueño sea un estado cerebral generalizado homogéneo, cabe destacar que el HL fue significativamente diferente a las demás regiones durante el sueño de ondas lentas, esto es de esperarse ya que el hipotálamo lateral es parte del circuito sueño-vigilia⁴¹.

Como era de esperarse la corteza motora tiene neuronas que se activan específicamente durante la conducta motora de alimentación. La CMA es la única región del cerebro que proyecta directamente a centros reguladores de conductas motoras¹²⁹, más aún se sabe que la corteza motora anterolateral proyecta casi directamente a nervios periféricos que modulan la conducta del lengüeteo, de allí que esperábamos una pequeña proporción de neuronas que tuvieran convergencia (Tabla 2), esta corteza presenta una gran proporción de “neuronas especializadas” en el movimiento lingual y en menor grado en el sueño, para comprobar si esta especialización era propia de la corteza motora, registramos la actividad neuronal en la COF, de la cual se ha descrito que se modula tanto en el sueño como en la alimentación. Pese a que esta corteza participa en el circuito de recompensa⁵², en la toma de decisiones y en la expectancia por un alimento⁵⁴, la COF también presentó una pequeña proporción de neuronas de convergencia y una mayor proporción de neuronas

especializadas para el sueño y la alimentación, por lo que sugerimos por primera vez que la especialización de las neuronas corticales parece ser una propiedad cortical que probablemente se mantiene de una conducta u otra.

Conclusión

Creemos que el descubrimiento de las “neuronas de convergencia y especializadas” descritas por primera vez en esta tesis, abre la posibilidad de en un futuro desarrollar mejores tratamientos farmacológicos que actúen de forma específica en estas neuronas para disminuir el apetito sin producir efectos secundarios indeseados en el sueño, como lo es el insomnio. Asimismo resalta la importancia de considerar a la higiene del sueño como una variable más que se debe de controlar para combatir la epidemia actual de obesidad.

Introducción (segundo proyecto)

En el proyecto 1 de esta tesis demostramos que hay un grupo de neuronas en el NAc que se modula con el consumo de ensure, unas neuronas que se activan y otras que se inactivan en esta parte nos preguntamos pero ¿qué modula la actividad neuronal del NAc? el componente hedónico o el motor.

El NAc es un nodo integrador de funciones cerebrales, integra circuitos de enlace cortical así como subcorticales, algunos de estos circuitos procesan aspectos sensoriales de los alimentos, otros son sistemas efectores conductuales que modulan los elementos motores de la alimentación^{5, 33, 41, 43}. En relación a la organización funcional de las neuronas del NAc se han propuesto dos teorías generales acerca de la integración de señales de las redes de alimentación:

A) Neuronas aferentes que modulan patrones motores de alimentación, expresan GABA e influyen directamente sobre el HL

En la década de los 80's se propuso que el NAc está estrechamente relacionado a regiones del sistema nervioso que modulan la conducta motora voluntaria, se propuso que el NAc traduce sensaciones y emociones en respuestas motoras³³.

En relación a la alimentación, el grupo de Howard Fields en el 2010 (Krause et. al. 2010), propuso que el NAc modula la conducta motora de alimentación (lengüeteo), ellos encontraron dos tipos de respuestas neuronales, unas neuronas incrementan su frecuencia de disparo (tipo 2) y otras lo disminuyen (tipo 1) durante el consumo de sacarosa, ellos demostraron que las neuronas tipo 1 son necesarias para que se genere la conducta del

lengüeteo, estas neuronas al ser inactivadas sirven como una “compuerta” de entrada para que la conducta motora de ingesta ocurra, cuando estimulan eléctricamente al NAc, el lengüeteo se detiene o simplemente no se puede llevar a cabo. En estudios previos se encontró que la inhibición farmacológica (con Muscimol agonista de los receptores tipo GABA A) de las neuronas en el NAc incrementa en una manera dosis dependiente la conducta de ingesta, en animales saciados ⁴³. Lo que indica que al inhibir la actividad de este núcleo se incrementa el consumo de alimentos, mientras que al activarlo (artificialmente con estimulación eléctrica) se inhibe la alimentación.

Lo anterior explica porque el circuito aferente del NAc shell está organizado para modular sistemas motores en dos distintas vías:

Primero el NAc Shell envía proyecciones al pálido ventral ^{32, 44, 45}, estas conexiones transmiten información desde el accumbens a aferencias tálamo-corticales que eventualmente inciden sobre sistemas motores voluntarios, se ha postulado que estas proyecciones son inhibitorias, son neuronas SPN que expresan el receptor a dopamina D1 y son activadas durante el lengüeteo (tipo 2 de acuerdo a la clasificación de Krause)⁴⁶, esta activación en principio generaría una desinhibición de la inhibición que va desde el pálido ventral hacia el HL, esto produce la activación del HL y permite la conducta del lengüeteo ²⁷.

Segundo el NAc proyecta directamente al HL, estas proyecciones son inhibitorias, algunos han postulado que estas proyecciones son de neuronas SPN que expresan el receptor a dopamina D2 ²⁷, estas neuronas se inactivan durante el lengüeteo (probablemente las neuronas tipo 2 descritas por Krause) ⁴⁶, la inactivación de estas neuronas resultaría en la modulación del HL lo cual generaría la conducta del lengüeteo.

Lo anterior sustenta la posibilidad de que estas eferencias del NAc estén estrechamente relacionadas a la parte motora de la conducta de alimentación ^{33, 43, 50, 51}.

B) Neuronas que median el impacto hedónico de los alimentos altamente palatables (azúcar/grasa):

Por otra parte el grupo de Regina Carelli y Roitman han propuesto que en el NAc hay neuronas que de forma innata pueden ser moduladas por el valor hedónico de estímulos gustativos ¹³⁰, específicamente ellos proponen que los alimentos palatables (aceptables) o aversivos modulan diferencialmente la actividad de las neuronas en el NAc, es decir, una misma neurona puede incrementar su frecuencia de disparo cuando la rata recibe sacarosa y disminuirla cuando recibe quinina, de tal forma que se propone que el NAc modula su actividad neuronal de forma innata en función al valor hedónico de los estímulos gustativos^{26, 45, 130-133}, sin embargo como mencionamos anteriormente otros trabajos han demostrado que la modulación neuronal de este núcleo está relacionada a los aspectos motores de la alimentación³³, incluso se sabe y se propone que las ratas tienen diferencias oro-motoras cuando reciben un alimento palatable y uno aversivo^{132, 133}, por lo que es probable que las diferencias en la actividad neuronal se deban a aspectos motores y no al valor hedónico de los estímulos gustativos ⁴⁶. La segunda parte de este proyecto de doctorado, trata precisamente sobre la integración de señales pero ahora sensoriales de los alimentos por neuronas del NAc, por tal motivo nos dimos a la tarea de diseñar una novedosa tarea conductual que nos permitiera medir el valor hedónico de estímulos gustativos para abordar esta pregunta ¹³⁴. En esta tesis proponemos que la actividad neuronal del NAc durante el consumo de alimentos es modulada principalmente por el componente motor de la alimentación.

Planteamiento del problema

¿Cuál elemento de la conducta de ingesta modula la actividad neuronal del NAc?

Cuando los mamíferos consumen un alimento aceptable como la sacarosa, dan una respuesta motora estereotipada (licking), caracterizada por la protrusión de la lengua y el movimiento de consumo por los músculos masticatorios, sin embargo; cuando reciben un alimento aversivo tienen una conducta motora de rechazo (gape), caracterizada por la apertura de la boca y la expulsión del alimento¹³², se ha propuesto que el NAc recibe la información sensorial desde el sistema gustativo periférico y genera una respuesta motora, esta información de los estímulos gustativos son integrados en el NAc con una característica hedónica: o es aceptable o debe rechazarse, se ha puesto a discusión si es la codificación de la entrada sensorial al NAc (valor hedónico) o la salida que controla los aspectos motores la que lo modula, para responder esta pregunta diseñamos una tarea que nos permitiera separar los elementos motores y hedónicos de la alimentación para estudiar la actividad neuronal del NAc en esta integración de señales sensoriales, hedónicas y motoras.

Hipótesis

Basados en que el NAc es un núcleo de entrada (de información emocional) y de salida (a núcleos motores), que integra diferentes circuitos que modulan la conducta de ingesta, proponemos que esta región es modulada por la conducta oro-motora de ingesta y no solamente por componentes sensoriales ni hedónicos evocados por los sabores.

Objetivo general

El objetivo de esta segunda parte de mi tesis fue determinar si la actividad del NAc es modulada por el componente hedónico de los alimentos o por el componente oro-motor asociado a la conducta de ingesta.

Objetivos Específicos

1. Proponer una tarea conductual que nos permita separar los elementos del proceso de alimentación, como la parte motora, la percepción gustativa y el procesamiento hedónico.
2. Registrar la actividad neuronal en el NAc y demostrar cuál de estos elementos de la conducta de ingesta es responsable de la modulación de la actividad del NAc.

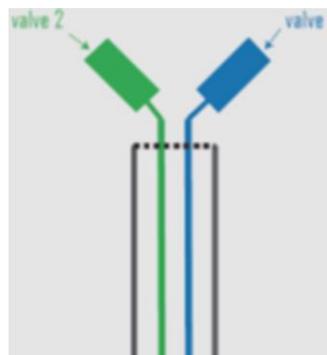
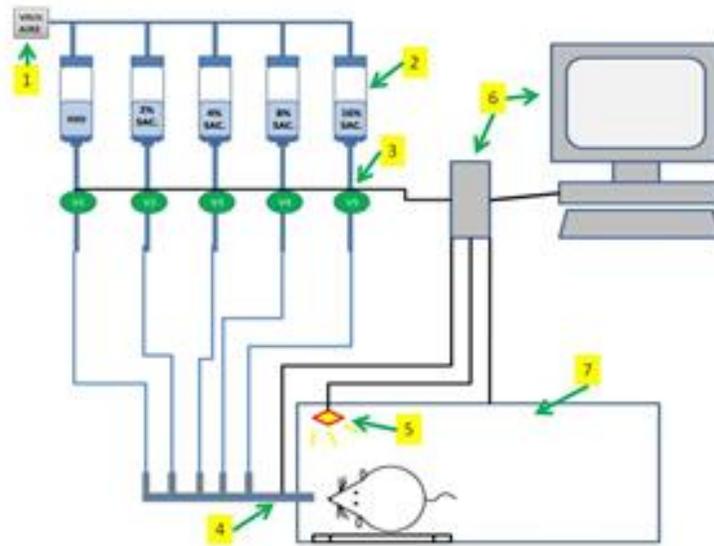
Materiales y métodos

I. Sistema conductual para estudiar elementos hedónicos de la percepción gustativa:

El sistema conductual (Fig. 10) tiene como ventaja en primer lugar utilizar ratas en libre movimiento como modelos de estudio, utilizar el lengüeteo como respuesta y registrarlo vía software, controlar la cantidad de estímulo dado, utilizar más de una concentración simultáneamente y registrar el tiempo de lengüeteo en relación a la liberación del líquido.

Figura 10
Características:

- 1.-Válvula de aire para regular la presión y velocidad de liberación del sabor
- 2.-Contenedores.
- 3.-Válvulas que regulan la salida de sacarosa desde un software.
- 4.-lickómetro
- 5.-luz de jaula
- 6.-computadora y transductor para registrar lengüeteos y regular la salida de líquido previa programación.
- 7.-caja de Skinner



II. Descripción del bebedero

El bebedero consta de vías independientes que se conectan a las válvulas por medio de mangueras de silicón, no hay mezcla de sabores ni espacios muertos, cada tubo dentro del bebedero tiene un calibre de 20G, todos son de acero y al fabricarlas procuramos que tengan la misma longitud (Fig.11)

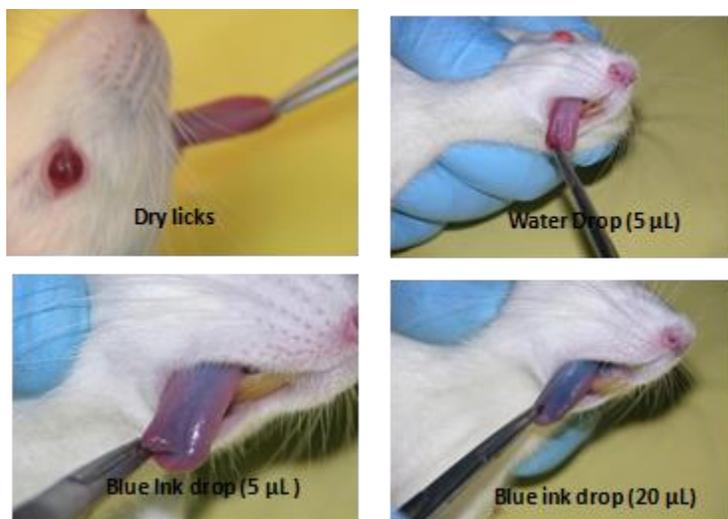


Figura 12. Validación del sistema de liberación de sabores

III. Sistema de liberación de sabores.

Para comprobar la funcionalidad del sistema conductual se diseñó un experimento en el cual se podían liberar diferentes estímulos gustativos sin mezcla de sabores y directamente a la parte dorsal de la lengua. Los sabores son liberados bajo presión de aire lo cual reduce la probabilidad de que el líquido permanezca en la punta del bebedero. Usando este

bebedero, la lengua limpia perfectamente el bebedero en un lengüeteo, dejando menos de 1 μ L de líquido, el cual puede ser removido completamente en un segundo lengüeteo. Se utilizaron tubos por separado para liberar cada sabor, de tal forma que el bebedero no tuvo espacios muertos y prácticamente no mezcla de sabores. La Fig. 12 muestra la lengua de cuatro ratas anestesiadas que lengüetearon en el mismo bebedero. El bebedero estaba lleno con agua y azul de metileno. A la izquierda una rata lengüeteó 200 veces el tubo seco ya que no se liberó ninguna gota. Se observó que el lengüetear el tubo, el sabor no se escapaba por capilaridad. A la derecha la rata recibió una gota de 5 μ L de agua y no se observa tinción lingual, demostrando que diferentes sabores pueden ser liberados sin mezclarse. En las fotografías inferiores se liberaron 5 μ L y 20 μ L de azul de metileno, respectivamente. En ambos casos la parte dorsal de la lengua fue marcada pero la gota de 20 μ L cubrió la lengua entera.

IV. Lick reaction task, tarea de reacción del lengüeteo

Se muestra un diagrama esquemático de esta tarea en la Figura 13 donde una luz indica el inicio del ensayo con un lengüeteo en el puerto central vacío en el cual recibirá como señal de stop una gota 10 microlitros de agua (o de otros sabores) liberados al azar entre

los ciclos 2-4 del lengüeteo. Para los ensayos en los cuales se usaron dos o más señales de stop fueron liberados al azar para evitar la anticipación de los animales. Después de terminar el lengüeteo en el puerto central, la rata podría moverse al puerto lateral para recibir su recompensa predeterminada.

La recompensa siguió un protocolo de reforzamiento en gradual el número más grande de lengüeteos adicionales en el puerto central y en el más pequeño la recompensa (Fig. 13). Una computadora registró automáticamente los lengüeteos adicionales y la recompensa correspondiente fue liberada en los puertos laterales. La recompensa más grande fue siempre obtenida si después de la señal de stop la rata detenía el lengüeteo inmediatamente (lengüeteos adicionales, ALs= 0); la segunda recompensa intermedia fue obtenida en ALs=1. Finalmente, la recompensa más pequeña (o sin recompensa) fue obtenida si se registraban dos o más lengüeteos adicionales. Para completar una prueba, las ratas tuvieron que lengüetear una vez en el puerto lateral. Inmediatamente después de liberar la última recompensa se apagaba la luz y se volvía a encender 500 ms después para indicar el final de la prueba del intervalo entre ensayos y el comienzo del nuevo ensayo. Todos los ensayos fueron de 30 minutos todos los animales eran libres de iniciar los ensayos como ellos deseaban (economía abierta). Para eliminar sesiones en las cuales los animales no estaban lo suficientemente motivados para trabajar se eligió un criterio mínimo de 40 ensayos/sesiones. Aunque esto sucedió en 13% (33/254) de las sesiones, la inclusión de estas sesiones en el reporte de datos no influyó en los resultados reportados ¹³⁴.

V. Lengüeteos adicionales en el puerto central

En todos los experimentos, un índice de tiempo de reacción para detener el lengüeteo fue medido como la diferencia de tiempo entre la señal de stop y el último lengüeteo en el puerto central que ocurría justo antes de que el animal retire la cabeza. En este intervalo se midieron los lengüeteos adicionales. Los lengüeteos adicionales de todos los sujetos y todas las sesiones se colapsaron y el estimado de Kaplan-Meier de las funciones de distribución acumulativa empírica (CDFs) fueron calculadas. Para cada CDF, se emplearon la mediana y el rango intercuartile (IQR) para describir las propiedades de distribución de los lengüeteos adicionales.

La mediana corresponde al punto 0.5 de CDF donde el IQR es la diferencia entre el 75 y 25 %. A menos que se indique lo contrario, los datos se presentan como la mediana y el IQR.

Se obtuvo la diferencia estadística entre dos distribuciones con el test de dos muestras de Kolmogorov-Smirnov y para tres o más distribuciones se utilizó el test de Kruskal-Wallis y el Bonferroni post hoc test.

Resultados

I. Caracterización conductual (Lick reaction task (LRT)):

Como ya se dijo en la introducción, una de las propiedades que se ha sugerido que las neuronas del NAc tienen, es que una proporción de ellas puede modularse por componentes hedónicos de los alimentos, sobre todo por alimentos altamente palatables^{26, 45, 130-133}, sin embargo cuando se comenzó a proponer que el NAc se inhibía para dar inicio al proceso de alimentación, la actividad del NAc se relacionó en gran parte a los componentes motores de la alimentación^{33, 46, 135}, nosotros en este proyecto propusimos una tarea conductual para responder como el NAc se modulaba por diferentes elementos de la conducta de ingesta¹³⁴, esta tarea conductuales (Lick Reaction Task; LRT) la usamos para ver si las neuronas del NAc se modulan por el componente hedónico o motor de la alimentación.

Como ya mencionamos uno de los problemas al estudiar las respuestas hedónicas es la confusión que se genera a partir de las diferencias motoras generadas por el componente hedónico de la alimentación^{46, 130, 132-134, 136, 137}. Utilizando esta tarea conductual (ver métodos) caracterizamos conductualmente las respuestas hedónicas a estímulos gustativos.

II. Recompensa gradual a la reacción del lengüeteo después de recibir una gota:

El principal propósito de este experimento fue detener el lengüeteo inmediatamente después que la rata recibió un estímulo (una gota de agua), de esta manera podíamos ver las respuestas neuronales inmediatamente después de recibir el estímulo sin tener influencia

del componente motor como había pasado anteriormente en otros experimentos^{130, 136, 137}, usamos el número de lengüeteos adicionales (posteriores al estímulo) como un índice de detección del estímulo gustativo (Figura 13). Estos lengüeteos adicionales fueron recompensados gradualmente (ver métodos IV), a menor número de lengüeteos mayor recompensa, y si la rata no lengüeteaba después de recibir una gota de un estímulo gustativo recibió la mejor recompensa (3 gotas de sacarosa al 20%, gotas en rojo).

En este experimento usamos diferentes fases de entrenamiento (ver Figura 14 y Métodos IV), en la última condición la rata recibió recompensa sólo si daba 2 lengüeteos adicionales, con este experimento fue claro que los animales no podían maximizar sus recompensas, es decir no podían dejar de lengüetear o lo hicieron muy pocas veces, por lo que concluimos que el lengüeteo (consumatorio) evoca un reflejo producido por la estimulación somatosensorial ya que en este experimento utilizamos agua como estímulo gustativo, en otras palabras, la gota de agua produce una serie de lengüeteos adicionales que no pueden ser controlados por la rata. Para asegurarnos que la gota de agua era la que generaba estos lengüeteos adicionales en una sesión quitamos el estímulo y dejamos que la rata lengüeteara en seco (sin recibir gota de agua) la rata dejaba de lengüetear cuando ella deseaba sin recibir estímulo o señal de paro (stop signal), usamos la condición en la que a menor número de lengüeteos mayor recompensa, sorprendentemente las ratas dejaron de lengüetear para maximizar sus recompensas, al volver a darle gotas de agua las ratas volvieron a responder en reflejo al estímulo gustativo, por lo que corroboramos que las ratas responden con un reflejo después de recibir un estímulo gustativo, este reflejo puede ser modulado por el volumen de la gota (Figura 15) y por el valor hedónico del estímulo (Figura 16).

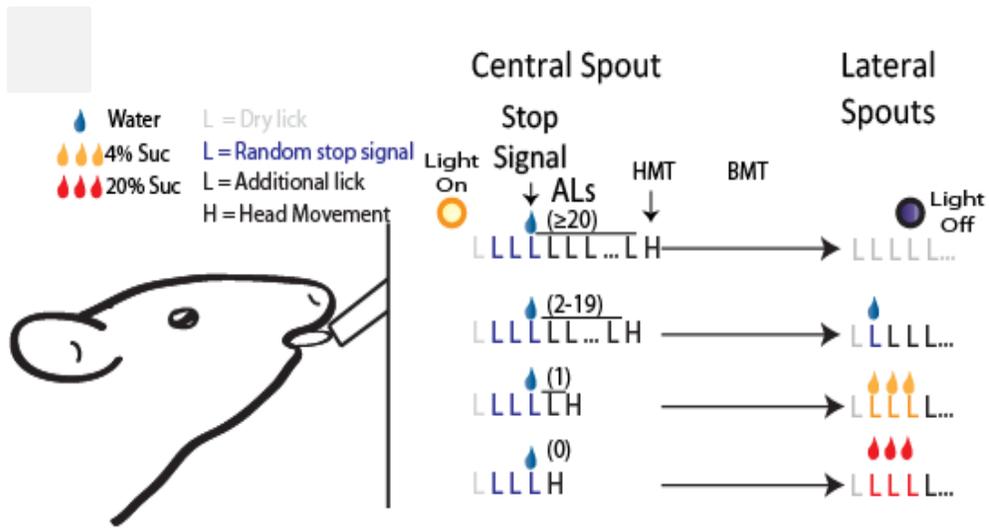
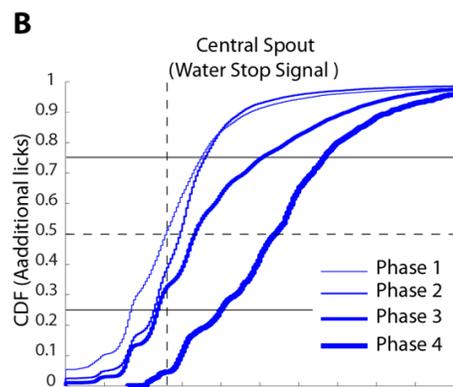
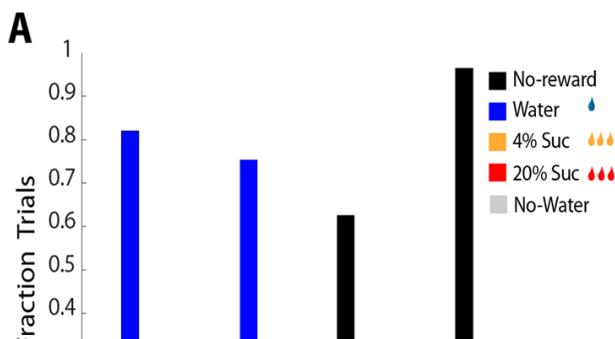
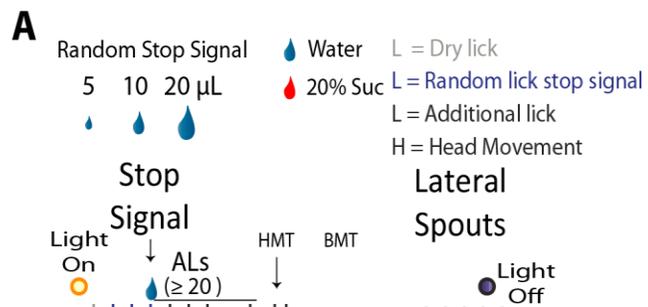


Figura 13 Tarea de reacción al lengüeteo

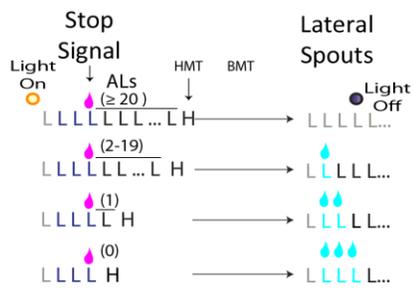




A

Exp	Random Stop Signal
1	W 20% Suc QHCl(0.3mM)
2	W 20% Suc QHCl(2 mM)

L = Dry lick
L = Random lick stop signal
L = Additional lick
Reward 20% Suc



B



D



III. Las neuronas del NAc son moduladas por el componente motor y no por el estímulo hedónico

Utilizando esta tarea conductual LRT, registramos la actividad neuronal de 241 neuronas en NAc, utilizamos como estímulos gustativos: 2 hedónicamente neutros (agua y

1 mM de NaCl), un estímulo palatable (sacarosa al 20%) y otro aversivo (quinina 0.3 mM). En la Figura 16 se puede apreciar un grafica tipo raster, los ensayos fueron ordenados en número de lengüeteos adicionales de menor a mayor (de arriba hacia abajo) y en grupos de ensayos en los que recibió agua (azul), NaCl (verde), sacarosa (cian) y quinina (negro), las marcas negras representan los potenciales de acción de una neurona de NAc y las marcas rojas representan los lengüeteos. En la Figura 18, se muestra en diferentes colores, el promedio en la frecuencia de disparo de una neurona, cada color está asociado a los ensayos en los que recibió un estímulo específico. Claramente puede apreciarse que la misma neurona se modula de diferente forma dependiendo el estímulo que recibió, en rojo la línea punteada simboliza el lengüeteo, y en color (según el estímulo que la rata recibió) se graficó la función de densidad acumulada (cdf, ver métodos) (Fig. 17 y 18) de lengüeteos adicionales, el cdf muestra que los lengüeteos para cada sabor son diferentes, la actividad neuronal es diferente en cada caso, en todos los casos si una neurona se inhibe con el lengüeteo (Wicolxon test, $p < 0.05$) no presenta cambios en la frecuencia de disparo en el momento que recibió la gota del sabor, lo cual demuestra que la actividad neuronal del NAc no es modulada por el sabor, también demuestra que la actividad neuronal es diferente para sacarosa y quinina después del tren de lengüeteos (Wicolxon test, $p < 0.05$), en estos casos, para sacarosa y para quinina la conducta de lengüeteo es muy diferente e incluso opuesta, la neurona se inhibe por más tiempo durante la sacarosa y menos tiempo durante la quinina, probablemente esta diferencia en el tiempo de inhibición genera una respuesta neuronal diferente, posterior a la conducta del lengüeteo. En el caso de los experimentos que proponen que las neuronas del NAc se modulan diferencialmente para estímulos hedónicamente positivos o negativos, sin embargo estos experimentos no controlan las diferencias oro-motoras que se observan al beber un sabor palatable (sacarosa)

o al beber un sabor aversivo (quinina)¹³⁷, la cual claramente es diferente para cada caso, y se han determinado respuestas específicas a estímulos hedónicamente positivos o aversivos^{132, 133}.

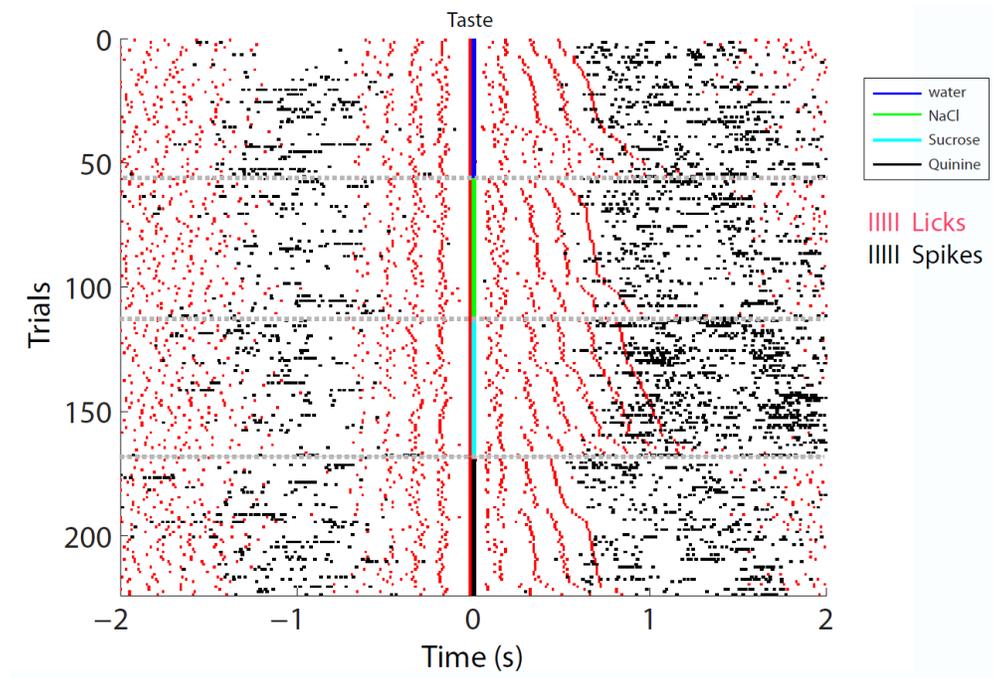
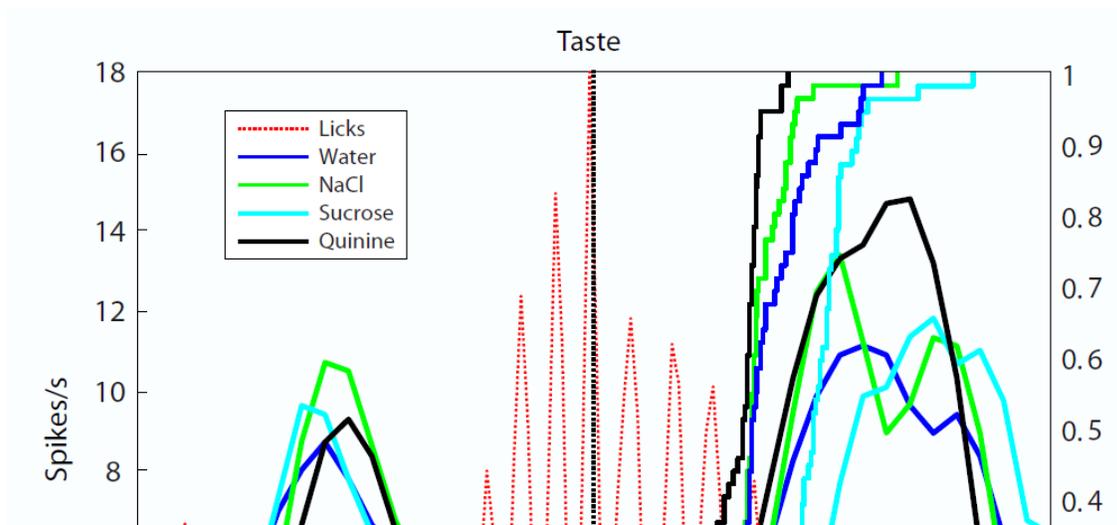


Fig. 17 Raster plot de una sesión de registro en NAc durante LRT, los ensayos en función al tiempo y ordenados según el estímulo que fue dado, las marcas rojas son los lengüeteos y las marcas en negro los potenciales de acción.



Discusión

Nuestros datos demuestran que las modulaciones neuronales que presenta el NAc durante la conducta de ingesta se deben a la conducta motora de la alimentación, lo anterior corrobora su función integradora, ya que otras regiones que codifican la percepción

gustativa y la palatabilidad de los alimentos, se sabe que la corteza gustativa primaria codifica diferencialmente los sabores hedónicamente positivos y aversivos¹³⁵, esta región cortical envía eferentes al NAc, también se sabe que regiones del tallo cerebral que se propone modulan elementos de palatabilidad de los alimentos proyectan directamente al NAc^{118, 135}, y finalmente el NAc envía proyecciones de salida relacionadas a la modulación motora^{33, 43, 46}, diversos experimentos han demostrado que el consumo de sacarosa puede ser detenido al estimular eléctricamente este núcleo⁴⁶. Todas estas evidencia sugieren que la modulación de las neuronas del NAc no está relacionada únicamente a integrar información de las cualidades sensoriales de los alimentos, sino más bien responde al componente motor del lengüeteo y a los elementos motores relacionados al consumo de alimentos.

Conclusiones generales

En esta tesis primeramente demostramos que el NAc y el HL son nodos de integración de información de las redes que modulan el sueño y la alimentación. Por otra parte, las regiones corticales tienen poblaciones especializadas principalmente a la alimentación y en

menor grado al sueño, lo cual podría ayudar a mantener cada estado conductual de forma específica.

Finalmente en la segunda parte de esta tesis demostramos que la actividad de las neuronas en el núcleo accumbens es modulada por el componente motor de la alimentación y no por el valor hedónico de los alimentos.

Bibliografía

1. Tolkamp BJ, Allcroft DJ, Barrio JP, et al. The temporal structure of feeding behavior. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2011;301:R378-393.
2. Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends in neurosciences* 2007;30:375-381.
3. Yoshimatsu H. [Perspective of the obesity treatment based on the regulatory mechanism of feeding behavior and energy metabolism]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 2011;69 Suppl 1:692-699.
4. Baldo BA, Pratt WE, Will MJ, Hanlon EC, Bakshi VP, Cador M. Principles of motivation revealed by the diverse functions of neuropharmacological and neuroanatomical substrates underlying feeding behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2013.
5. Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron* 2011;69:664-679.
6. Randall PA, Pardo M, Nunes EJ, et al. Dopaminergic modulation of effort-related choice behavior as assessed by a progressive ratio chow feeding choice task: pharmacological studies and the role of individual differences. *PLoS one* 2012;7:e47934.
7. Zhan C, Zhou J, Feng Q, et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013;33:3624-3632.
8. Penicaud L, Meillon S, Brondel L. Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* 2012;94:2069-2074.
9. Volkoff H. The effects of amphetamine injections on feeding behavior and the brain expression of orexin, CART, tyrosine hydroxylase (TH) and thyrotropin releasing hormone (TRH) in goldfish (*Carassius auratus*). *Fish physiology and biochemistry* 2012.
10. Rojas JM, Stafford JM, Saadat S, Printz RL, Beck-Sickinger AG, Niswender KD. Central nervous system neuropeptide Y signaling via the Y1 receptor partially dissociates feeding behavior from lipoprotein metabolism in lean rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2012;303:E1479-1488.
11. Cai XJ, Evans ML, Lister CA, et al. Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes* 2001;50:105-112.
12. Grill HJ. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity* 2006;14 Suppl 5:216S-221S.
13. Haan N, Goodman T, Najdi-Samiei A, et al. Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013;33:6170-6180.
14. Stevenson JA. The Hypothalamus in the Regulation of Energy and Water Balance. *The Physiologist* 1964;99:305-318.
15. Zeeni N, Chaumontet C, Moyse E, et al. A positive change in energy balance modulates TrkB expression in the hypothalamus and nodose ganglia of rats. *Brain research* 2009;1289:49-55.
16. Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 2010;44:133-138.
17. Akabayashi A, Wahlestedt C, Alexander JT, Leibowitz SF. Specific inhibition of endogenous neuropeptide Y synthesis in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses feeding behavior and insulin secretion. *Brain research Molecular brain research* 1994;21:55-61.
18. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature medicine* 2007;13:803-811.
19. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004;24:2797-2805.
20. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience* 2011;14:351-355.
21. Sternson SM, Nicholas Betley J, Cao ZF. Neural circuits and motivational processes for hunger. *Current opinion in neurobiology* 2013;23:353-360.
22. Williams KW, Margatho LO, Lee CE, et al. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010;30:2472-2479.
23. Ferssiwi A, Cardo B, Vellely L. Gustatory preference-aversion thresholds are increased by ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus in the rat. *Brain research* 1987;437:142-150.
24. Touzani K, Vellely L. Ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus increases preference and aversion thresholds for saccharin and alters the morphine modulation of taste. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1990;36:585-591.

25. Sahu A. Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. *Brain research* 2002;944:232-238.
26. Choi DL, Davis JF, Magrison JJ, Fitzgerald ME, Lipton JW, Benoit SC. Orexin signaling in the paraventricular thalamic nucleus modulates mesolimbic dopamine and hedonic feeding in the rat. *Neuroscience* 2012;210:243-248.
27. Frazier CR, Mrejeru A. Predicted effects of a pause in D1 and D2 medium spiny neurons during feeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010;30:9964-9966.
28. Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*;13:635-641.
29. Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science* 2008;322:449-452.
30. Hernandez L, Hoebel BG. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life sciences* 1988;42:1705-1712.
31. Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, et al. Phasic Firing in Dopaminergic Neurons Is Sufficient for Behavioral Conditioning. *Science* 2009;324:1080-1084.
32. Stratford TR, Wirtshafter D. Evidence that the nucleus accumbens shell, ventral pallidum, and lateral hypothalamus are components of a lateralized feeding circuit. *Behavioural brain research* 2012;226:548-554.
33. Mogenson GJ, Swanson LW, Wu M. Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1983;3:189-202.
34. Baldo BA, Sadeghian K, Basso AM, Kelley AE. Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behavioural brain research* 2002;137:165-177.
35. Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:185-215.
36. Zhang M, Balmadrid C, Kelley AE. Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. *Behavioral neuroscience* 2003;117:202-211.
37. Brown MT, Tan KR, O'Connor EC, Nikonenko I, Muller D, Luscher C. Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to enhance associative learning. *Nature* 2012;492:452-456.
38. Szczycka MS, Kwok K, Brot MD, et al. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 2001;30:819-828.
39. Szczycka MS, Rainey MA, Kim DS, et al. Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:12138-12143.
40. Cannon CM, Abdallah L, Tecott LH, Durrant MJ, Palmiter RD. Dysregulation of striatal dopamine signaling by amphetamine inhibits feeding by hungry mice. *Neuron* 2004;44:509-520.
41. Gutierrez R, Lobo MK, Zhang F, de Lecea L. Neural integration of reward, arousal, and feeding: Recruitment of VTA, lateral hypothalamus, and ventral striatal neurons. *IUBMB life* 2011;63:824-830.
42. Zhang XY, Yang HD, Zhang Q, Wang Z, Wang DH. Increased feeding and food hoarding following food deprivation are associated with activation of dopamine and orexin neurons in male Brandt's voles. *PloS one* 2011;6:e26408.
43. Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology & behavior* 2005;86:773-795.
44. Simmons WK, Rapuano KM, Ingeholm JE, et al. The ventral pallidum and orbitofrontal cortex support food pleasantness inferences. *Brain structure & function* 2013.
45. Smith KS, Berridge KC. Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007;27:1594-1605.
46. Krause M, German PW, Taha SA, Fields HL. A pause in nucleus accumbens neuron firing is required to initiate and maintain feeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010;30:4746-4756.
47. Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 1991;41:89-125.
48. Zahm DS, Heimer L. Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *The Journal of comparative neurology* 1993;327:220-232.
49. Saper CB. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annual review of neuroscience* 2002;25:433-469.
50. Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE. A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. *J Comp Neurol* 2005;493:72-85.
51. Baldo BA, Alsene KM, Negron A, Kelley AE. Hyperphagia induced by GABAA receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell: dependence on intact neural output from the central amygdaloid region. *Behavioral neuroscience* 2005;119:1195-1206.
52. Man MS, Clarke HF, Roberts AC. The role of the orbitofrontal cortex and medial striatum in the regulation of prepotent responses to food rewards. *Cerebral cortex* 2009;19:899-906.
53. Schoenbaum G, Chiba AA, Gallagher M. Changes in functional connectivity in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during learning and reversal training. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000;20:5179-5189.
54. Rolls ET. The orbitofrontal cortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 1996;351:1433-1443; discussion 1443-1434.
55. Luk CH, Wallis JD. Choice Coding in Frontal Cortex during Stimulus-Guided or Action-Guided Decision-Making. *Journal of Neuroscience* 2013;33:1864-1871A.
56. Zald DH. Orbitofrontal cortex contributions to food selection and decision making. *Annals of behavioral medicine : a publication of the Society of Behavioral Medicine* 2009;38 Suppl 1:S18-24.
57. Krangelbach ML, O'Doherty J, Rolls ET, Andrews C. Activation of the human orbitofrontal cortex to a liquid food stimulus is correlated with its subjective pleasantness. *Cerebral cortex* 2003;13:1064-1071.

58. Rolls ET, Verhagen JV, Kadohisa M. Representations of the texture of food in the primate orbitofrontal cortex: neurons responding to viscosity, grittiness, and capsaicin. *Journal of neurophysiology* 2003;90:3711-3724.
59. Siep N, Roefs A, Roebroek A, Havermans R, Bonte ML, Jansen A. Hunger is the best spice: an fMRI study of the effects of attention, hunger and calorie content on food reward processing in the amygdala and orbitofrontal cortex. *Behavioural brain research* 2009;198:149-158.
60. de Araujo IE, Gutierrez R, Oliveira-Maia AJ, Pereira A, Jr., Nicoletis MA, Simon SA. Neural ensemble coding of satiety states. *Neuron* 2006;51:483-494.
61. Fisher KM, Zaaami B, Baker SN. Reticular formation responses to magnetic brain stimulation of primary motor cortex. *The Journal of physiology* 2012;590:4045-4060.
62. Jordan WP, Leaton RN. Effects of mesencephalic reticular formation lesions on habituation of startle and lick suppression responses in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology* 1982;96:170-183.
63. Riabinina MA. [Interaction of cerebral cortex and reticular formation in building up of motor dominant state at different levels of the central nervous system]. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR imeni I M Sechenova* 1965;51:1149-1158.
64. Bowsler D. [Sensorial properties of reticular formation of the caudal bulb in cats]. *Journal de physiologie* 1969;61 Suppl 2:234.
65. Gettys GC, Liu F, Kimlin E, Baghdoyan HA, Lydic R. Adenosine A(1) receptors in mouse pontine reticular formation depress breathing, increase anesthesia recovery time, and decrease acetylcholine release. *Anesthesiology* 2013;118:327-336.
66. Lydic R, Baghdoyan HA. Ketamine and MK-801 decrease acetylcholine release in the pontine reticular formation, slow breathing, and disrupt sleep. *Sleep* 2002;25:617-622.
67. Gray PA. Transcription factors define the neuroanatomical organization of the medullary reticular formation. *Frontiers in neuroanatomy* 2013;7:7.
68. Malatesta M, Fattoretti P, Baldelli B, Battistelli S, Baliotti M, Bertoni-Freddari C. Effects of ageing on the fine distribution of the circadian CLOCK protein in reticular formation neurons. *Histochemistry and cell biology* 2007;127:641-647.
69. Iwakiri H, Matsuyama K, Mori S. Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: a microdialysis study. *Neuroscience research* 1993;18:157-170.
70. Davis JD. The effectiveness of some sugars in stimulating licking behavior in the rat. *Physiology & behavior* 1973;11:39-45.
71. Hooks BM, Mao T, Gutnisky DA, Yamawaki N, Svoboda K, Shepherd GM. Organization of cortical and thalamic input to pyramidal neurons in mouse motor cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013;33:748-760.
72. Komiyama T, Sato TR, O'Connor DH, et al. Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature* 2010;464:1182-1186.
73. Volkow ND, Wise RA. How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci* 2005;8:555-560.
74. Blundell JE, Gillett A. Control of food intake in the obese. *Obes Res* 2001;9 Suppl 4:263S-270S.
75. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* 2003;111:1444-1451.
76. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Telang F. Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363:3191-3200.
77. Volkow ND, Fowler JS. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 2000;10:318-325.
78. Schoenbaum G, Roesch MR, Stalnaker TA. Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends in neurosciences* 2006;29:116-124.
79. Winstanley CA. The orbitofrontal cortex, impulsivity, and addiction: probing orbitofrontal dysfunction at the neural, neurochemical, and molecular level. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1121:639-655.
80. Humphries MD, Prescott TJ. The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog Neurobiol* 2010;90:385-417.
81. Kroeger D, de Lecea L. The hypocretins and their role in narcolepsy. *CNS & neurological disorders drug targets* 2009;8:271-280.
82. Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2418-2422.
83. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 2007;450:420-424.
84. Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, et al. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:19168-19173.
85. Boutrel B, Koob GF. What keeps us awake: the neuropharmacology of stimulants and wakefulness-promoting medications. *Sleep* 2004;27:1181-1194.
86. de Lecea L, Sutcliffe JG. The hypocretins and sleep. *FEBS J* 2005;272:5675-5688.
87. Lobo MK, Covington HE, 3rd, Chaudhury D, et al. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science (New York, NY)* 2010;330:385-390.
88. Adamantidis A, de Lecea L. A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. *Peptides* 2009;30:2066-2070.
89. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, et al. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 2003;38:701-713.
90. Zhu Y, Yamanaka A, Kunii K, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiology & behavior* 2002;77:251-257.
91. Sano H, Yokoi M. Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007;27:6948-6955.
92. Carter ME, Adamantidis A, Ohtsu H, Deisseroth K, de Lecea L. Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009;29:10939-10949.

93. Nicolaidis S, Danguir J, Mather P. A new approach of sleep and feeding behaviors in the laboratory rat. *Physiology & behavior* 1979;23:717-722.
94. Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. Potential Rhythms of the Cerebral Cortex during Sleep. *Science* 1935;81:597-598.
95. Bogoslovskii MM. The effect of cerebral cortex isolation on sleep-wakefulness cycles in cats. *Neuroscience and behavioral physiology* 1985;15:488-494.
96. Kryzhanovskii GN, Makul'kin RF, Gun AA. [Prolongation of sleep following creation of a generator of pathologically enhanced excitation in the orbital cortex]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 1977;84:531-534.
97. Nishida M, Uchida S, Hirai N, et al. High frequency activities in the human orbitofrontal cortex in sleep-wake cycle. *Neuroscience letters* 2005;379:110-115.
98. Killgore WD, McBride SA. Odor identification accuracy declines following 24 h of sleep deprivation. *Journal of sleep research* 2006;15:111-116.
99. Gabbott PL, Rolls ET. Increased neuronal firing in resting and sleep in areas of the macaque medial prefrontal cortex. *The European journal of neuroscience* 2013;37:1737-1746.
100. Iwama K, Kawamoto T. Responsiveness of cat motor cortex to electrical stimulation in sleep and wakefulness. *Progress in brain research* 1966;21:54-63.
101. Opie GM, Catcheside PG, Usmani ZA, Ridding MC, Semmler JG. Motor cortex plasticity induced by theta burst stimulation is impaired in patients with obstructive sleep apnoea. *The European journal of neuroscience* 2013;37:1844-1852.
102. Spiegel K. Sleep loss as a risk factor for obesity and diabetes. *Int J Pediatr Obes* 2008;3 Suppl 2:27-28.
103. Beccuti G, Pannain S. Sleep and obesity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2011;14:402-412.
104. Hanlon EC, Benca RM, Baldo BA, Kelley AE. REM sleep deprivation produces a motivational deficit for food reward that is reversed by intra-accumbens amphetamine in rats. *Brain research bulletin* 2010;83:245-254.
105. Reed GK, Dolezal DN, Cooper-Brown LJ, Wacker DP. The effects of sleep disruption on the treatment of a feeding disorder. *Journal of applied behavior analysis* 2005;38:243-245.
106. Tauman R, Levine A, Avni H, Nehama H, Greenfeld M, Sivan Y. Coexistence of sleep and feeding disturbances in young children. *Pediatrics* 2011;127:e615-621.
107. Tomasi D, Wang RL, Telang F, et al. Impairment of attentional networks after 1 night of sleep deprivation. *Cerebral cortex* 2009;19:233-240.
108. Zimberg IZ, Damaso A, Del Re M, et al. Short sleep duration and obesity: mechanisms and future perspectives. *Cell biochemistry and function* 2012;30:524-529.
109. Danguir J, Nicolaidis S. Dependence of sleep on nutrients' availability. *Physiology & behavior* 1979;22:735-740.
110. McDonald DM, Keene AC. The sleep-feeding conflict: Understanding behavioral integration through genetic analysis in *Drosophila*. *Aging* 2010;2:519-522.
111. Volkow ND, Tomasi D, Wang GJ, et al. Evidence that sleep deprivation downregulates dopamine D2R in ventral striatum in the human brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012;32:6711-6717.
112. Volkow ND, Tomasi D, Wang GJ, et al. Hyperstimulation of striatal D2 receptors with sleep deprivation: Implications for cognitive impairment. *NeuroImage* 2009;45:1232-1240.
113. Volkow ND, Wang GJ, Telang F, et al. Sleep deprivation decreases binding of [11C]raclopride to dopamine D2/D3 receptors in the human brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008;28:8454-8461.
114. Filoteo JV, Maddox WT, Simmons AN, et al. Cortical and subcortical brain regions involved in rule-based category learning. *Neuroreport* 2005;16:111-115.
115. Moghaddam B, Berridge CW, Goldman-Rakic PS, Bunney BS, Roth RH. In vivo assessment of basal and drug-induced dopamine release in cortical and subcortical regions of the anesthetized primate. *Synapse* 1993;13:215-222.
116. Noworolski SM, Nelson SJ, Henry RG, et al. High spatial resolution 1H-MRSI and segmented MRI of cortical gray matter and subcortical white matter in three regions of the human brain. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 1999;41:21-29.
117. Blouet C, Schwartz GJ. Brainstem nutrient sensing in the nucleus of the solitary tract inhibits feeding. *Cell metabolism* 2012;16:579-587.
118. Kim EM, Quinn JG, Spanswick D, O'Hare E. Feeding association between the nucleus of the solitary tract and the ventral tegmental area. *Appetite* 2009;53:457-460.
119. Cordova-Villalobos JA. Overweight and obesity: public health problems in Mexico. *Cir Cir* 2009;77:393-394.
120. Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, et al. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiol Clin* 2004;22:485-504.
121. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 2009;41:25-34.
122. Rolls ET. Understanding the mechanisms of food intake and obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2007;8 Suppl 1:67-72.
123. Archer ZA, Rayner DV, Barrett P, et al. Hypothalamic energy balance gene responses in the Sprague-Dawley rat to supplementation of high-energy diet with liquid ensure and subsequent transfer to chow. *Journal of neuroendocrinology* 2005;17:711-719.
124. Gutierrez R, Carmena JM, Nicolelis MA, Simon SA. Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *Journal of neurophysiology* 2006;95:119-133.
125. Spector AC, Klumpp PA, Kaplan JM. Analytical issues in the evaluation of food deprivation and sucrose concentration effects on the microstructure of licking behavior in the rat. *Behavioral neuroscience* 1998;112:678-694.
126. Gutierrez R, Simon SA, Nicolelis MA. Licking-induced synchrony in the taste-reward circuit improves cue discrimination during learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010;30:287-303.
127. Lin SC, Gervasoni D. Defining Global Brain States Using Multielectrode Field Potential Recordings. In: Nicolelis MAL, ed. *Methods for Neural Ensemble Recordings*. Boca Raton (FL), 2008.
128. Travers JB, Dinardo LA, Karimnamazi H. Motor and premotor mechanisms of licking. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 1997;21:631-647.

129. Galashina AG, Bogdanov AV. [Analysis of neuronal activity in the cat motor cortex during a timed feeding reflex]. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova* 1987;37:766-768.
130. Roitman MF, Wheeler RA, Tiesinga PH, Roitman JD, Carelli RM. Hedonic and nucleus accumbens neural responses to a natural reward are regulated by aversive conditioning. *Learning & memory* 2010;17:539-546.
131. Mahler SV, Smith KS, Berridge KC. Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2007;32:2267-2278.
132. Pecina S, Berridge KC. Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: map based on microinjection Fos plumes. *Brain research* 2000;863:71-86.
133. Pecina S, Berridge KC. Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005;25:11777-11786.
134. Perez IO, Villavicencio M, Simon SA, Gutierrez R. Speed and accuracy of taste identification and palatability: impact of learning, reward expectancy and consummatory licking. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2013.
135. Norgren R, Hajnal A, Mungarnde SS. Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiology & behavior* 2006;89:531-535.
136. Roitman MF, Wheeler RA, Carelli RM. Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output. *Neuron* 2005;45:587-597.
137. Roitman MF, Wheeler RA, Wightman RM, Carelli RM. Real-time chemical responses in the nucleus accumbens differentiate rewarding and aversive stimuli. *Nature neuroscience* 2008;11:1376-1377.