



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE NEUROPEPTIDOS EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DE UN MODELO MURINO
EXPERIMENTAL EN ROEDORES
CON DEPRIVACIÓN DE SUEÑO
PARADÓJICO”.**

CARLOS ENRIQUE RODRÍGUEZ RASCHIO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO
DE MAESTRO EN MEDICINA**

**LIMA – PERÚ
2018**

ASESOR

Dr. Luis Angel Aguilar Mendoza

JURADO

Presidente: Dr. Rosendo Daniel Guillén Pinto

Vocal: Mg. Rosa María Velasco Valderas.

Secretario: Mg. José Luis Rojas Vilca

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÒN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III. MARCO TEÓRICO	4
IV. JUSTIFICACIÒN DEL ESTUDIO	8
V. OBJETIVOS	9
VI. METODOLOGÌA	10
6.1 Diseño de Estudio	10
6.2 Población	10
6.3 Muestra	10
6.4 Operación de Variables y definición	11
6.4.1 Variables dependientes	11
6.4.2 Variable independiente	11
6.5 Procedimiento y técnicas	11
6.5.1 Inducción de la deprivación del sueño	11
6.5.2 Diseño Experimental	12
6.5.3 Test de Campo Abierto (Open field)	13
6.5.4 Test de Laberinto Acuático (Test de Morris)	14
6.5.5 Obtención de los cortes de cerebros de los grupos experimentales	15
6.5.6 Perfusión y Fijación	15
6.5.7 Tallado y Post Fijación	16
6.6 Técnica de Inmunohistoquímica	16
6.6.1 Fijación y Procesamiento Histológico	16
6.6.2 Anticuerpos	18
6.7 Consideraciones para la técnica de inmunohistoquímica de neuropéptidos	18
6.8 Procedimiento de inmunotinción aplicada a los cortes obtenidos	19
6.9 Consideraciones éticas	21
6.10 Análisis Estadístico	21
VII. RESULTADOS	24
VIII. DISCUSIÒN	26
IX. CONCLUSIONES	30

X.	RECOMENDACIONES	31
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS	32
	ANEXOS	43

RESUMEN

El déficit de sueño se traduce en el deterioro del rendimiento cognitivo tanto en seres humanos como en roedores. En el presente trabajo se evaluó la relación entre la privación de sueño paradójico y los cambios tanto en la conducta y memoria de las ratas, así como la expresión neuronal de la hormona concentradora de melanina (MCH) y neuropéptido Y a nivel cerebral. Se utilizaron ratas separadas en un grupo control (sin privación de sueño), y dos grupos experimentales (con menor y mayor privación de sueño). Antes y después de ser sometidos al proceso de privación (por 3 días seguidos), los roedores fueron expuestos a pruebas para evaluar memoria y alteraciones en el comportamiento. Se extrajeron los cerebros para evaluar los patrones de expresión de MCH y Neuropeptido Y, en los núcleos implicados en los procesos de memoria y aprendizaje (hipotálamo lateral y núcleo paraforminal), y la actividad neuronal en esta etapa de privación mediante proteína c-FOS. Los resultados mostraron que tanto la conducta como la memoria visoespacial se ven afectados por la privación del sueño paradójico y que existe evidencia de que la expresión de los neuropéptidos mencionados se da en las neuronas activas durante la privación de sueño.

Palabras claves: Privación del sueño, Memoria, Neuropeptido Y, proteína c-FOS, Hormona concentradora de melanina.

ABSTRACT

Sleep deprivation produces impairment in cognitive performance in both humans and experimentally in rodents. This study assesses the relationship between paradoxical sleep deprivation and the changes in animal behavior and memory, as well as the neuronal expression of melanin-concentrating hormone (MCH) and the Neuropeptide Y at the brain level. Rats were used, separated into a control group (without sleep deprivation), and two experimental groups (with lower and higher sleep deprivation). Before and after being subjected to this deprivation process (for three consecutive days), the rodents were tested to evaluate memory and behavior alterations. The brains were removed to evaluate MCH and Neuropeptide Y expression patterns in nuclei involved in memory and learning processes (lateral hypothalamus and perifornical nucleus), as well as the neuronal activity in this stage of deprivation by c-FOS. The results showed that both behavior and visuospatial memory are affected by paradoxical sleep deprivation and that there is evidence of the mentioned neuropeptides expression in active neurons during deprivation.

Key words: Sleep deprivation, Memory, Neuropeptide Y, c-FOS Protein, Melanin-concentrating hormone.

I. INTRODUCCION

En las últimas décadas, el promedio de horas de sueño ha disminuido a unas 7 horas debido a la vida moderna¹ la cual es muy atareada, en la cual es común los horarios laborales prolongados y la deprivación del sueño. En la vida moderna tenemos luz eléctrica, televisión, internet y otras posibilidades durante las 24 horas diarias, aumentando la vigilia, lo cual reduce la cantidad y calidad de horas de sueño. Esto ha generado diversos trastornos, más fatiga mental, más errores, respuestas más lentas, somnolencia, cansancio y más estrés. Por otra parte, sabemos que durante el sueño se recobra el equilibrio natural perdido, pero cuando hay deprivación de sueño, las disfunciones se traducen en daños estructurales o fisiológicos del cerebro. Además, la recuperación del déficit neurobiológico de sueño durante fines de semana y periodos de descanso, se ha comprobado que es incompleta.

La deprivación del sueño ha producido alteraciones hormonales en el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), lo cual ha producido más enfermedades, que a su vez genera más estrés ocasionando mayor nivel de cortisol y otras sustancias². Se han hallado alteraciones neurofisiológicas, como por ejemplo en la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, en el tallo cerebral y el sistema límbico, los cuales están relacionados con el sueño paradójico; por eso últimamente se ha estado investigando la relación neurofisiológica y bioquímica, lo que sugiere que en el sueño paradójico hay síntesis de proteínas y neuropéptidos³. Se ha estado estudiando la relación que hay entre el sueño paradójico (el sueño paradójico es el período de sueño durante el cual las ondas cerebrales son rápidas y de bajo voltaje

y las actividades autónomas son irregulares) y varias sustancias que controlan los ritmos básicos y el ciclo sueño/vigilia. Esto se ha podido comprobar que ocurre durante la privación del sueño paradójico en el cual hay mucho estrés.

Paralelamente, en los últimos años se han realizado diversas investigaciones para determinar las estructuras cerebrales y los sistemas de neurotransmisores que intervienen en la regulación de la vigilia y el sueño ⁴. Se ha encontrado gran cantidad de neurotransmisores y de neuropéptidos que regulan el ciclo sueño/vigilia y que intervienen en el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR); entre estos tenemos el neuropéptido Y y la hormona concentradora de melanina (MCH), esta última se ha relacionado con el hipotálamo lateral, y se tiene que las neuronas MCHérgicas expresan proteína c-FOS, en el periodo de rebote de sueño MOR después de un periodo de privación de éste, y se tiene que las neuronas MCHérgicas se activan en el sueño MOR ⁵.

Durante este trabajo se evaluó la relación entre el estrés ocasionado por la privación de sueño paradójico y los cambios de expresión de neuropéptido Y y de hormona concentradora de melanina en el sistema nervioso central.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es conocido actualmente el hecho de que la privación del sueño conlleva a cambios conductuales y psicofisiológicos en las personas. Los mecanismos fisiológicos referidos al sueño, así como los dados en diversas alteraciones del sueño, son aún objeto de estudio, y cada vez es estudiada a más profundidad.

Los neuropéptidos abarcan una importante área en el estudio actual de la neurociencia, en diferentes patrones cerebrales y patologías, y su relación al sueño, no ha sido la excepción.

El siguiente estudio busca responder la siguiente interrogante:

¿Los cambios de comportamiento, en modelos experimentales (ratas) sujetos a privación de sueño paradójico, estaría asociado a cambios en la expresión del Neuropéptido Y y MHC en neuronas ubicadas a nivel del núcleo perifornical e hipotálamo lateral?

III. MARCO TEÓRICO

Los neuropéptidos actúan como neuromoduladores y neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC), participando en la regulación de diferentes mecanismos asociados a patrones de respuestas y conductas, incluido el sueño ^{3, 6}.

Los estados de vigilia y sueño, sueño de no movimiento rápido de ojos (NO MOR) y de movimiento rápido de ojos (MOR) o paradójico, son el resultado de interacciones talamocorticales y son moduladas por diferentes circuitos subcorticales. Las etapas de sueño NO MOR se caracterizan por ondas lentas de gran amplitud y adecuado tono muscular, y las de sueño MOR por alto nivel de actividad cortical e hipocampal (ritmo theta en roedores), movimiento rápido de ojos y pérdida de tono muscular ^{7, 8, 9, 10}. La transición entre etapas de vigilia y sueño son dadas por modulaciones discretas entre núcleos hipotalámicos, troncales y la corteza cerebral, con interacción entre circuitos colinérgicos y monoaminérgicos ^{2, 11, 12}. El sueño tiene un componente genético que determina su ocurrencia y su arquitectura, siendo complementaria para este la adaptación al ambiente ¹³. Este contexto genético influenciado por los condicionamientos ambientales genera cambios en la producción de diversas sustancias químicas cerebrales que modifican conductas a partir de la afectación de los circuitos en que se involucran.

Experimentalmente, en la mayoría de las técnicas disponibles para la privación de sueño se aprovecha la atonía que se produce durante esta fase del sueño, a raíz de la técnica presentada por Jouvet en 1964 para los gatos ¹⁴, y más tarde adaptado para

las ratas por Cohen y DeMent ¹⁵. A través de los años, múltiples péptidos han sido estudiados con un impacto sobre el sueño MOR ^{16, 17, 18}.

La restricción en el sueño es un serio problema en nuestra sociedad, afectada principalmente por el aumento de trabajo competitivo, estrés psicosocial y el estilo de vida moderno. Diferentes estudios demuestran que esto conlleva a una depresión en la función cognitiva y desempeño emocional, siendo además un factor de riesgo para diferentes enfermedades incluido los desórdenes psiquiátricos ^{1, 19}.

El sistema MCHérgico está formado por el conjunto de neuronas ubicadas en el hipotálamo las cuales requieren la presencia de un neuropéptido para cumplir con la función de neuromodulador, denominado hormona concentradora de melanina (MCH), y cuya participación es proyectada hacia diversas áreas del sistema nervioso central, principalmente en aquellas áreas vinculadas con la regulación de la vigilia y el sueño. Diversas investigaciones han asociado al sistema MCHérgico con la regulación en la energía corporal, la vigilia y el sueño. Es en la generación de esta última función en el cual se le ha atribuido un rol preponderante ^{20, 21, 22, 23}.

Otro de los neuropéptidos del cual se ha investigado más es el Neuropéptido Y, el cual participa en relación al estrés y el eje HPA, siendo sus niveles elevados asociados al hambre, la ansiolisis y la sedación, y disminuyendo más bien sus niveles estudiados a nivel hipotalámico y sérico, al igual que con la metionina-encefalina en situaciones de privación de sueño ^{24, 25, 26, 27}.

Para la identificación de las zonas cerebrales que están en funcionamiento, la Neurociencia ha usado como principal recurso la presencia de la proteína c-FOS, para determinar la expresión del gen c-FOS el cual actúa como indicador molecular de la actividad neuronal. Así, un incremento en la cantidad de la proteína c-FOS de una neurona se explica como resultado de un aumento de los estímulos que recibe esa célula nerviosa. ^{20, 28}.

Diversos estudios explican que tanto la privación del sueño en humanos, así como en modelos de experimentación en roedores, cumplen con similitudes en cuanto a cambios metabólicos, incremento en el tono simpático y cortisol, compromiso inmunológico e incremento en la ingesta de alimentos y la baja de peso ¹⁷. El modelo en ratas implica un método de plataforma con agua alrededor que conlleva a que en el momento de sueño que el animal pierde el tono muscular (etapa de sueño MOR o paradójico) cae al agua despertando por consecuencia, Aunque ambas – plataformas simples ¹⁴ y múltiples ^{29, 30} son técnicas que han sido evaluadas electrofisiológicamente, no ha habido ninguna evaluación directa de los cambios en el estado de vigilia en las ratas sometidas a la modificación de múltiples plataformas ³¹.

Durante más de 20 años, las investigaciones en sueño han sido enfocadas ampliamente en la aplicación del método paradójico (REM) y la privación del sueño en animales, utilizando para esto pequeñas plataformas rodeadas de agua ^{24, 32}. El método de la plataforma puede garantizar una privación casi total de sueño REM, mientras que la cantidad de sueño de onda lenta se reduce en unos 60%. Sin embargo, este método induce estrés muy marcado en los animales debido a la

inmovilización, caer en el agua, el remojo, la refrigeración y otros factores adversos. Para distinguir los efectos de la privación del sueño REM adecuada de estrés concomitante los animales del grupo de control son ubicados en las plataformas de mayor diámetro. Se cree que si se reduce considerablemente REM para la privación de sueño (alrededor de 50%), el nivel de estrés restante es aproximadamente similar a la de la pequeña plataforma. Todavía este control no es suficiente, ya que se basa en la hipótesis de la independencia de los efectos de la privación del sueño REM y el estrés en el organismo animal ^{2, 33, 34, 35, 36}. Una rata duerme promedio de 13 horas al día con 2 horas de éstos dedicados a sueño MOR.

A través de esta técnica se puede realizar distintos estudios de observación de comportamiento estereotipado con el Open-Field ^{37, 38}, así como de la conducta espacial como el Test de Laberinto Acuático ³⁸, en el que es posible evaluar **Memoria de Referencia** que es medida por la reducción de la distancia y la latencia necesaria para encontrar la plataforma en la primera prueba de las sucesivas posiciones de partida. **Memoria de Trabajo** se indica mediante la reducción de la distancia y la latencia necesaria para encontrar la plataforma; y a través de estudios de inmunohistoquímica comprobar los cambios en la expresión de neuropéptido Y y MCH, a nivel del hipotálamo, asociado a que la deprivación de sueño conllevaría a cambios conductuales, de aprendizaje y memoria, así como estrés, funciones relacionadas también a centros del sistema límbico.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La descripción de dichos hechos permitirá aportar luces en la fisiología de dichos neuropéptidos en las funciones cerebrales tales como el sueño, la memoria, la emoción y el aprendizaje, que permitirá posteriormente el desarrollo de peptidomiméticos que podrían ser útiles como medicación para diferentes problemas, como ansiolíticos, hipnóticos por ejemplo, actuando de manera más directa en la fisiología humana del sueño que las medicaciones con las que contamos en la actualidad.

V. OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Evaluar la relación entre la privación de sueño y los cambios en la expresión de neuropéptidos en el Sistema Nervioso Central en ratas albinas de experimentación.

Objetivos Secundarios:

1. Analizar los cambios comportamentales producidos por privación de sueño paradójico y la expresión de neuropéptidos en el hipotálamo.
2. Analizar el rendimiento de la memoria en los animales con y sin privación de sueño paradójico.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño de estudio:

Estudio experimental prospectivo y descriptivo.

6.2 Población:

Se usaron ratas albinas macho cepa Holtzman para los experimentos. Éstas fueron mantenidas en condiciones ambientales óptimas con continua disponibilidad a comida y agua, ciclos de 12 horas de luz-oscuridad, y manipuladas diariamente durante 1 semana para permitir su adaptación al medio.

6.3 Muestra:

Se realizó el cálculo del tamaño muestral según una fórmula en comparación de proporciones en el cual se estimó que se requerían 10 individuos por grupo; se comparó de 2 en 2 los 3 grupos, para poder hallar una diferencia mínima del 60% en los neuropéptidos entre los grupos, con un poder de 0.80 y un error alfa de 0.05.

$$n = \frac{[Z_{1-\alpha/2} * \sqrt{2P(1-P)} + Z_{1-\beta} * \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)}]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

6.4 Operación de Variables y definición:

6.4.1. Variables dependientes:

- Expresión de neuronas teñidas inmunohistoquímicamente para neuropéptido Y y MCH.
- Alteración en la memoria espacial medida por test de Morris.
- Alteración del estado emocional y estrés medida por test de Open-Field.

6.4.2. Variable independiente:

- Deprivación de sueño MOR (paradójico).

6.5. Procedimiento y técnicas:

6.5.1. Inducción de la deprivación del sueño:

Se utilizaron 3 grupos de ratas; un grupo control y dos experimentales. Para lograr el estrés en los grupos experimentales se utilizó el método de la plataforma simple como factor estresante (método aplicado por Jouvet)¹⁴. En el caso de las ratas del grupo experimental que fue sometido a deprivación de sueño, los animales fueron colocados sobre una plataforma circular de 6,5cm de diámetro (33cm² de área) dentro de un tanque cerrado. La plataforma estuvo rodeada por agua a 1cm por debajo del nivel de la superficie de la plataforma y a 22° C. Las ratas cuando entran en sueño REM pierden el tono muscular, caen al agua, se despiertan y se vuelven a subir a la plataforma, y de esa manera son privados del sueño REM. Los animales tuvieron fácil acceso a la comida y agua a través de la rejilla metálica del tanque. En el caso de las ratas control, la plataforma tuvo un área de 320 cm².

6.5.2. Diseño Experimental:

Se utilizaron 30 animales agrupados en 3 grupos (**Gráfico 1**). En el grupo que fue privado de sueño REM, cada uno de los animales fue mantenido individualmente en cajas tipo tanque con plataforma de 6.5 cm. de diámetro para privación de sueño REM (Ex DS). En el grupo que no fue privado de sueño REM pero fue sometido a tención, cada uno de los animales fue mantenido individualmente en cajas tipo tanque con plataforma de 10 cm. de diámetro, del grupo control sin privación de sueño REM (Co-DS). En el tercer grupo los animales fueron mantenidos en cajas normales para el grupo control (Co-No) (**Gráfico 2**).

Diariamente, durante 4 días, los animales fueron evaluados entre las 10.00 horas y las 13.00 horas a través del test de Morris para evaluar la memoria espacial y de trabajo, además el comportamiento fue analizado por el test de Campo Abierto (Open-Field).

Inmediatamente después de terminar el último test en el cuarto día, los animales fueron sacrificados. Para ello las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (60 mg/kg, I.P.), perfundidos transcárdicamente con 100 ml de solución salina heparinizada y luego con una solución al 4% de paraformaldehído en 0.1M de solución buffer fosfato (PBS). Después de ser crioprottegidos en sucrosa al 30%, los cerebros se cortaron en secciones de 5 micras y se almacenaron en PBS 0.1M. Se evaluaron principalmente las subregiones hipocámpicas CA1 y CA3, Giro Dentado,

Amígdala Temporal, Cíngulo, Corteza Frontal Basal, además de Corteza Entorrinal y Corteza de Asociación.

6.5.3. Test de Campo Abierto (Open field):

Las ratas fueron sometidas al Test de Campo Abierto (Open Field), el cual es un método aceptado para la evaluación de ansiedad y actividad motora en estos tipos de animales¹⁰⁵. Este equipo pertenece al Laboratorio de Neurociencia y comportamiento de la UPCH, el mismo que consiste en una caja cúbica (60 x 60 x 60 cm). Las paredes y el piso eran de color negro hechos de melanina. El piso fue dividido por líneas blancas en cuadros iguales de 20 x 20 cm. Cada animal correspondiente a cada grupo de evaluación fue colocado de manera cuidadosa en una esquina, para proceder de inmediato a la filmación de su actividad por 4 minutos. Las conductas que se evaluaron fueron:

1. Acicalamiento;
2. Número de bolos fecales
3. Micciones;
4. Olfateo;
5. Pararse.

Comúnmente el estrés por privación de sueño paradójico se evidencia por la disminución de la distancia total recorrida, el aumento del acicalamiento, la disminución del número de bolos fecales o micciones, la disminución del olfateo y la disminución del pararse. Con esto se evaluó el efecto en la actividad motora y la tensión en las ratas sin privación de sueño y en las ratas con privación de sueño.

6.5.4. Test de Laberinto Acuático (Test de Morris):

Las ratas fueron sometidas al Test de Morris, el cual es un método aceptado para la evaluación de aprendizaje y memoria visoespacial¹⁰⁶. Este equipo pertenece al Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la UPCH, el cual consiste en una piscina circular de unos 180 cm de diámetro por 76 cm de altura, la cual fue llenada con agua hasta unos 25 cm desde la base. Conjuntamente se colocó una plataforma de material acrílico transparente, cuya altura era de 24 cm y el diámetro de la superficie de apoyo para el animal era de 10 cm. esta plataforma debía ser localizada por el animal a través de nado una vez colocado este al interior de la piscina.

El procedimiento empleado para la evaluación fue el de plataforma oculta, por el cual los animales tuvieron que nadar desde diferentes ubicaciones (cerca del perímetro) en los cuales fueron colocados, hasta encontrar la superficie de apoyo de la plataforma ubicada a 1 cm. por debajo del nivel del agua. La plataforma fue ubicada en 1 de 4 posiciones: El centro del cuadrante suroeste (SO), el centro del cuadrante noreste (NE), el centro del laberinto ©, o en el borde sur (S) del laberinto.

La posición de la plataforma fue cambiada cada día, pero se mantuvo en la misma posición para todos los 4 ensayos en un día determinado. Se asociaron señales distantes con una ubicación específica de la plataforma, que luego de los sucesivos ensayos adoptaron las propiedades de estímulos discriminativos de localización de la plataforma. Las señales consistieron en carteles de 4 diferentes formas

geométricas a blanco y negro en cada una de las 4 paredes de la sala de experimentación.

La rata se liberó frente a la pared de la piscina a partir de una de las ubicaciones iniciales. Cada rata se puso a prueba en 2 ensayos consecutivos de cada posición de partida. En cada ensayo, se permitió a la rata hasta 90 segundos para localizar la plataforma, una vez localizada se permitió descansar ahí por 30 segundos. Si la plataforma no se encontraba, la rata sería colocada sobre la misma por 30 segundos. Se mide la distancia nadada por la rata para encontrar la plataforma y el tiempo (Latencia) para localizar la plataforma. Estos se registraron y analizaron por un sistema de video y captura de imágenes. Se evaluó el efecto en la memoria en las ratas sin deprivación de sueño y en las ratas con deprivación de sueño a partir de la latencia, no se midió la distancia.

6.5.5. Obtención de los cortes de cerebros de los grupos experimentales:

6.5.6. Perfusión y fijación.

Cada rata fue anestesiada con pentobarbital sódico al 6%, lo cual permitió la perfusión por vía transcardiaca primero por una inyección de 100 ml de solución salina 0.9% (solución de lavado), continuada por una solución fijadora de paraformaldehído al 4% (800 ml) en solución tampón fosfato (PBS) 0,1 M pH 7,4.

Posteriormente se le extrajo y talló el encéfalo.

6.5.7. Tallado y post-fijación

Posterior a la fijación, se procedió a extraer el cerebro y retirar las meninges haciendo uso de una lupa de mesa, para posteriormente continuar con el tallado de este en un molde metálico especial para tamaño y la especie (rata), obteniendo así secciones con el mismo plano de las áreas requeridas para el estudio, siendo sometidas estas a post-fijaron por 12 horas en el mismo fijador a 4 ° C. Por último las piezas fueron sumergidas por 24 horas en soluciones crecientes de sacarosa (10%, 20%, 25%, y 30%), en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4.

6.6. Técnica de Inmunohistoquímica:

6.6.1. Fijación y Procesamiento histológico:

Cada animal fue anestesiado con pentobarbital sódico 60 mg/kg peso y perfundido por la aorta con 100mL de solución salina heparinizada, seguida de 300mL de una solución de paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4. Posteriormente se extrajo el encéfalo. Se obtuvieron secciones coronales de 5 mm de cada cerebro, y se escogió la sección donde estaba presente el hipotálamo (0 a -5mm, Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Paxinos and Watson, 2013).

Las muestras obtenidas fueron post-fijadas en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, lo cual permite el mantenimiento estructural del tejido y sus componentes al promover la formación de enlaces cruzados entre las proteínas. Posteriormente se eliminó el exceso de fijador, a través de un lavado con agua, para poder continuar la inclusión sin que el fijador pueda interferir en este procedimiento.

El agua fue eliminada de las muestras obtenidas a través de un proceso de deshidratación a través de la exposición a una batería de alcoholes de menor a mayor grado (etanol al 30%, 50%, 70%, 90%, 95% hasta el alcohol al 100 %) permaneciendo la muestra 1 hora en cada solución. Posteriormente se procedió al aclaramiento, en el cual las muestras fueron colocadas durante 2 horas en xilol, el cual es una solución miscible tanto con el alcohol como con la parafina líquida (medio de inclusión).

Posterior a ello las muestras se impregnaron en parafina líquida (58° C durante 4 horas), gracias a que en su fase líquida esta sustancia tiene la capacidad de penetrar y cubrir el tejido, endureciéndolo al instante por enfriamiento y por polimerización, formando un bloque sólido que permita su manipulación para realizar los cortes correspondientes con el micrótopo.

A través del micrótopo de rotación Leica RM2125RT, se obtuvieron cortes seriados de 5 micras de grosor, requeridos para analizar las 3 proteínas: NPY, MCH y c-FOS.

Para el análisis de estas tres proteínas mencionadas a partir de los cortes obtenidos se empleó la técnica de inmunohistoquímica, la cual es una técnica aceptada para el análisis expresión molecular en células nerviosas¹⁰⁷

6.6.2. Anticuerpos

Las secciones coronales del área de hipotálamo fueron marcadas con anticuerpos policlonales contra el MCH y NPY, en cortes seriados para evaluar la distribución de dichos neuropeptidos en el hipotálamo

6.7. Consideraciones para la técnica de inmunohistoquímica de neuropeptidos:

Antes de realizar la inmunotinción, se inactivaron las peroxidasas endógenas, a través de la incubación de las secciones por 30 minutos en una solución de peróxido de hidrogeno (6,6ml) y metanol (13,4ml). Las secciones fueron luego lavadas con PBS por 30 minutos, después se incubaron por 30 minutos en una solución Mezcla compuesta de PBS con 1% de suero de caballo y 0,3% de Tritón X-100. Posteriormente, estos cortes fueron incubados conjuntamente con un anticuerpo policlonal anti-MCH (1/1000), anti-NPY (1/5000), usando para ello placas individuales, por 1 hora sometidas a agitación a temperatura ambiente y después se dejaron incubar a 4 C° por toda la noche. Después de un lavado de 30 minutos en PBS, los cortes se incubaron por una hora con un anticuerpo biotilado anti-IgG-conejo diluido 1/200 en la solución. Tras un lavado en PBS por 30 minutos, los cortes fueron incubados por 1 hora con el complejo avidina-biotina unido a peroxidasa (ABC) diluido 1/100 en la solución. Después de haber procedido al lavado de los cortes en PBS por 30 minutos, se procedió a revelar los cortes con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina. Finalmente, tras lavar en PBS, las secciones se montaron en láminas, siendo posteriormente cubiertas y selladas. Estas

preparaciones fueron observadas bajo un microscopio de luz, y las imágenes fueron capturadas con una cámara de video acoplada a un sistema analizador de imágenes. Para clasificar el tipo de neurona inmunorreactiva, se realizó una valoración por tres diferentes observadores con amplio conocimiento de la neuroanatomía de la rata, estableciéndose criterios previos comunes de evaluación, basados en la cantidad de somas neuronales con significativa intensidad de marcado por inmunohitoquímica. Si las valoraciones de los observadores eran diferentes, se tomó el promedio. Estos niveles a clasificar fueron los siguientes:

Nivel 1:+ (Si hay de 1 a 5 somas inmunoteñidos por sección).

Nivel 2: ++ (Si hay de 6 a 15 somas inmunoteñidos por sección).

Nivel 3:+++ (Si hay más de 15 somas inmunoteñidos por sección).

6.8. Procedimiento de inmunotinción aplicada a los cortes obtenidos:

Los cortes primero fueron sometidos a recuperación de antígeno, para ello se sumergieron en buffer Citrato 10mM con 0.05% Tween 20, pH 6. Esta solución se sometió a calor por 2 ciclos de 5 minutos en microondas a potencia 6 (LG, 1000 W potencia).

Luego de lavar los cortes en PBS 0.1M, se inactivo la peroxidasa endógena del tejido en una solución de H₂O₂ al 3% en agua, durante 30 minutos. Luego se lavaron 3 veces en PBS.

Se utilizó suero de caballo al 2.5% como bloqueante (Vector Laboratories), se aplicó sobre las láminas durante 20 minutos. Luego los cortes fueron incubados en

los anticuerpos primarios anti rabbit durante 24 horas a 4°C: anti-NPY 1/5000 (Abcam, ab30914); anti-MCH 1/1000 (Abcam, ab174886); anti-c-FOS 1/500 (Sante Cruz Biotechnology, sc-8047)

Se lavaron en PBS 3 veces, y se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado anti mouse/rabbit (Biotinylated Universal Antibody, Vector Laboratories) 1/200 durante 1 hora, luego se lavaron en PBS 3 veces.

Se incubó en solución avidina-peroxidasa (Elite ABC Vectastain, Vector Laboratories) durante 1 hora, luego se lavaron en PBS 3 veces.

Se reveló la inmunoreacción con solución de diaminobencidina (DAB peroxidase substrate kit, Vector Laboratories) durante 1 a 5 minutos, se lavaron en agua destilada y se deshidrataron en alcoholes, aclaró en xilol y se cubrió con resina Entellan (Merck).

Análisis de Inmunoreacción NPY, MCH, c-FOS:

Se procedió a evaluar la inmunoreacción de las proteínas NPY, MCH y c-FOS en dos áreas del hipotálamo: Hipotálamo lateral (LH) y el Área Perifornical (PAF), haciendo uso del reconocimiento estructural de los cortes obtenidos y la comparación correspondiente con el atlas Paxinos.

Usando un microscopio trinocular con cámara digital (Leica, ICC50 HD, 3Mpx) se procedió a contar el número de neuronas inmunoreactivas en un área de 400 micras² a un aumento final de 400x.

6.9. Consideraciones éticas:

El ambiente en el cual se realizó todo el proceso de experimentación, fue el Bioterio del Laboratorio de Neurociencia y comportamiento (área de minilaboratorio), ubicado en el sótano del edificio del LID, el cual cuenta con los equipos mencionados para el trabajo de campo y las condiciones de mantenimiento de los animales.

La sanidad de estos grupos experimentales estuvo monitoreada por la participación del Médico Veterinario, Jefe de Bioterio de la UPCH.

Al término de la parte experimental cada animal fue anestesiado con pentobarbital sódico 60 mg/kg peso, para su correspondiente sacrificio.

6.10. Análisis Estadístico:

Se describieron las proporciones de las variables encontradas en cada grupo estudiado, evaluándose el resultado de cada una de estas. Se compararon los resultados del grupo afectado por deprivación del sueño y el grupo control usando pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas de acuerdo a las distribuciones halladas de cada variable.

Se evaluó el efecto de las múltiples variables independientes encontradas utilizando análisis de regresión de acuerdo a la concentración de neuronas teñidas inmunohistoquímicamente para los neuropéptidos a evaluar. Se comparó el grupo no expuesto a los tanques con los grupos expuestos para evaluar si dicha exposición puede afectar significativamente los niveles de neuropéptidos en los roedores estudiados.

Para el estudio de los datos de inmunohistoquímica de c-FOS se hizo el análisis de varianza de una vía con factor de grupo (Plataforma chica, Plataforma grande y Control). Las comparaciones múltiples se obtuvieron a través de la corrección de Bonferroni.

Para el estudio de los datos de inmunohistoquímica del MCH también se hizo el análisis de varianza de una vía con factor de grupo (Plataforma chica, Plataforma grande y Control). Las comparaciones múltiples se obtuvieron a través de la corrección de Bonferroni.

Para el estudio de los datos de inmunohistoquímica del NPY también se hizo el análisis de varianza de una vía con factor de grupo (Plataforma chica, Plataforma grande y Control). Las comparaciones múltiples se obtuvieron a través de la corrección de Bonferroni.

Para el Test de Campo Abierto u Openfield se hizo la prueba T de Student. La comparación entre Plataformas fue a través del análisis de varianza de una vía con

factor de grupo (Defecation, Sniffing, Grooming, Rearing y Urination). Para hacer las comparaciones múltiples en este último caso se hizo la corrección de Bonferroni. Para el Test de Morris se hizo el análisis de varianza de una vía con factor de grupo (Plataforma chica, Plataforma grande y Control). Las comparaciones múltiples se obtuvieron a través de la corrección de Bonferroni.

VII. RESULTADOS

En el Test de Campo abierto el número de ratas observadas fue de 4 en el pre test y 2 en el pos test de la plataforma chica, 3 en el pre test y 2 en el pos test de la plataforma grande, y 3 en el pretest y 2 en el pos test del grupo control, cuyos resultados se detallan en las **Tabla 1** y se resumen en la **Tabla 2**, donde se observa que el valor del post-test es superior al pre-test en general, apreciándose que después de la privación de sueño, el número de veces que las ratas olfatean y se paran es mayor, lo cual refleja mayor actividad motora y tensión; no se aprecia que el número de veces que se acicalan sea diferente. Esto se puede apreciar gráficamente en el **Gráfico 3**.

Los resultados del Test de Laberinto Acuático ó Test de Morris se observan en la **Tabla 3**, donde se observa diferencia significativa entre el tiempo en segundos (s) por grupo al comparar el grupo en la plataforma chica (grupo con privación de sueño paradójico) versus el grupo en la plataforma grande (grupo sin privación de sueño paradójico) ($p=0.002$); de igual manera, al comparar el grupo de la plataforma grande versus el grupo control ($p=0.008$) (**Tabla 4**). Se evidenció que las ratas con privación de sueño paradójico demoraron más en localizar la plataforma oculta, lo que representa menor memoria visoespacial. Esto se aprecia mejor en **Gráfico 4**.

En el conteo celular de neuronas positivas a inmunohistoquímica de proteína c-FOS (actividad neuronal) se observó diferencia en el número de neuronas en las ratas de

la plataforma chica (con privación de sueño paradójico) y la grande (sin privación) (**Tabla 5**), tanto en el núcleo perifornical (PFA) como en el hipotálamo lateral (LH), siendo significativamente menor ($p < 0,01$) en el grupo LH (**Tabla 6**), lo cual se aprecia en el **Gráfico 5**.

En el conteo celular de neuronas positivas a inmunohistoquímica hormona concentradora de melanina (MCH), también se observó diferencia significativa en el número de neuronas del grupo de ratas en la plataforma chica (con privación de sueño paradójico) comparado con el grupo en la plataforma grande (sin privación) (**Tabla 7**), tanto en el núcleo perifornical (PFA) como en el hipotálamo lateral (LH), siendo menor ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) en ambos casos en el grupo con privación (**Tabla 8**), lo cual se aprecia en el **Gráfico 6**.

En el conteo celular de neuronas positivas a inmunohistoquímica de neuropéptido Y (NPY), también se observó diferencia significativa en el número de neuronas que lo expresaban, entre el grupo de ratas en la plataforma chica (con privación de sueño paradójico) y el grupo en la plataforma grande (sin privación) (**Tabla 9**), tanto en el núcleo perifornical (PFA) como en el hipotálamo lateral (LH), siendo menor ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) en ambos casos en el grupo con privación (**Tabla 10**), lo cual se aprecia en el **Gráfico 7**.

VIII. DISCUSIÓN

El presente trabajo examinó la relación entre los efectos de la privación de sueño REM en roedores, los cuales fueron sometidos a un alojamiento que poseía para un grupo plataforma chica (con restricción de movimiento), rodeada de agua y para otro grupo plataforma grande (sin restricción de movimiento) rodeada de agua, para proceder inmediatamente a los días de evaluación en campo al sacrificio y a la cuantificación de MCH/c-FOS y la de NPY/c-FOS, lo cual fue evidenciado por la reacción inmunohistoquímica, lo que permite una mejor comprensión sobre el papel de las neuronas MCH-érgicas y NPY-érgicas en los núcleos peri-fornical e hipotálamo lateral, en la regulación del sueño REM y no-REM. Además podemos comparar las cantidades de neuronas que reaccionan MCH-érgicas y las NPY-érgicas en los núcleos peri-fornical e hipotálamo lateral durante la privación de sueño en ratas.

El efecto de la privación de sueño se evidenció en tensión (mediante la prueba de campo abierto) y en pérdida de memoria (mediante la prueba del laberinto subacuático).

En la prueba de campo abierto, fueron usados 5 parámetros para evaluar: defecación, olfateo, acicalamiento, pararse, orinar, tal como lo propone Sebov ³⁹; aunque en los trabajos de Goma y Tobeña ⁴⁰, y Martin-Arenas y Pintado ⁴¹ se hace mención que no hay unidad estandarizada de medidas ni métodos estadísticos en esta prueba. Esta prueba se usa comúnmente para medir el comportamiento animal

en un área determinada por una caja, la cual puede poseer diferentes medidas ⁴²; la medida del contenedor (caja) usado para este trabajo fue de 60 cm de largo y ancho, y 60 cm de alto. Esta prueba es usada para medir la movilidad y la ansiedad de animales ⁴³, mediante el uso de un software ³⁹, especialmente para ratas y ratones ^{39, 44, 45}. Pudiendo constatar que efectivamente tanto la movilidad y ansiedad se ven afectadas por la exposición a la privación de sueño.

Para la prueba del laberinto subacuático se usó una piscina circular pintada de negro con un diámetro de 180 cm y una altura de 76 cm. Realizando en cada caso 4 intentos para que la rata llegue a la plataforma sumergida. Se pueden usar otras dimensiones, por ejemplo Jiang y col. ⁴⁶ usaron un tanque circular de 90 cm de diámetro y 50 cm de altura. Se trata de un procedimiento simple que puede durar 6 días y que nos permite diferenciar entre la condición espacial (plataforma oculta) y no espacial (plataforma visible) ⁴⁷. En este trabajo la prueba demoró 12 días. En este trabajo se comprobó que la falta de sueño afecta a la memoria, lo que se evidencia con esta prueba ⁴⁸. Esta prueba se usa fundamentalmente para evaluar la memoria ^{49, 50, 51}, con la cual pudimos evidenciar que realmente la memoria visoespacial se ve afectada en los animales sometidos a privación.

Se encontró que el Neuropeptido Y, se relaciona con la privación de sueño, pero en el trabajo de Hwang y Lee ⁵² lo relaciona con la alimentación y la excitación. Se detectó la presencia de Neuropeptido Y en el núcleo perifornical y en el hipotálamo lateral, pero Hwang y Lee ⁵² lo detectaron principalmente en la amígdala, también detectaron MCH en el hipotálamo lateral. En este trabajo se demostró la presencia

de Neuropeptido Y en las regiones mencionadas, y que a su vez este experimenta una reducción en cuanto a su expresión durante el proceso de privación de sueño paradójico.

Las neuronas que utilizan la hormona concentradora de melanina (MCH) ubicadas en el hipotálamo lateral ⁵³ y en el núcleo perifornical, se han visto implicados en procesos críticos como el sueño ^{22, 23, 53, 54}, como se comprobó en este trabajo. La MCH también regula otras funciones como la alimentación ^{55, 56} y siguen variaciones del ciclo circadiano ^{55, 57}. Esto se ha comprobado en diversas especies, como ratas, ratones, gatos ⁵³, etc. Además del hipotálamo lateral y del núcleo perifornical, la MCH se localiza en otras regiones ⁵⁶. La presencia de MCH se evidencia cuando hay privación de sueño ⁵⁸. En este trabajo se demostró la presencia de MCH en las regiones mencionadas, y que a su vez esta experimenta una reducción en cuanto a su expresión durante el proceso de privación de sueño paradójico.

Se encontró que cuando hay privación de sueño en ratas, en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral se expresan la hormona concentradora de melanina (MCH) y Neuropeptido Y (MPY). Las referencias ^{59, 60, 61, 62} indican que el hipotálamo lateral desempeña un rol fundamental en diversas funciones y estados, en los que incluyen los estados de sueño y vigilia, y expresan múltiples neuropeptidos ¹⁸ incluyendo la hipocratina en la vigilia y la MCH en el sueño. Alteraciones en el hipotálamo lateral producen alteraciones en el sueño y la vigilia ^{63, 64, 65}. Las referencias también confirman que el núcleo perifornical está

relacionado con la actividad sueño-vigilia y otras funciones ^{66, 67, 68, 69}. Otros núcleos ejercen control sobre las neuronas del área perifornical-hipotálamo lateral ^{70, 71} y este a su vez afecta otras áreas ^{72, 73}.

Se comprobó que en la privación de sueño se expresa MCH y NPY pero hay otras sustancias que están implicadas en la regulación del ciclo sueño-vigilia ^{6, 74, 75, 76, 77, 78, 79} y varios mecanismos ^{80, 81, 82}. Por ejemplo el GABA influye en el sueño ^{83, 84}, Ca^{2+} en el núcleo del rafe dorsal afecta la regulación sueño-vigilia ⁸⁵. La alimentación en la noche induce la desincronización del ciclo sueño-vigilia ^{86, 87}.

El sueño puede presentar trastornos o patologías ⁸⁸, tenemos por ejemplo el agotamiento profesional ¹, la enfermedad del sueño ^{89, 90}, las pesadillas postraumáticas ⁹¹, la narcolepsia ^{92, 93, 94, 95}. También existen fármacos para sus tratamientos ⁹⁶.

El hipotálamo produce varias sustancias con diversas funciones ^{18, 97, 98}. En este trabajo solo fue dirigido hacia la producción y comportamiento de MCH y del NPY en este estudio pero hay varias sustancias y varias estructuras involucradas en el ciclo sueño-vigilia ^{99, 100}. Se observa activación y silenciamiento de neuronas ¹⁰¹. Diversos fármacos ¹⁰² tienen efectos fisiológicos ¹⁰³ o terapéuticos ¹⁰⁴.

IX. CONCLUSIONES

Se encontró tendencia a que cuando había privación del sueño disminuyeron la frecuencia de olfateo y de paradas en dos patas (comportamiento) de los animales en estudio.

Se encontró que la privación del sueño afectó de manera negativa aspectos cognitivos como la memoria visuoespacial en los animales en estudio (disminución en la memoria)

Se encontró neuronas activas en el núcleo perifornical e hipotálamo lateral tanto de aquellos animales que fueron sometidos a privación de sueño paradójico como de aquellos que no lo fueron. La inmunohistoquímica realizada en estas regiones cerebrales nos indica que estas neuronas activas muestran expresión de MCH y NPY.

Las neuronas activas tanto en el núcleo perifornical e hipotálamo lateral de los animales que fueron sometidos a privación de sueño muestran una reducción en la expresión de MCH y NPY.

X. RECOMENDACIONES

Realizar estudios con un mayor tamaño de muestra, para comprobar las tendencias encontradas. También, a partir del entendimiento del comportamiento en la producción de estos neuropeptidos en los centros descritos (Hipotálamo lateral y el núcleo perifornical), sería importante iniciar nuevos estudios en la investigación y uso de nuevos fármacos relacionados a reducir los posibles efectos negativos a nivel de comportamiento y memoria, como consecuencia de la privación de esta función biológica tan importante como lo es sueño.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Metlaine A, Sauvet F, Gomez-Merino D, Boucher T, Elbaz M, Delafosse JY, et al. Sleep and biological parameters in professional burnout: A psychophysiological characterization. *Plos One*. 2018;1-15.
2. Koban M, Le W, Hoffman G. Changes in Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone, Neuropeptide Y, and Proopiomelanocortin Gene Expression during Chronic Rapid Eye Movement Sleep Deprivation of Rats. *Endocrinology*. 2006;147(1):421-431.
3. Franco-Pérez J, Ballesteros-Zebadúa P, Custodio V, Paz C. Principales *Invest Clin*. 2012;64(2):182-192.
4. Próspero-García O, Méndez-Díaz M, Ruiz-Contreras AE, Pérez-Morales M. Neuropeptidos y genes del sueño. En: Sociedad Española del Sueño, editores. *Tratado de medicina del sueño* 1a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2015. p. 124-129.
5. Salín R. Hipocretinas y adenosina en la regulación del sueño. *Rev Neurol* 2004;39(4):354-358.
6. Vogel GW. A review of REM sleep deprivation. *Arch Gen Psychiat*. 1975;(32):749-761.
7. Benington JH, Kodali SK, Heller HC. Scoring Transitions to REM Sleep in Rats Based on the EEG Phenomena of Pre-REM Sleep: An Improved Analysis of Sleep Structure. *Sleep*. 1994;17(1):28-36.
8. Garcia-Rill E, Heister DS, Ye M, Charlesworth A, Hayar A. Electrical Coupling: Novel Mechanism for Sleep-Wake Control. *Sleep*. 2007;30(11):1405-1414.
9. Paz C. Papel de las Sinapsis eléctricas en la regulación del ciclo sueño-vigilia de la rata [Tesis doctoral]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
10. Datta S. Cellular and Chemical Neuroscience of Mammalian Sleep. *Sleep Med*. 2010;11(5):431-440.
11. Brown R, Basheer R, McKenna J, Strecker R, McCarley R. Control of Sleep and Wakefulness. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1087-1287.

12. Próspero-García O, Guzmán K, Méndez-Díaz M, Herrera-Solís A, Ruiz-Contreras A. Genes del sueño. *Rev Neurol*. 2009;48(4):199-206.
13. Jouvet D, Vimont V, Delorme F, Jouvet M. Étude de la privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *C R Soc Biol*. 1964;(158):756-759.
14. Cohen HB, Dement WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of paradoxical phase. *Science*. 1965;(150):1318-1319.
15. De Lecea L, Bourgin P. Neuropeptide interactions and REM sleep: A role for Urotensin II. *Peptides*. 2008;29:845-851.
16. Prospero-Garcia O, Mendez-Diaz M. The role of neuropeptides in sleep modulation. *Drug News Perspect*. 2004;17:518-522.
17. Pascual-Leone A. Eje cerebro-intestinal: orexinas. *Anal Real Acad Nac Farm*. 2004;70:905-931.
18. Novati A, Roman V, Cetin T, Hagewoud R, Den Boer JA, Luiten PG, et al. Chronically Restricted Sleep Leads to Depression-Like Changes in Neurotransmitter Receptor Sensitivity and Neuroendocrine Stress Reactivity in Rats. *Sleep*. 2008;31(11):1579-1585.
19. Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, et al. Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and REM sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. *Neurochemistry International*. 2011;(59):686-694.
20. Torterolo P, Scorza C, Urbanavicius J, Devera A, Benedetto L, Pascovich C, et al. Avances en el estudio de la neurobiología de la depresión: rol de la hormona concentradora de melanina. *Rev Méd Urug* 2014;30(2):8-16.
21. Varin C, Luppi P, Fort P. Melanin-Concentrating Hormone-expressing neurons adjust slow-wave sleep dynamics to catalyze paradoxical (REM) Sleep. *Sleep Research Society*. 2018;1-34.
22. Monti J, Torterolo P, Lagos P. Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*. 2013;17:293-298.

23. Mendelson WB, Guthrie RD, Frederick G, Wyatt R.J. The flower potential technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacol Biochem Behav.* 1974;2:553-556.
24. Van Luijtelaar ELJM, Coenen AML. Electrophysiological evaluation of three PS deprivation techniques in rats. *Physiol Behav.* 1986;(36):603- 609.
25. Dement W, Henry P, Cohen H, Ferguson J. Studies on the effects of REM deprivation in humans and in animals. In: Kety S, Evarts E, Williams H, editors. *Sleep and Altered States of Consciousness.* Baltimore: Wlliams and Wilkins; 1967, p. 456-468.
26. Forcina-Martins PJ, Soares-Marques M, Tufik S, D'Almeida V. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation. *Am J Physiol Metab.* 2010;298:E726-E734.
27. Van Elzakker M, Fevurly RD, Breindel T, Spencer RL. Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem.* 2008;15:899-908.
28. Albert IB. REM sleep deprivation. *Biol Psychiat.* 1975;(10):341-351
29. Mathangi DC, Shyamala R, Subhashini AS. Effect of REM sleep deprivation on the antioxidant status in the brain of Wistar rats. *Annals of Neurosciences.* 2012;19(4):161-164.
30. Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research.* 2004;(1004):45-51.
31. Murison R, Ursin R, Coover GD, Lien W, Ursin H. Sleep deprivation procedure produces stomach lesions in rats. *Physiol Behav.* 1982;(29):693-694.
32. Stern W. Acquisition impairment following rapid eye movement sleep deprivation in rats. *Physiol Behav.* 1971;(7):345-352.
33. Van Luijtelaar ELJM, Kaiser J, Coenen AML. Deprivation of paradoxical sleep and intracranial self-stimulation. *Sleep.* 1982;(5):284-289.

34. Mougín F, Simon-Rigaud ML, Mougín C, Bourdin H, Jacquier M, Henriët MT, et al. Met-enkephalin, B-endorphin and cortisol responses to sub-maximal exercise after sleep disturbances. *Eur J Appl Physiol.* 1992;64:371-376.
35. Ogilvie RD, Broughton RJ. Sleep deprivation and measures of emotionality in rats. *Psychophysiology.* 1976;(13):249-260.
36. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin.* 1976;(83):482-504.
37. Buccafusco J, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* [Internet]. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor & Francis; 2009 [accesado mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5228/>
38. Sebov K. Deep Rearing: Mice Behaviour Analysis in Open Field Test using CNN. Stanford University, Convolutional Neural Networks for Visual Recognition Reports. 2017;1-7.
39. Goma M, Tobeña A. Reliability of Various Measures Obtained in Open-Field Test. *Psychological Reports.* 1978;43:1123-1128.
- 41 Martin-Arenas FJ, Pintado CO. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. In: Spink AJ, Loijens LWS, Woloszynowska-Fraser M, Noldus PJJ, editors. *Measuring Behavior 2014. Procedente de la 9na Conferencia Internacional en Métodos y Técnicas en Investigación de Comportamiento; 2014 Ago 27-28. Wageningen, The Netherlands: Noldus Information Technology; 2014. p. 322-326.*
- 42 TaIwo-Olanrewaju A. *The Open field and Animal behavior.* [Bachelor Thesis]. Nigeria: Ladoke Akintola University of Technology; 2015.
- 43 Stanford SC. The Open Field Test: Reinventing The wheel. *J Psychopharmacol.* 2007;21(2):134-135.
- 44 Seibenhener ML, Wooten MC. Use of The Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp.* 6 Feb 2015;(96):e52434. doi: 10.3791/52434

- 45 Wersinger S. Standard Operating Procedure for The Open Field Test for Mice. [Internet]. New York: University at Buffalo WNYSTEM; 2011 [accesado mayo de 2017]. Disponible en: http://www.buffalo.edu/content/www/wnystem/sop/_jcr_content/par/download_1226384990/file.res/SOP11.0%20Open%20Field.pdf
- 46 Jiang J, Gao K, Zhou Y, Xu A, Shi S, Liu G, et al. Electroacupuncture Treatment Improves Learning-Memory Ability and Brain Glucose Metabolism in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Using Morris Water Maze and Micro-PET. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;(142129):1-7.
- 47 Bromley K, Deng Y, Song W. Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. *Journal of Visualized Experiments.* 2011;53:1-5.
- 48 Walsh C, Booth V, Poe G. Spatial and reversal learning in the Morris Water Maze are largely resistant to six hours of REM sleep deprivation following training. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 2011;18:422-434.
- 49 Vorhees C, Williams M. Morris Water Maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1(2):848-858.
- 50 Wenk G. Assessment of Spatial Memory Using the Radial Arm Maze and Morris Water Maze. *Current Protocols in Neuroscience.* 2004;26:8.5A.1-8.5A.12.
- 51 Barnhart C, Yang D, Lein P. Using the Morris Water Maze to Assess Spatial Learning and Memory in Weanling Mice. *PLoS One.* 2015;10(4):1-16.
- 52 Hwang YG, Lee HS. Neuropeptide Y (NPY) or cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) fiber innervation on central and medial amygdaloid neurons that project to the locus coeruleus and dorsal raphe in the rat. *Brain Res.* 2018 Jun 15;1689:75-88.
- 53 Costa A, Castro-Zaballa S, Lagos P, Chase MH, Tartorolo P. Distribution of MCH-containing fibers in the feline brainstem: relevance for REM sleep regulation. *Péptidos.* 2018;104:50-61.

- 54 Jancsik V, Bene R, Sótonyi P, Zachar G. Sub-cellular organization of the melanin-concentrating hormone neurons in the hypothalamus. *Péptidos*. 2017;99:56-60.
- 55 Gerics B, Szalay F, Sótonyi P, Jancsik V. Diurnal Variation of the Melanin-concentrating Hormone Level in the Hypothalamus. *Acta Biologica Hungarica*. 2017;68(1)14-21.
- 56 Ferreira JGP, Bittencourt JC, Adamantidis A. Melanin-concentrating hormone and sleep. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;44:152-158.
- 57 Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, et al. Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and REM sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. *Neurochem Int*. 2011;59(5):686-694.
- 58 Bringgs C, Hirasawa M, Semba K. Sleep deprivation distinctly alters glutamate transporter 1 apposition and excitatory transmission to orexin and MCH neurons. *J Neurosci*. 2018;38(10):2505-2518.
- 59 Tyree SM, De Lecea L. Lateral Hypothalamic Control of the Ventral Tegmental Area: Reward Evaluation and the Driving of Motivated Behavior. *Front Syst Neurosci*. 2017;11(50):1-9.
- 60 Clément O, Sapin E, Libourel PA, Arthaud S, Brischoux F, Fort P, et al. The Lateral Hypothalamic Area Controls Paradoxical (REM) Sleep by Means of Descending Projections to Brainstem GABAergic Neurons. *J Neurosci*. 2012;32(47):16763-16774.
- 61 Yamashita T, Yamanaka A. Lateral hypothalamic circuits for sleep-wake control. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;44:94-100.
- 62 Herrera CG, Ponomarenko A, Korotkova T, Burdakov D, Adamantidis A. Sleep & Metabolism: The multitasking ability of lateral hypothalamic inhibitory circuitries. *Front Neuroendocrinol*. 2017;44:27-34.
- 63 Clasamonte J, Scemes E, Wang Z, Boison D, Haydon PG. Connexin 43-Mediated Astroglial Metabolic Networks Contribute to the Regulation of the Sleep-Wake Cycle. *Neuron*. 2017;95(6):1365-1380.

- 64 Yao L, Ramirez AD, Roecker AJ, Fox SV, Uslaner JM, Smith SM, et al. The dual orexin receptor antagonist, DORA-22, lowers histamine levels in the lateral hypothalamus and prefrontal cortex without lowering hippocampal acetylcholine. *J Neurochem.* 2017;142(2):204-214.
- 65 Fidel K, Meijer JH, Deboer T. Long-term effects of sleep deprivation on neuronal activity in four hypothalamic areas. *Neurobiol Dis.* 2018;109:54-63.
- 66 Tortorella S, Rodrigo-Angula ML, Nuñez A, Garzon M. Synaptic interactions between perifornical lateral hypothalamic area, locus coeruleus nucleus and the oral pontine reticular nucleus are implicated in the stage succession during sleep-wakefulness cycle. *Front Neurosci.* 2013;7(216):1-9.
- 67 Horii-Hayashi N, Susagawa T, Hashimoto T, Kaneko T, Takeuchi K, Nishi M. A newly identified mouse hypothalamic area having bidirectional neural connections with the lateral septum: the perifornical area of the anterior hypothalamus rich in chondroitin sulfate proteoglycans. *Eur J Neurosci.* 2015;42(6):2322-2334.
- 68 Alam MN, Kumar S, Suntsova N, Bashir T, Szymusiak R, McGinty D. GABAergic regulation of the perifornical-lateral hypothalamic neurons during non-rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience.* 2010;167(3):920-928.
- 69 Alam MN, Gong H, Alam T, Jaganath R, McGinty D, Szymusiak R. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J Physiol.* 2002;538(2):619-631.
- 70 Suntsova N, Guzman-Marin R, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D. The Median Preoptic Nucleus Reciprocally Modulates Activity of Arousal-Related and Sleep-Related Neurons in the Perifornical Lateral Hypothalamus. *J Neurosci.* 2007;27(7):1616-1630.
- 71 Alam MN, Kumar S, Rai S, Methippara M, Szymusiak R, McGinty D. Role of Adenosine A1 Receptor in the Perifornical-Lateral Hypothalamic Area in Sleep-Wake Regulation in Rats. *Brain Res.* 2009;1304:96-104.

- 72 Nuñez A, Moreno-Balandran ME, Rodrigo-Angulo ML, Garzon M, De Andrés I. Relationship between the perifornical hypothalamic area and oral pontine reticular nucleus in the rat. Possible implication of the hypocretinergic projection in the control of rapid eye movement sleep. *Eur J Neurosci*. 2006;24(10):2834-2842.
- 73 Khanday MA, Mallick BN. REM sleep modulation by perifornical orexinergic inputs to the pedunculo-pontine tegmental neurons in rats. *Neuroscience*. 2015;308:125-133.
- 74 Franco-Pérez J, Ballesteros-Zebadúa P, Custodio V, Paz C. Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia. *Revista de Investigación Clínica*. 2012;64(2):182-191.
- 75 Ono D, Yamanaka A. Hypothalamic regulation of the sleep/wake cycle. *Neurosci Res*. 2017;118:74-81.
- 76 Kiel-Marínez AL. Participación de la Orexina-A en ratas sometidas a estrés por inmovilización sobre la arquitectura del sueño [Tesis para Licenciatura]. México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2004.
- 77 Díaz-Negrillo A. Bases bioquímicas implicadas en la Regulación del sueño. *Arch Neurocién (Mex)*. 2013;18(1):42-50.
- 78 Carús-Cadavieco M, De Andrés I. Adenosina y control homeostático del sueño. Acciones en estructuras diana de los circuitos de vigilia y sueño. *Rev Neurol*. 2012;55(7):413-420.
- 79 Hoffman GE, Koban M. Hypothalamic L-Histidine Decarboxylase Is Up-Regulated During Chronic REM Sleep Deprivation of Rats. *PLoS ONE*. 20 Dec 2016;11(12):e0152252. doi: 10.1371/journal.pone.0152252
- 80 Ocampo-Garcés A, Castro J, Espinoza D. Mecanismos neurales en el control del dormir. *Rev Hosp Clin Univ Chile*. 2012;23:5-12.
- 81 Hall S, Deurveilher S, Ko KR, Burns J, Semba K. Region-specific increases in Fos B/ Δ Fos B immunoreactivity in the rat brain in response to chronic sleep restriction. *Behav Brain Res*. 2017;322(A):9-17.

- 82 Martínez-Vargas D. Efecto de la estimulación eléctrica del nervio vago y del núcleo del tracto solitario sobre la actividad electroencefalográfica y la distribución temporal del ciclo sueño-vigilia en el gato [Tesis doctoral]. España, Sevilla: Universidad Pablo de Olavide; 2014.
- 83 Xie JF, Fan K, Wang C, Xie P, Hou M, Xin L, et al. Inactivation of the Tuberomammillary Nucleus by GABAA Receptor Agonist Promotes Slow Wave Sleep in Freely Moving Rats and Histamine-Treated Rats. *Neurochem Res.* 2017;42:2314-2325.
- 84 Chung S, Weber F, Zhong P, Tan CL, Nguyen T, Beier KT, et al. Identification of Preoptic Sleep Neurons Using Retrograde Labeling and Gene Profiling. *Nature.* 2017;545(7655):477-481.
- 85 Cui SY, Li SJ, Cui XY, Zhang XQ, Yu B, Huang YL, et al. Ca²⁺ in the dorsal raphe nucleus promotes wakefulness via endogenous sleep-wake regulating pathway in the rats. *Mol Brain.* 2016;9(71):1-10.
- 86 Wang D, Opperhuizen AL, Reznick J, Turner N, Su Y, Cooney GJ, et al. Effects of feeding time on daily rhythms of neuropeptide and clock gene expression in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 2017;1671:93-101.
- 87 Ramirez-Plascencia OD, Saderi N, Escobar C, Salgado-Delgado RC. Feeding during the rest phase promotes circadian conflict in nuclei that control energy homeostasis and sleep-wake cycle in rats. *Eur J Neurosci.* 2017;45(10):1325-1332.
- 88 Valencia MH, Cassiani CA, Cardona JC, Villalobos-Talero J. El sistema orexinérgico/hipocretinérgico y su rol en los trastornos del sueño. *Salud Uninorte.* 2010;26(2):285-297.
- 89 Rijo-Ferreira F, Carvalho T, Alfonso C, Sanches-Vaz M, Costa RM, Figueiredo LM, et al. Sleeping sickness is a circadian disorder. *Nat Commun.* 2018;9(62):1-13.
- 90 Laperchia C, Xu YZ, Ngoyi DM, Cotrufo T, Bentivoglio M. Neural Damage in Experimental *Trypanosoma brucei gambiense* Infection: Hypothalamic Peptidergic Sleep and Wake-Regulatory Neurons. *Front Neuroanat.* 2018;12(13):1-11.

- 91 Yu B, Cui SY, Zhang XQ, Cui XY, Li SJ, Sheng ZF, et al. Mechanisms Underlying Footshock and Psychological Stress-Induced Abrupt Awakening From Posttraumatic “Nightmares”. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(4):1-6.
- 92 Arias-Carrión O. Sistema hipocretinérgico y narcolepsia. *Rev Méd Chile*. 2009;137:1209-1216.
- 93 Arias-Carrion O, Ortega-Robles E, De Celis-Alfonso B, Palasz A, Murillo-Rodriguez E, Mendez-Rojas MA, et al. Progenitor Cell Proliferation in the Subventricular Zone in a Model of Narcolepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2018;17(2):106-112.
- 94 Arias-Carrión O. Narcolepsia y sistema hipocretinérgico. *Revista Médica de la UAS*. 2010;1(4):32-40.
- 95 Martínez-Rodríguez JE. El Sistema hipocretina/orexina en la fisiopatología de las hipersomnias de origen central [Tesis doctoral]. España, Barcelona: Universidad de Barcelona; 2006.
- 96 Zhang MQ, Wang TX, Li R, Huang ZL, Han WJ, Dai XC, et al. Helicid alleviates pain and sleep disturbances in a neuropathic pain-like model in mice. *J Sleep Res*. 2017;26(3):386-393.
- 97 Roelfsema F, Boelen A, Kalsbeek A, Fliers E. Regulatory aspects of the human hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017;31(5):487-503.
- 98 Gómez-Torres N, Aguilera-Reyes N, Galicia-Castillo O. Las orexinas dos péptidos hipotalámicos: Su localización y acción en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. *Rev Méx Neuroci*. 2014;15(6):345-350.
- 99 Luppi PH, Fort P. Neuroanatomical and Neurochemical Bases of Vigilance States. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 24 Feb 2018. doi: 10.1007/164_2017
- 100 Ono D, Yamanaka A. Hypothalamic regulation of the sleep/wake cycle. *Neurosci Res*. 2017;118:74-81.

- 101 Fujita A, Bonnavion P, Wilson MH, Mickelsen LE, Bloit J, De Lecea L, et al. Hypothalamic Tuberomammillary Nucleus Neurons: Electrophysiological Diversity and Essential Role in Arousal Stability. *J Neurosci.* 2017;37(39):9574-9592.
- 102 Equihua-Benitez AC, Guzman-Vasquez K, Drucker-Colin R. Understanding sleep-wake mechanisms and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(7):643-657.
- 103 Bonaventure P, Dugovic C, Shireman B, Preville C, Yun S, Lord B, et al. Evaluation of JNJ-54717793 a Novel Brain Penetrant Selective Orexin 1 Receptor Antagonist in Two Rat Models of Panic Attack Provocation. *Pharmacol.* 2017;8(357):1-13.
- 104 Mavanjí V, Butterick TA, Duffy CM, Nixon JP, Billington CJ, Kotz CM. Orexin/hypocretin treatment restores hippocampal-dependent memory in orexin-deficient mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2017;146:21-30.
- 105 Polanco L A, Vargas-Irwin C, GóngoraModelos M E. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica,* Vol. 2011;18 (2)141-148.
- 106 Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods,* 1984;11:47-60.
- 107 Smith A D. *IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences: Immunohistochemistry II.* Vol. 14 ed Cuello A C. Montreal: McGill-University; 1993.

ANEXOS

Gráfico 1. Grupos y Procedimientos

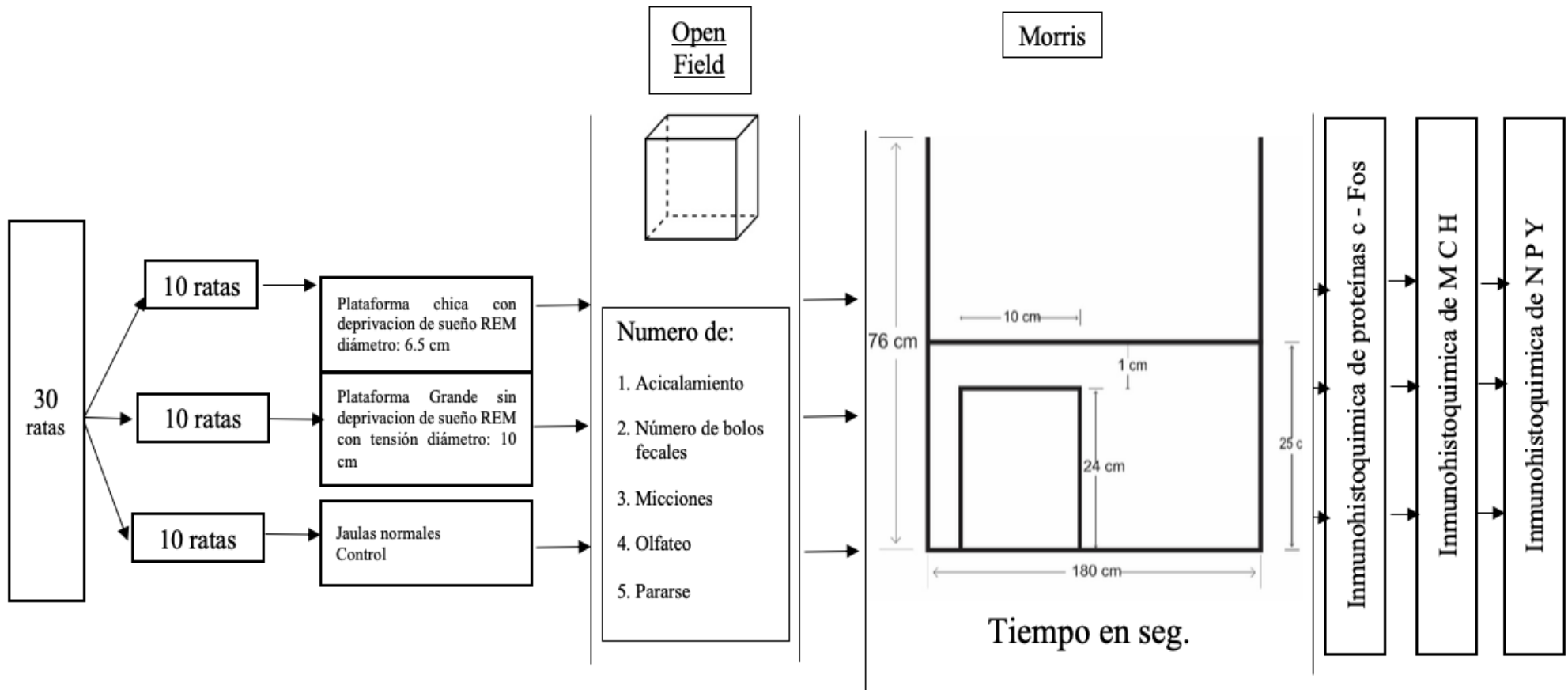
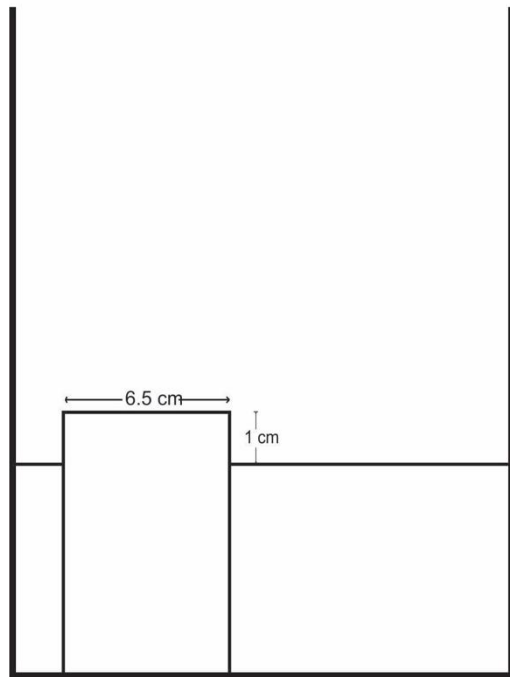


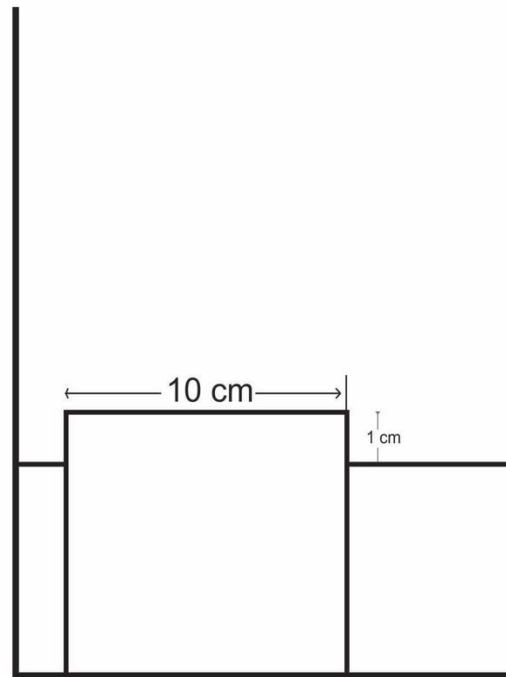
Gráfico 2. Plataformas

Plataforma chica



10 ratas

Plataforma Grande



10 ratas

Control



Jaulas normales
10 ratas

Tabla1. Resultados del Test de campo abierto (*Open-Field*).

Open – Field

Plataforma – Chica

Conducta	Pre – Test (n=4)				Post – Test (n=2)	
Defecación	1	1	1	1	1	1
Olfateo	60	55	44	56	59	66
Acicalamiento	2	5	4	4	3	4
Pararse	29	30	17	20	39	38
Orinar	1	1	1	1	1	1

Plataforma – Grande

Conducta	Pre – Test (n=3)				Post – Test (n=2)	
Defecación	1	1	1		1	1
Olfateo	60	53	48		76	73
Acicalamiento	2	5	4		7	8
Pararse	29	31	17		30	30
Orinar	1	1	1		1	1

Control

Conducta	Pre – Test (n=3)				Post – Test (n=2)	
Defecación	1	1	1		1	1
Olfateo	62	55	45		59	77
Acicalamiento	2	5	4		4	7
Pararse	31	31	18		40	32
Orinar	1	1	1		1	1

Siendo “n” el número de animales por grupo.

Tabla 2. Resumen de resultados del Test de campo abierto (*Open-Field*).

En el análisis estadístico del Test de Campo Abierto u *Open-Field* se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla: Openfield

	Pre-Test		Post-Test	
	Media	DE	Media	DE
Plataforma Chica				
Defecación	1.00	0.00	1.00	0.00
Olfateo	53.75	6.85	62.50	4.95
Acicalamiento	3.75	1.26	3.50	0.71
Pararse	24.00	6.48	38.50	0.71
Orinar	1.00	0.00	1.00	0.00
Plataforma Grande				
Defecación	1.00	0.00	1.00	0.00
Olfateo	53.67	6.03	74.50	2.12
Acicalamiento	3.67	1.53	7.50	0.71
Pararse	25.67	7.57	30.00	0.00
Orinar	1.00	0.00	1.00	0.00
Control				
Defecación	1.00	0.00	1.00	0.00
Olfateo	54.00	8.54	68.00	12.73
Acicalamiento	3.67	1.53	5.50	2.12
Pararse	26.67	7.51	36.00	5.66
Orinar	1.00	0.00	1.00	0.00

* Análisis de resultado

Gráfico 3. Comparación antes-después del Test de campo abierto (*Open-Field*).

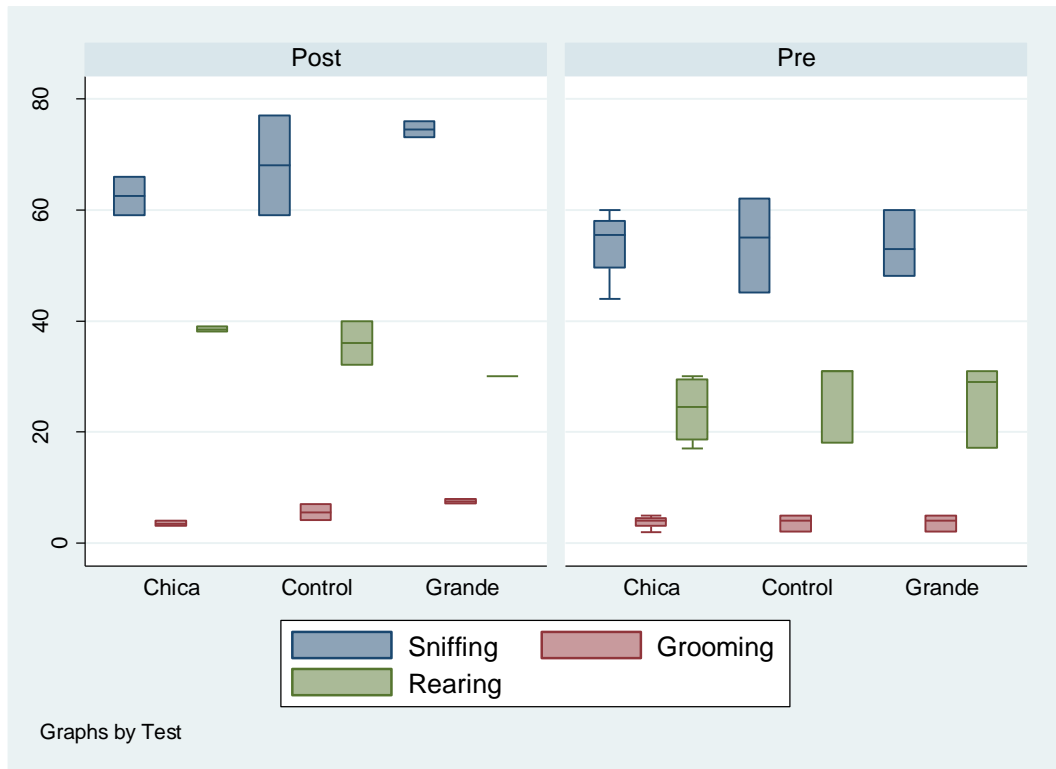


Tabla 3. Resultados del Test de Laberinto Acuático.

		JAULA (Los que serán plataforma chica)		JAULA (Los que serán plataforma grande)		JAULA (Los que serán control)		
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
ANTES	1er día	29.06901	60.525336	9.804215	26.504982	34.543235	35.323876	1er Intento
	sin sueño	49.828648	64.686016	12724995	60.783124	45.254686	42.789547	2do intento
	7-9-17	13.666058	60.898	12.305081	60.663405	39.654765	39.095427	3er intento
	- 2	5.514891	60.759685	14.360161	9.566322	51.76398	16.757643	4to intento
	2do día	68.164918	59.501059	6.247653	16.526102	37.786854	31.987065	1er Intento
	sin sueño	60242539	7.95214	6.511414	5.276818	42.090892	34.989065	2do intento
	8-9-17	60.590023	13.88366	3.663448	9.40294	41.085278	26.986543	3er intento
	- 1	5.735484	23.741896	3.919538	4.897315	32.980765	35.989543	4to intento
		Plataforma chica		Plataforma grande		Jaula - control		
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	
DESPUES	3er día	8.372881	26.03663	14.774117	8.167222	14.12469	32.648379	1er Intento
	con sueño	15.791998	40.330241	12.468858	5.343578	18.976323	27.094783	2do intento
	14-9-17	30.841975	19.349666	3.067026	5.434006	20.987653	29.745432	3er intento
	- 1	7.701681	10.709495	18.727821	3.9319991	19.109866	25.893234	4to intento
	4to día	31.064248	1.11261	3.767366	8.977558	21.987602	16.873234	1er Intento
	con sueño	24.896659	21.877168	7.931313	19.870367	20.109862	20.763902	2do intento
	15-9-17	21.702159	3.638976	22.334294	14.060831	16.297643	15.973123	3er intento
	- 2	11.860008	2.169035	14.241151	9.394734	15.873792	19.673542	4to intento
	5to día	12.486553	33.379424	4.258831	5.988308	17.234997	13.94583356	1er Intento
con sueño	53.97504	23.572555	7.120264	14.925958	6.374894	7.867323	2do intento	
19-9-17	8.160185	10.975362	4.312056	4.551881	8.234526	9.234567	3er intento	
- 3	23.102896	5.321674	5.946677	5.055673	11.213679	10.873434	4to intento	

Segundos

Tabla 4. Prueba ANOVA de una vía entre grupos del Test de Laberinto Acuático.

Tabla: Morris

	Media	DE	p*
Post-Test			
Plataforma Chica	18.68	13.07	0.001
Plataforma Grande	9.36	5.67	
Control	17.70	6.98	

* Análisis de varianza de una vía

Gráfico 4. Comparación de grupos del Test de Laberinto Acuático.

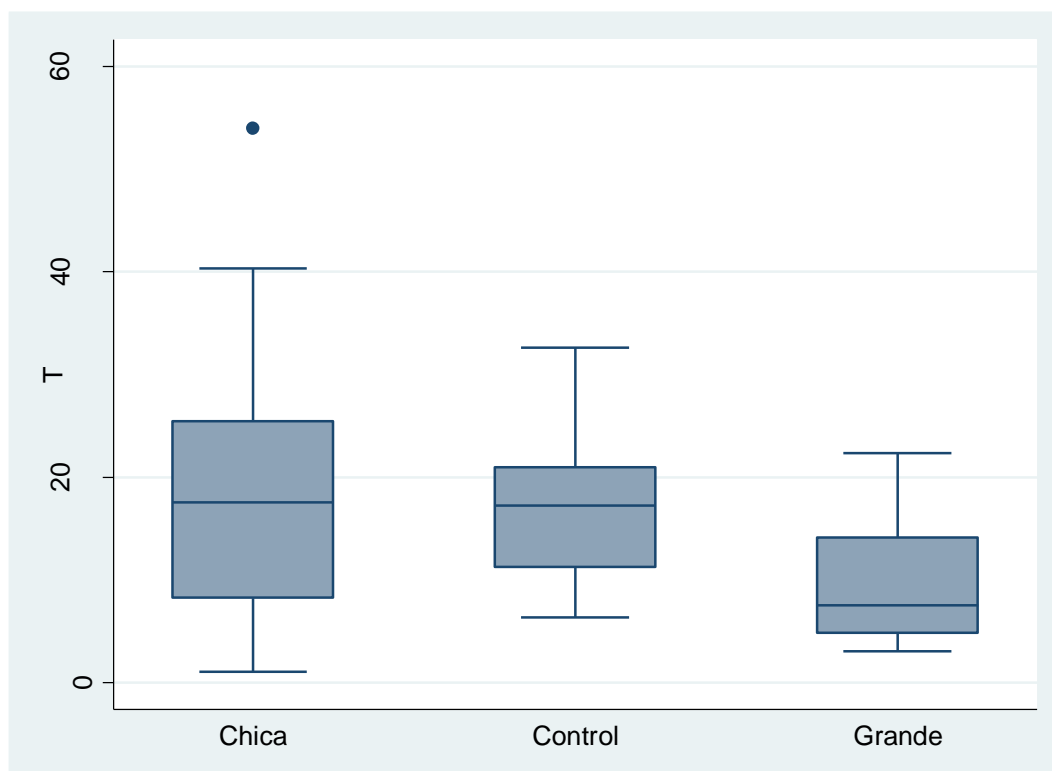


Tabla 5. Conteo celular de neuronas positivas a inmunohistoquímica de proteína c-FOS, en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral

A <u>cel cFOS + Núcleo Perifornical (PFA) (400 μm²)</u>			
Rata N ^o	Plataforma Chica (#)	Plataforma Grande (#)	Control (#)
1 ^a	5	23	47
2 ^a	11	11	19
3 ^a	9	22	34
4 ^a	8	51	
5 ^a	32	24	
6 ^a	17	21	
	Me = 10	Me = 22.5	Me = 34

B <u>cel cFOS + Hipotálamo Lateral (LH) (400 μm²)</u>			
Rata N ^o	Plataforma Chica (#)	Plataforma Grande (#)	Control (#)
1B	5	31	39
2B	10	19	18
3B	9	34	29
4B	7	46	
5B	28	25	
6B	10	28	
	Me = 9.5	Me = 29.5	Me = 29

Tabla 6. Neuronas positivas a proteína c-FOS, en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral, Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

Tabla: c-FOS

	Neuronas		<u>p*</u>
	Media	DE	
PFA			
Plataforma Chica	13.67	9.83	0.092
Plataforma Grande	25.33	13.43	
Control	33.33	14.01	
LH			0.008
Plataforma Chica	11.50	8.31	
Plataforma Grande	30.50	9.18	
Control	28.67	10.50	

* Análisis de varianza de una vía

Gráfico 5. Neuronas positivas a inmunohistoquímica de proteína c-FOS, en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral (LH): Comparación del conteo de células inmunoreactivas

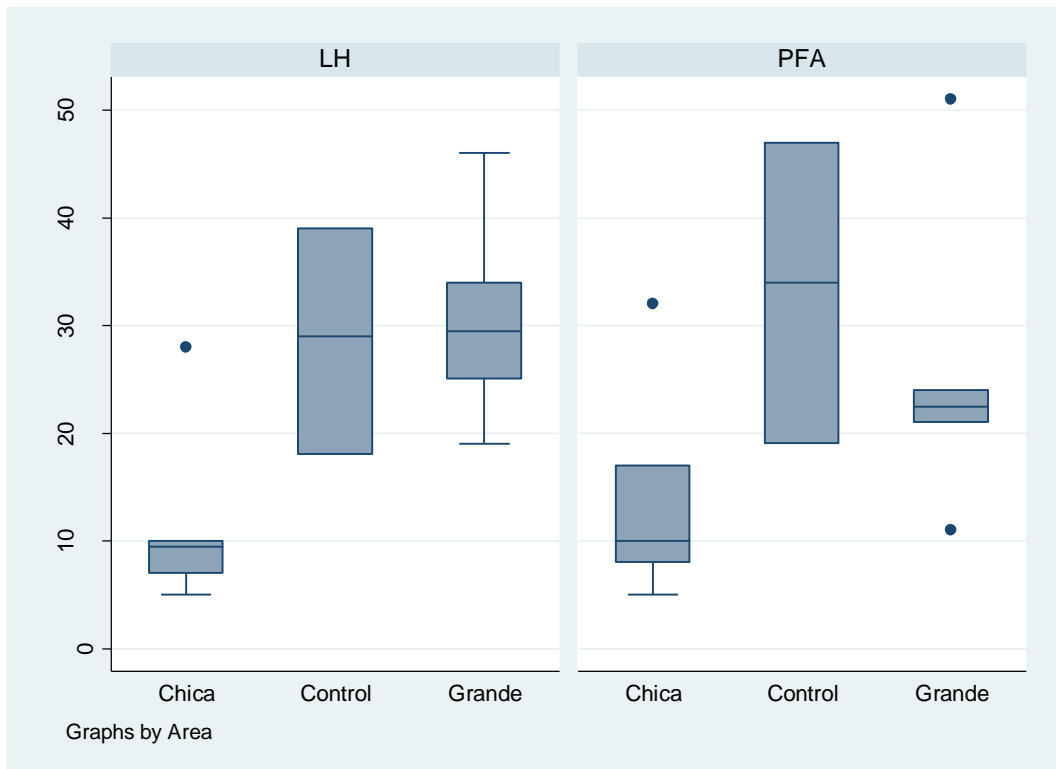


Tabla 7. Conteo celular de neuronas positivas a inmunohistoquímica de hormona concentradora de melanina (MCH), en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral

A <u>Neuronas MCH + Núcleo Perifornical (PFA) (400 μm^2)</u>			
Rata N°	Plataforma Chica (#)	Plataforma Grande (#)	Control (#)
1 ^a	3	31	15
2 ^a	7	18	11
3 ^a	3	16	9
4 ^a	3	9	10
5 ^a	4	13	
6 ^a	6	21	
7 ^a		18	
	Me = 3.5	Me = 18	Me = 10.5

B <u>Neuronas MCH + Hipotálamo Lateral (LH) (400 μm^2)</u>			
Rata N°	Plataforma Chica (#)	Plataforma Grande (#)	Control (#)
1B	18	22	12
2B	7	13	16
3B	7	22	14
4B	11	14	21
5B	12	17	
6B	15	17	
7B		19	
	Me = 11.5	Me = 17	Me = 15

**Tabla 8. Inmunohistoquímica de hormona concentradora de melanina (MCH):
Conteo de células inmunoreactivas y prueba de ANOVA de una vía**

Tabla: MCH

		Neuronas		p*
		Media	DE	
PFA	Plataforma Chica	4.33	1.75	<0.001
	Plataforma Grande	18.00	6.93	
	Control	11.25	2.63	
LH	Plataforma Chica	11.67	4.37	0.045
	Plataforma Grande	17.71	3.55	
	Control	15.75	3.86	

* Análisis de varianza de una vía

**Gráfico 6. Neuronas positivas a inmunohistoquímica de hormona concentradora de melanina (MCH), en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral (LH):
Comparación del conteo de células inmunoreactivas**

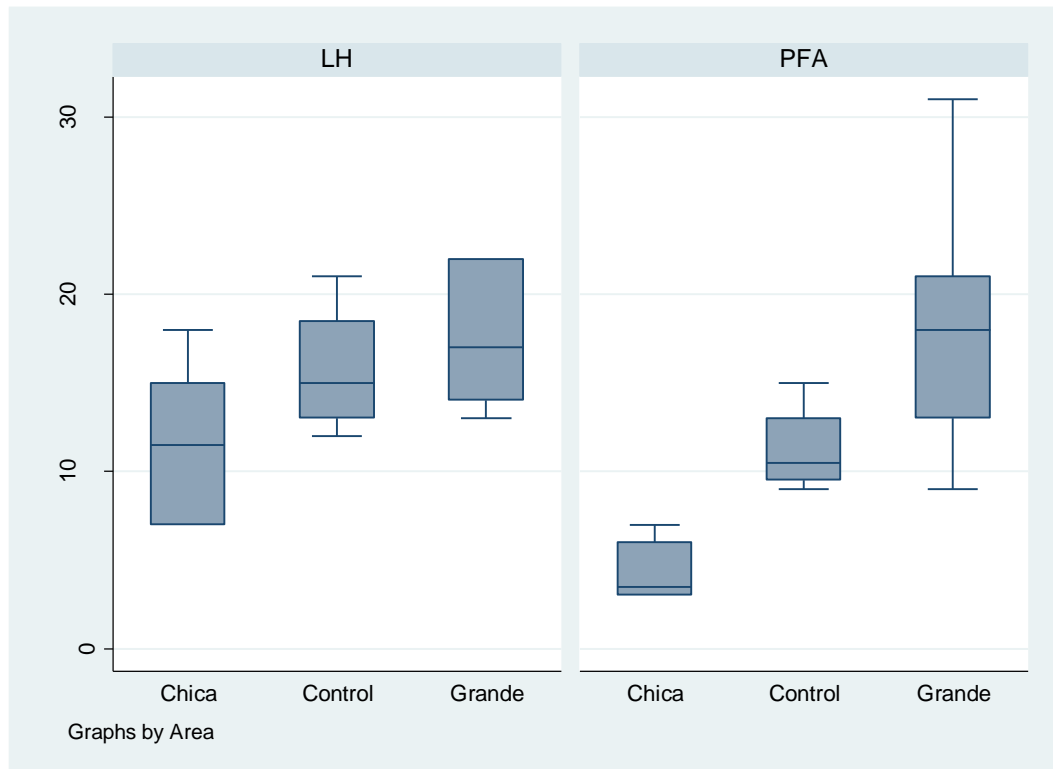


Tabla 9. Conteo celular de neuronas positivas a inmunohistoquímica de neuropéptido Y (NPY), en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral

A		<u>Fibras NPY+ Núcleo Perifornical (PFA) (400 μm^2)</u>		
Rata N°	Plataforma Chica (#)	Plataforma Grande (#)	Control (#)	
1 ^a	17	5	21	
2 ^a	9	22	31	
3 ^a	5	15	28	
4 ^a	18	16	27	
5 ^a	11	15	29	
6 ^a	9	12		
Me = 10		Me = 15	Me = 28	

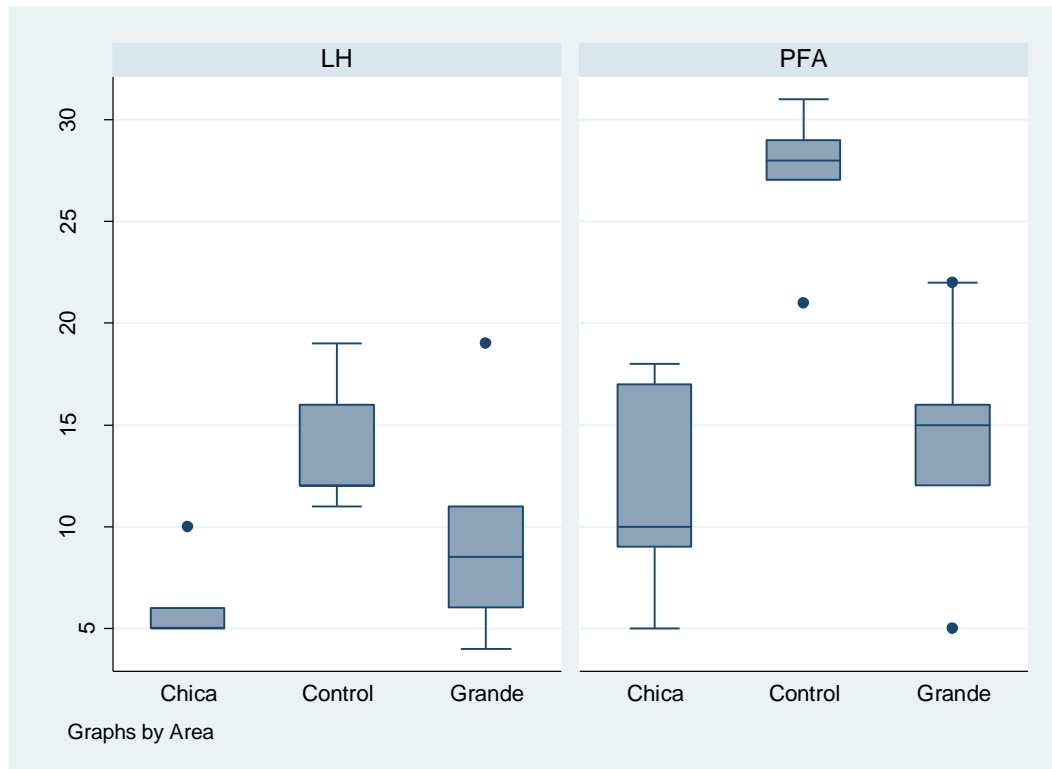
B		<u>Fibras NPY+ Hipotálamo Lateral (LH) (400 μm^2)</u>		
Rata N°	Plataforma Chica (#)	Plataforma Grande (#)	Control (#)	
1B	5	4	12	
2B	10	19	12	
3B	5	8	16	
4B	6	9	19	
5B	5	11	11	
6B	5	6		
Me = 5		Me = 8.5	Me = 12	

Tabla 10. Neuronas positivas a inmunohistoquímica de neuropéptido Y (NPY), en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral, Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

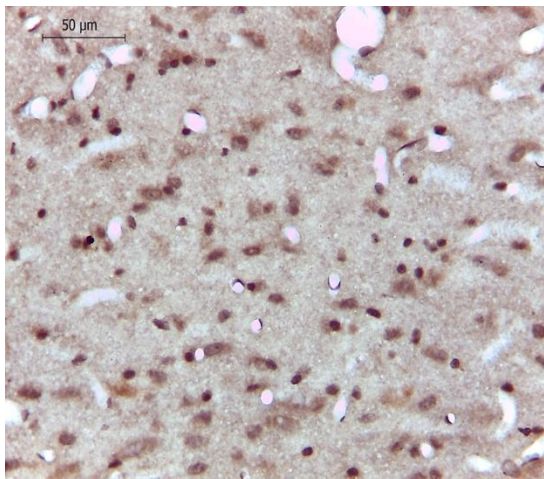
Tabla: NPY		Neuronas		p*
		Media	DE	
PFA	Plataforma Chica	11.50	5.05	<0.001
	Plataforma Grande	14.17	5.56	
	Control	27.20	3.77	
LH	Plataforma Chica	6.00	2.00	0.013
	Plataforma Grande	9.50	5.24	
	Control	14.00	3.39	

* Análisis de varianza de una vía

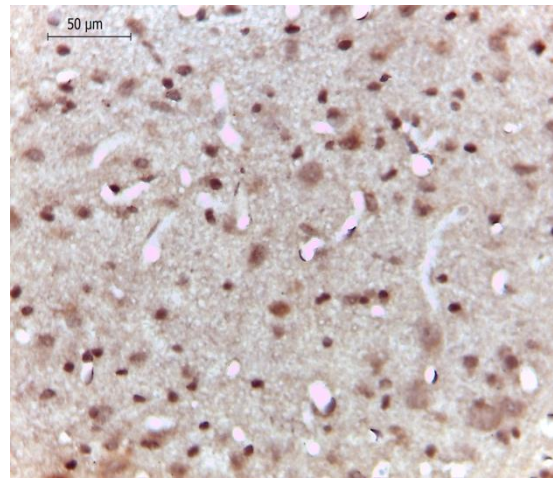
Gráfico 7. Neuronas positivas a inmunohistoquímica de neuropéptido Y (NPY), en el núcleo perifornical (PFA) e hipotálamo lateral (LH): Comparación del conteo de células inmunoreactivas



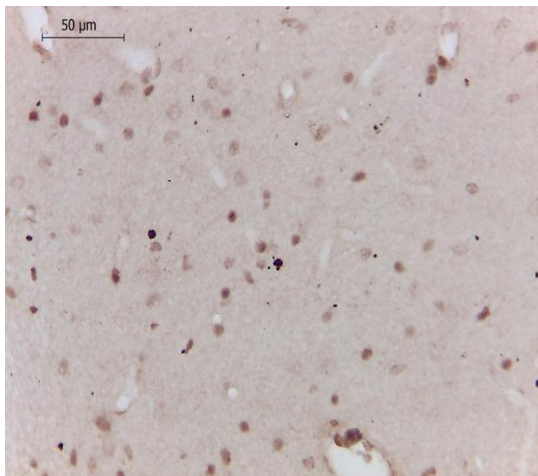
Figuras:



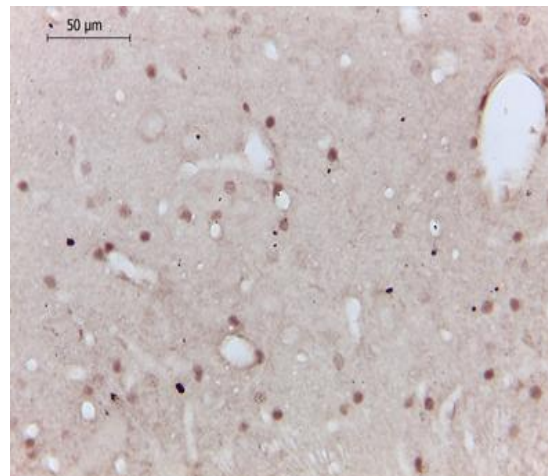
1a



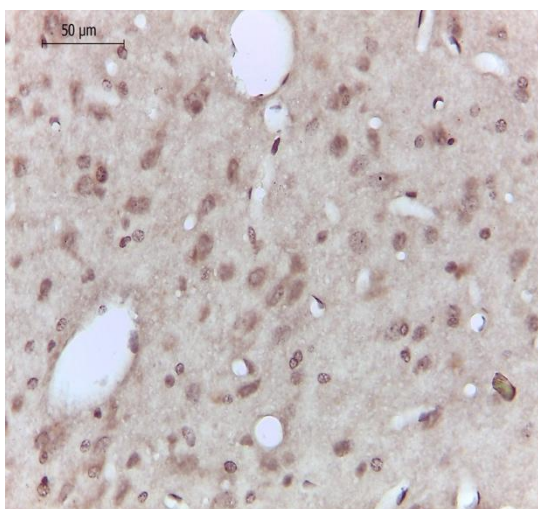
1B



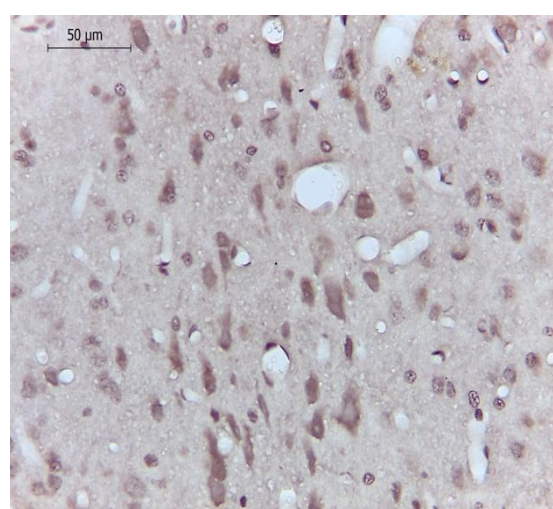
2a



2B



3a



3B

Figura 1. Inmunohistoquímica de cFOS de las ratas control en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral.

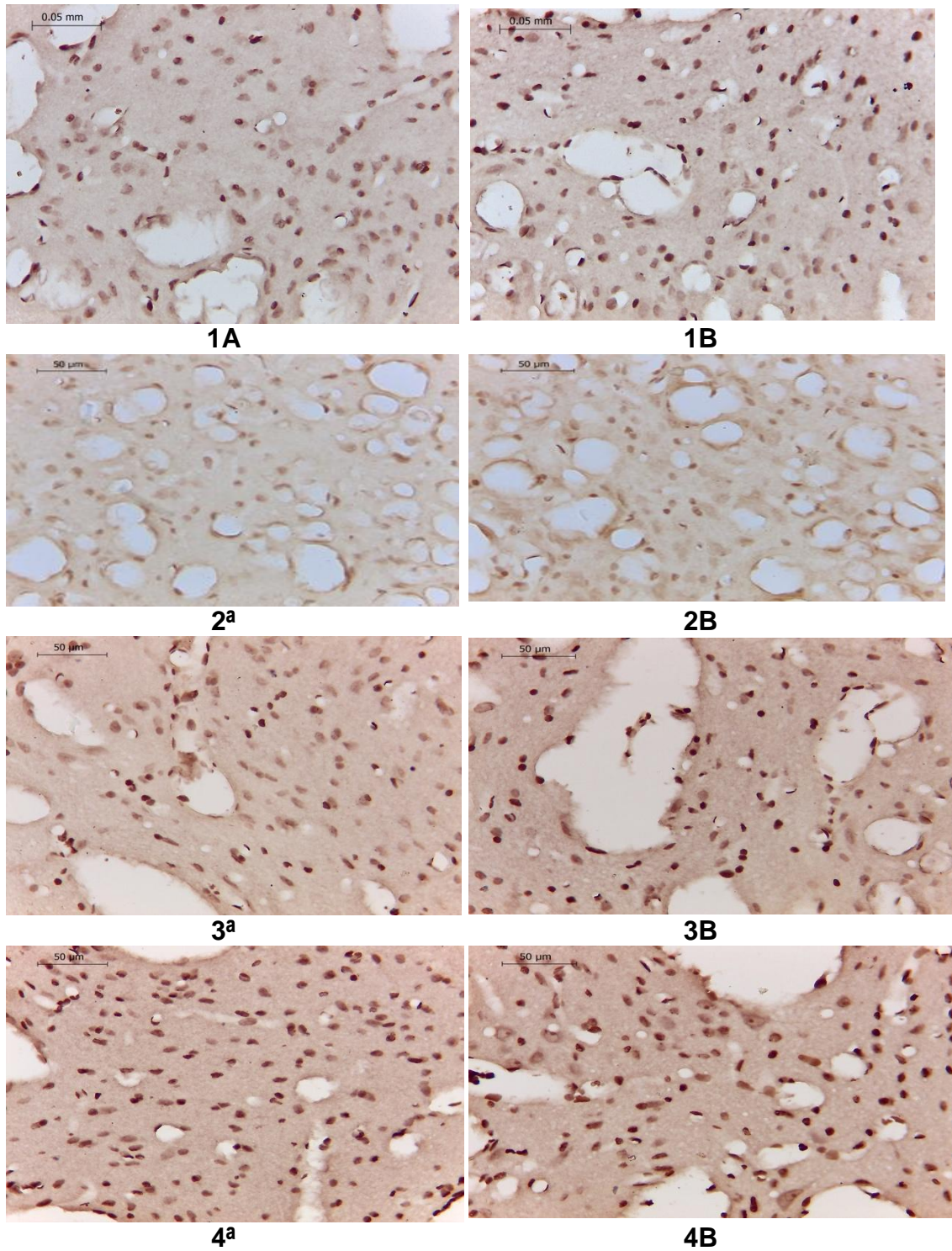


Figura 2. Inmunohistoquímica de cFOS de las ratas de plataforma grande en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Primera parte**

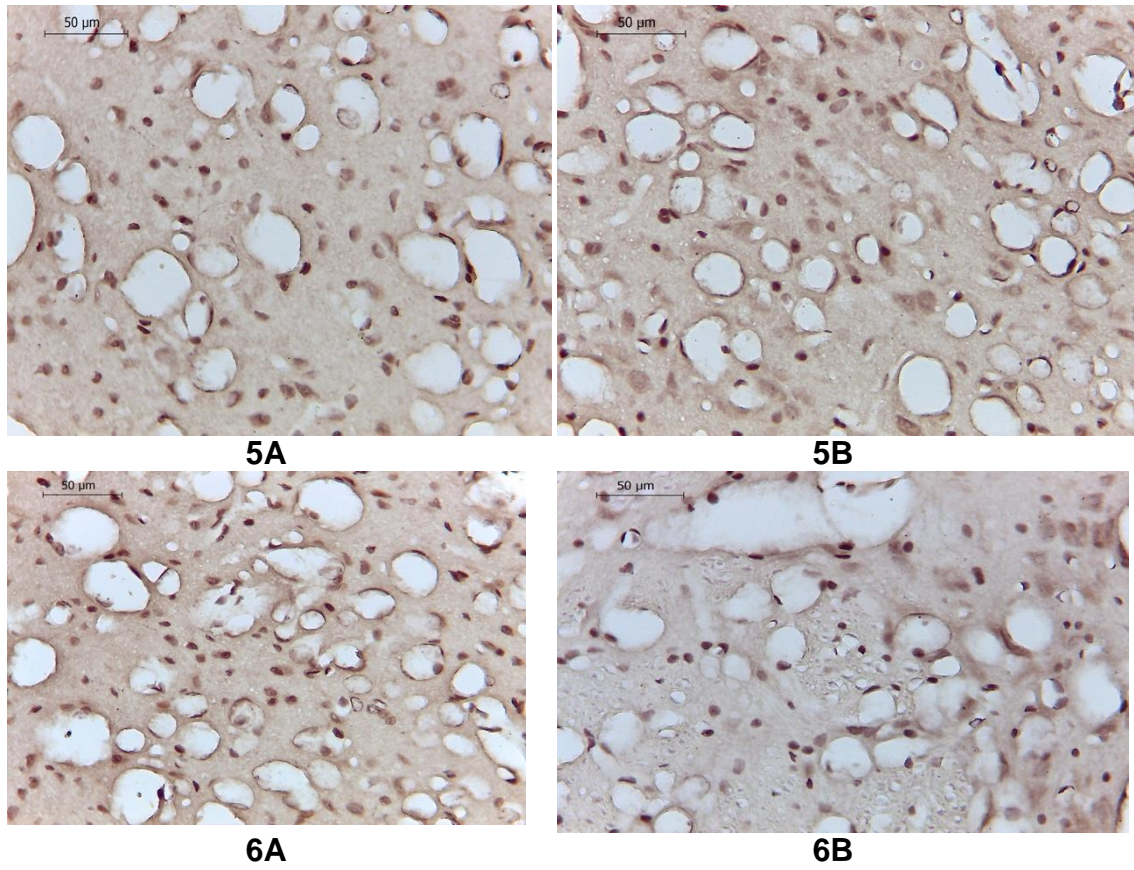


Figura 2. Inmunohistoquímica de cFOS de las ratas de plataforma grande en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Segunda Parte**

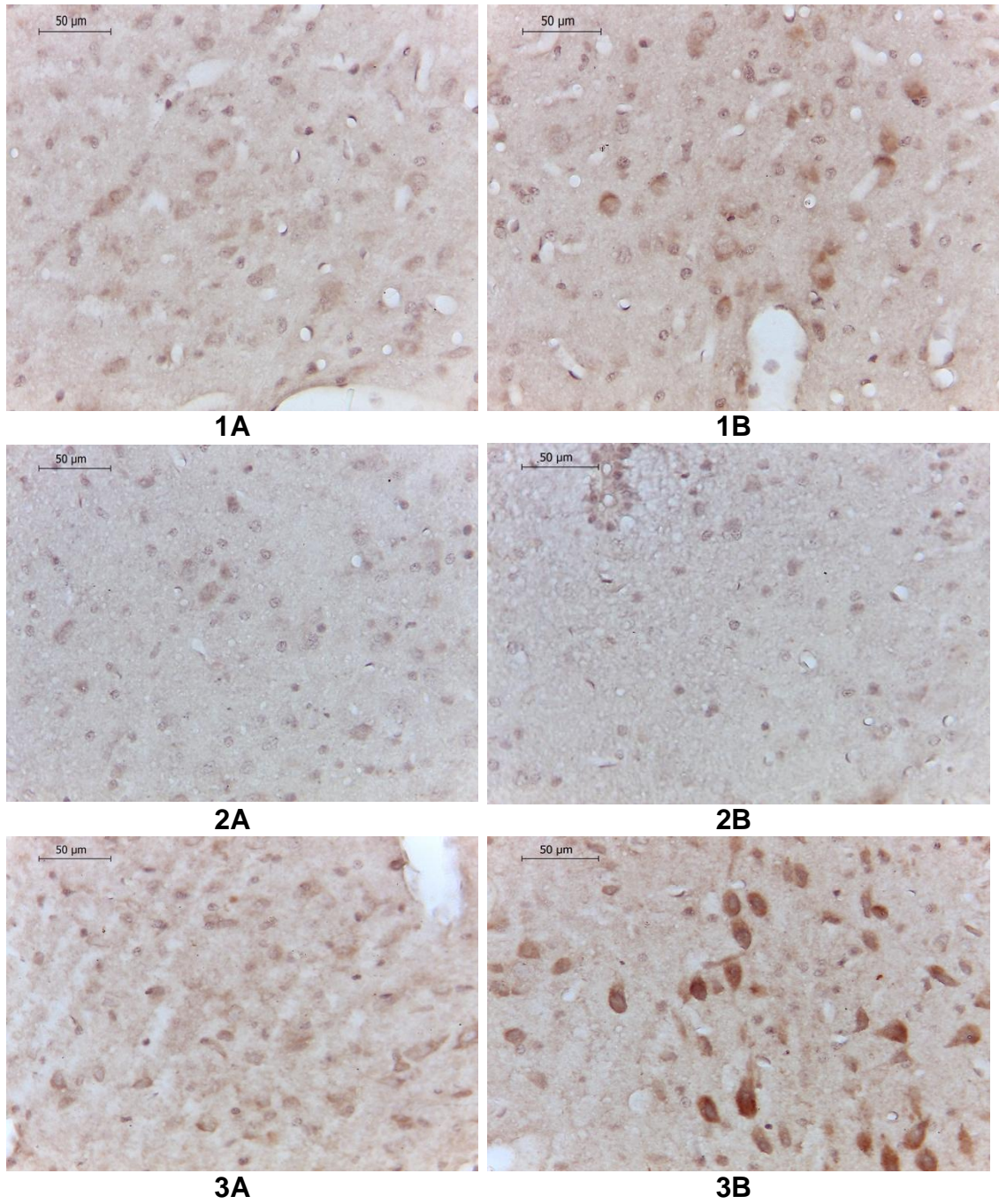


Figura 3. Inmunohistoquímica de cFOS de las ratas de plataforma chica en el núcleo perifornical y el núcleo hipotálamo lateral. **Primera Parte.**

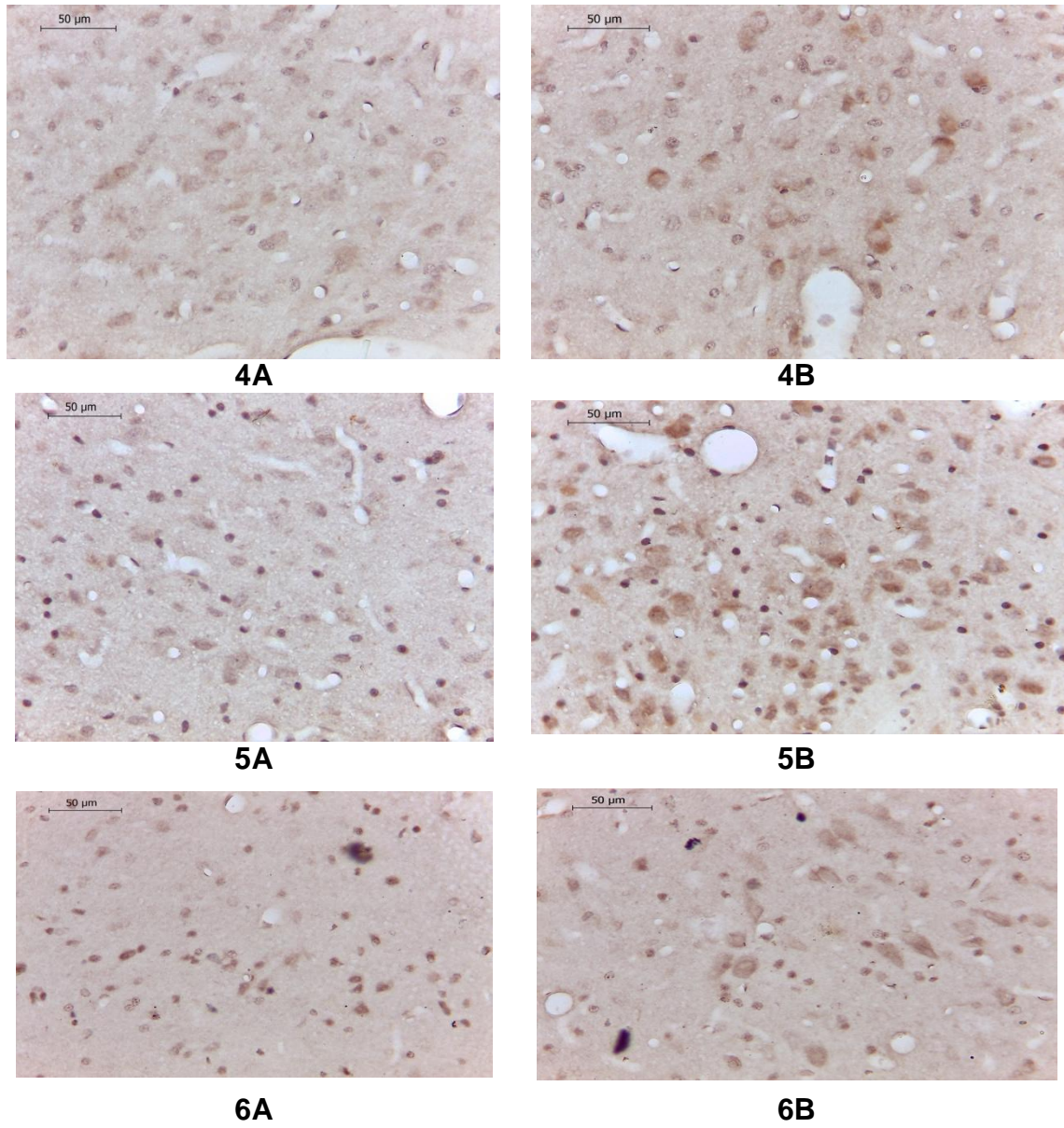


Figura 3. Inmunohistoquímica de cFOS de las ratas de plataforma chica en el núcleo perifornical y el núcleo hipotálamo lateral. **Segunda Parte.**

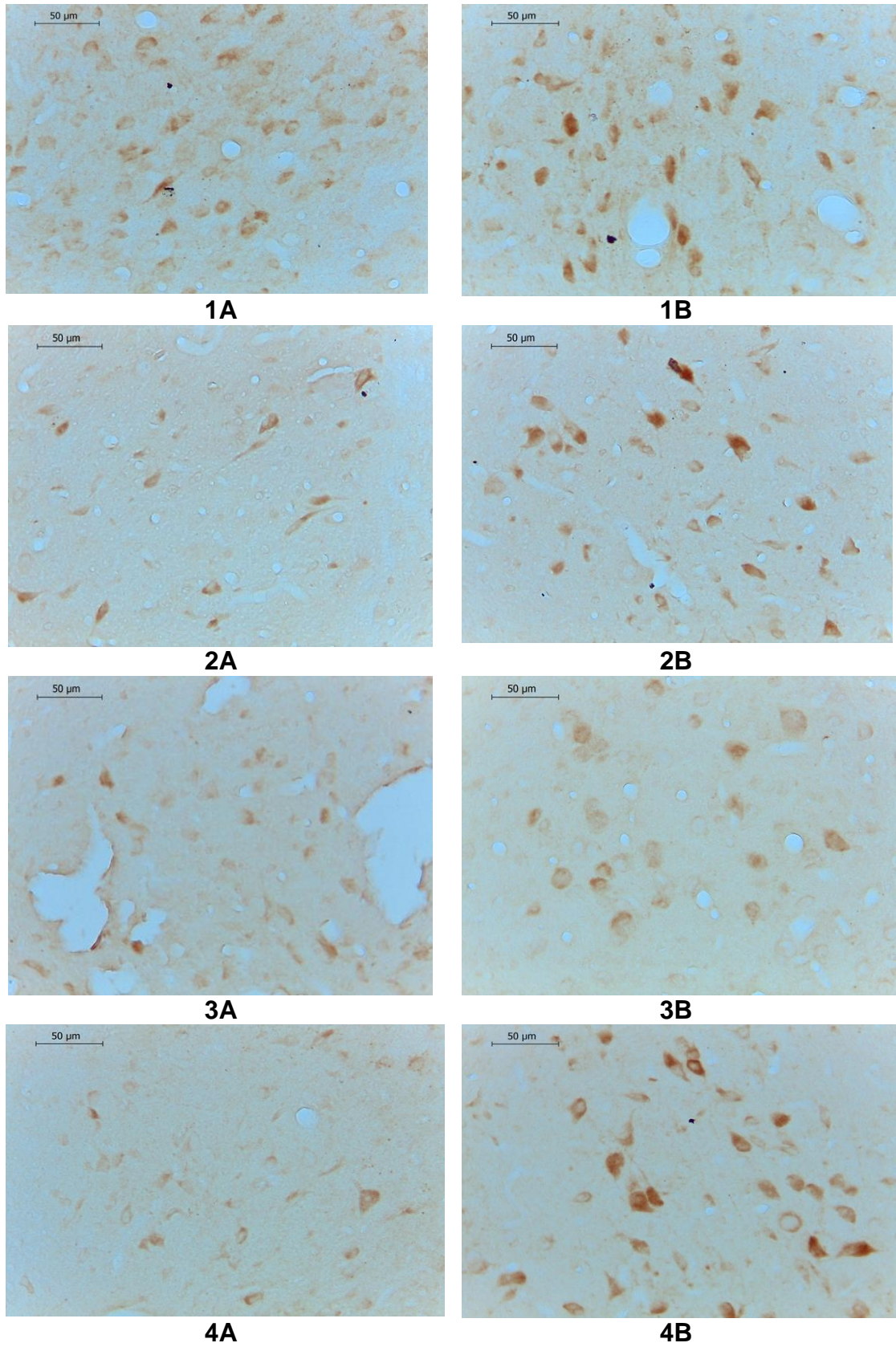


Figura 4. Inmunohistoquímica de MCH de las ratas control en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral.

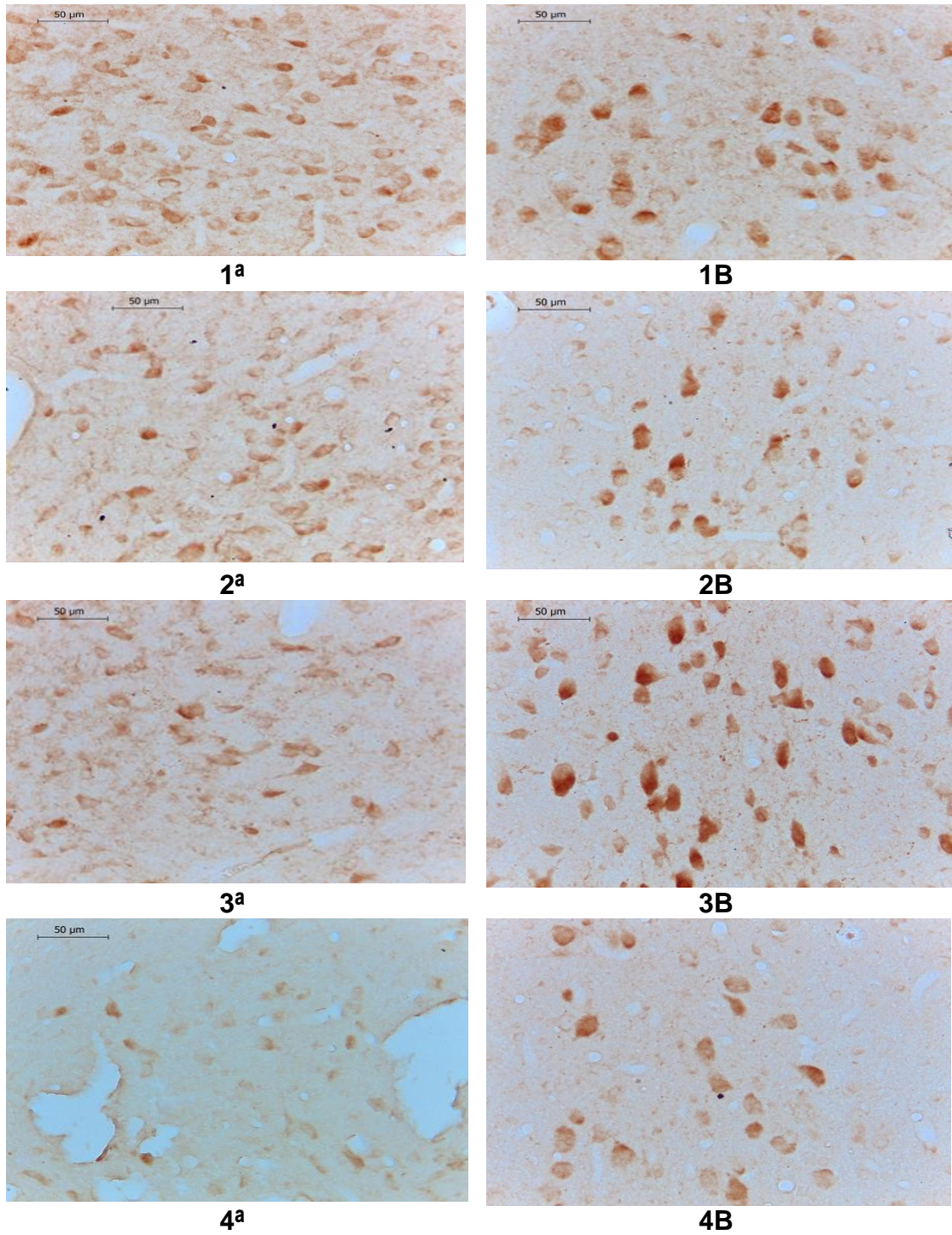


Figura 5. Inmunohistoquímica de MCH de las ratas de plataforma grande en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Primera Parte.**

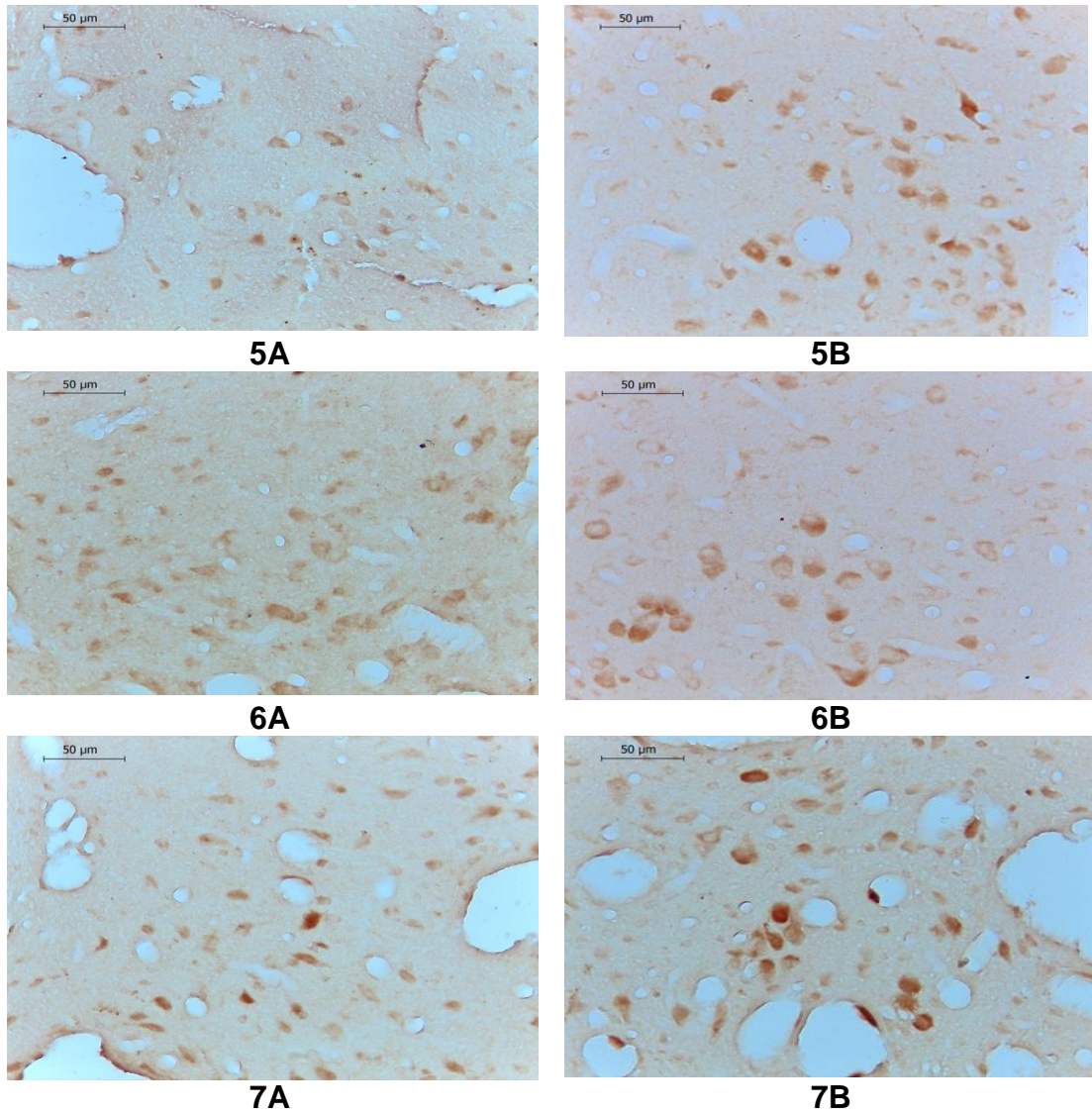


Figura 5. Inmunohistoquímica de MCH de las ratas de plataforma grande en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Segunda Parte.**

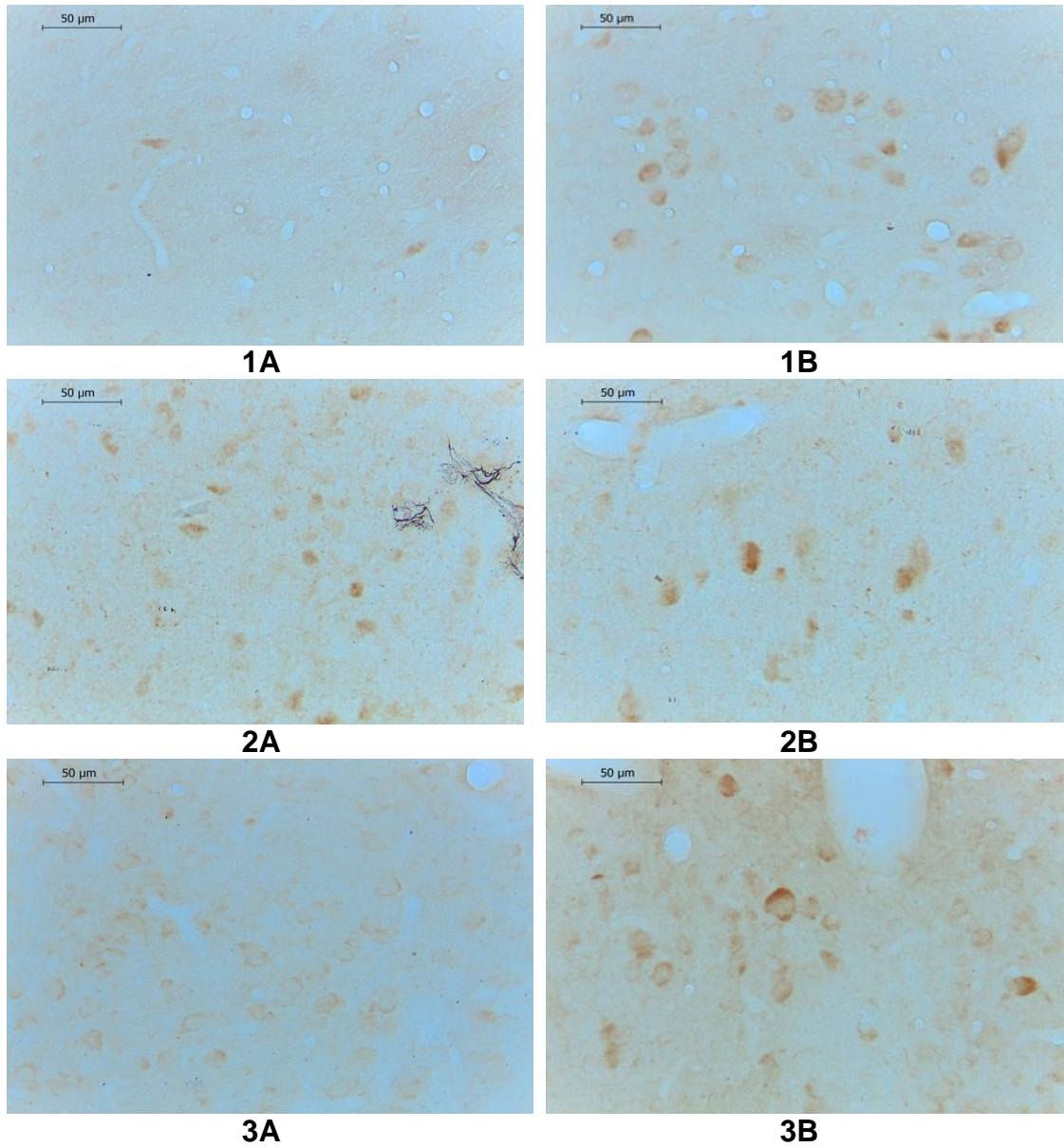


Figura 6. Inmunohistoquímica de MCH de las ratas de plataforma chica en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Primera Parte.**

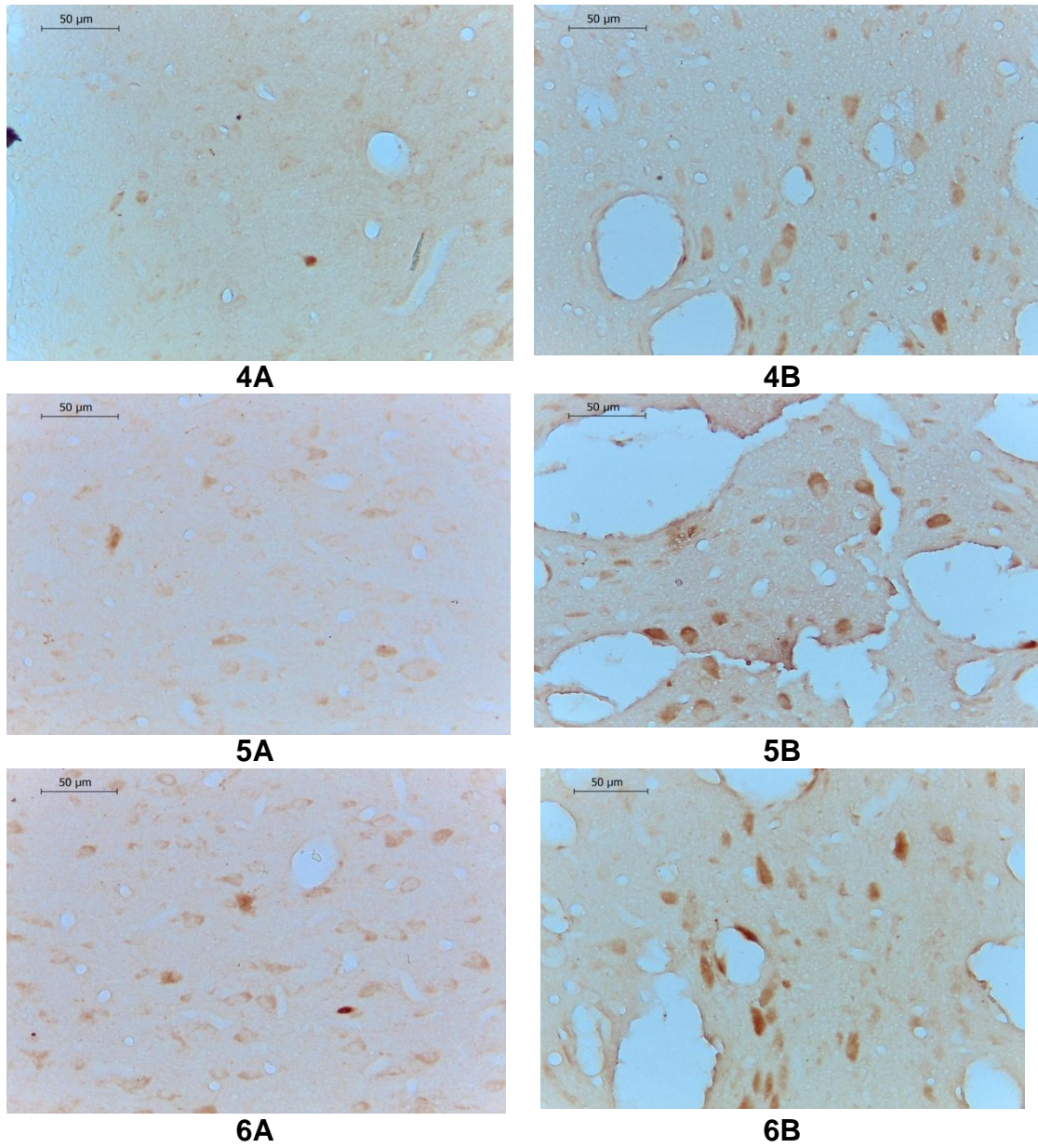


Figura 6. Inmunohistoquímica de MCH de las ratas de plataforma chica en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Segunda Parte.**

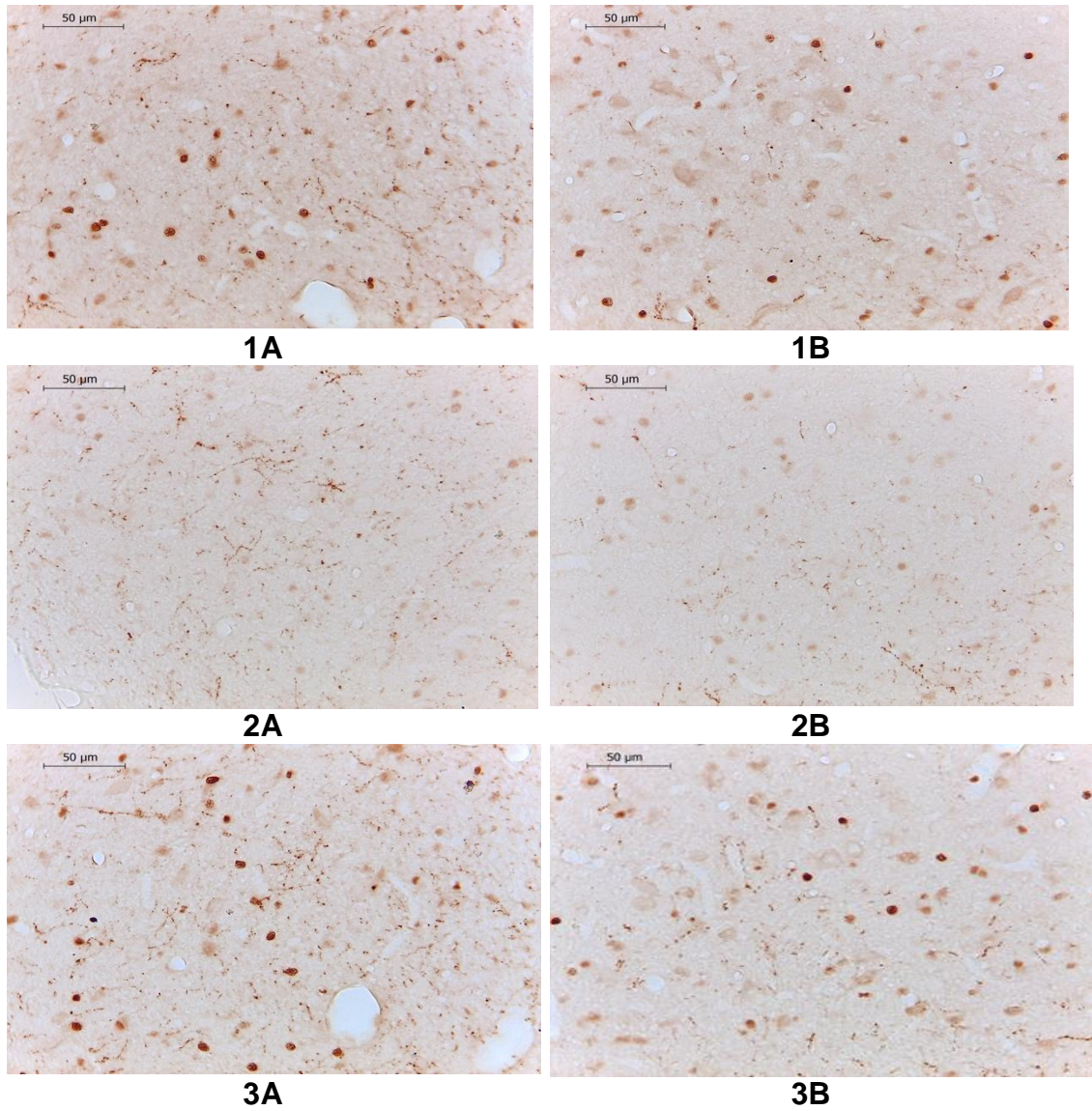


Figura 7. Inmunohistoquímica de NPY de las ratas control en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Primera Parte.**

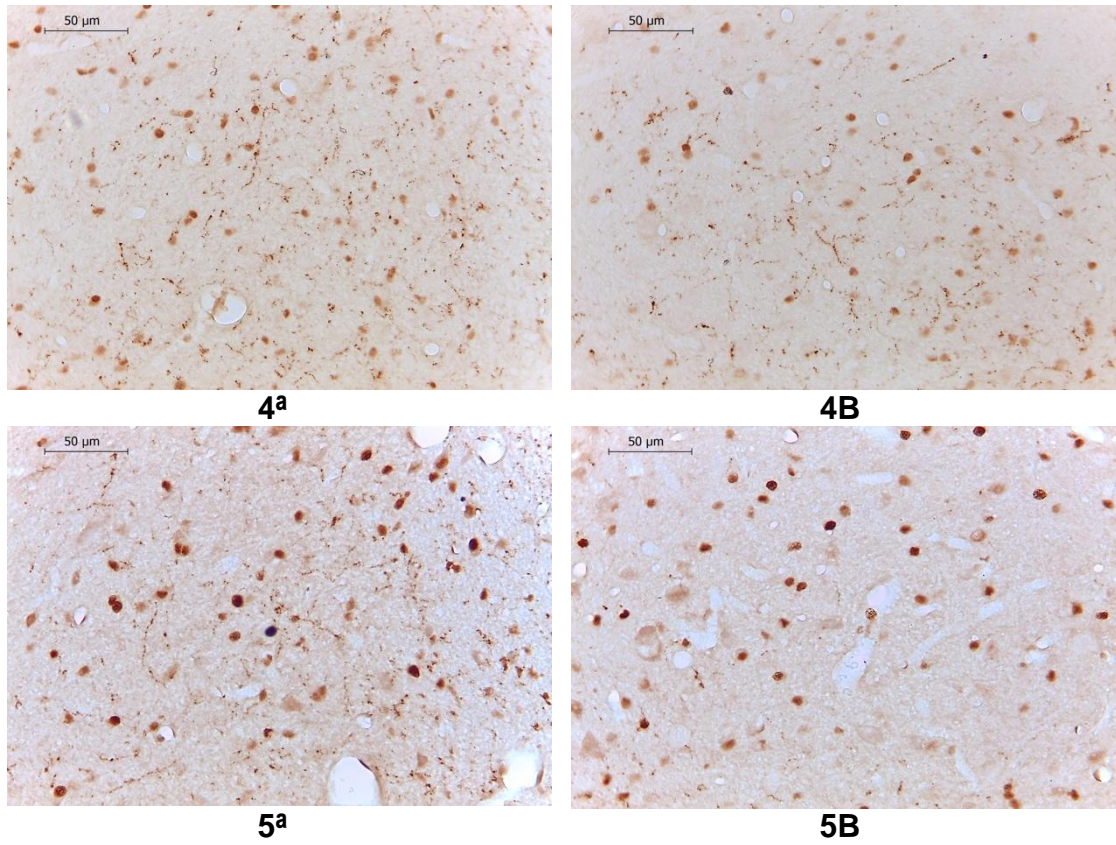


Figura 7. Inmunohistoquímica de NPY de las ratas control en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Segunda Parte.**

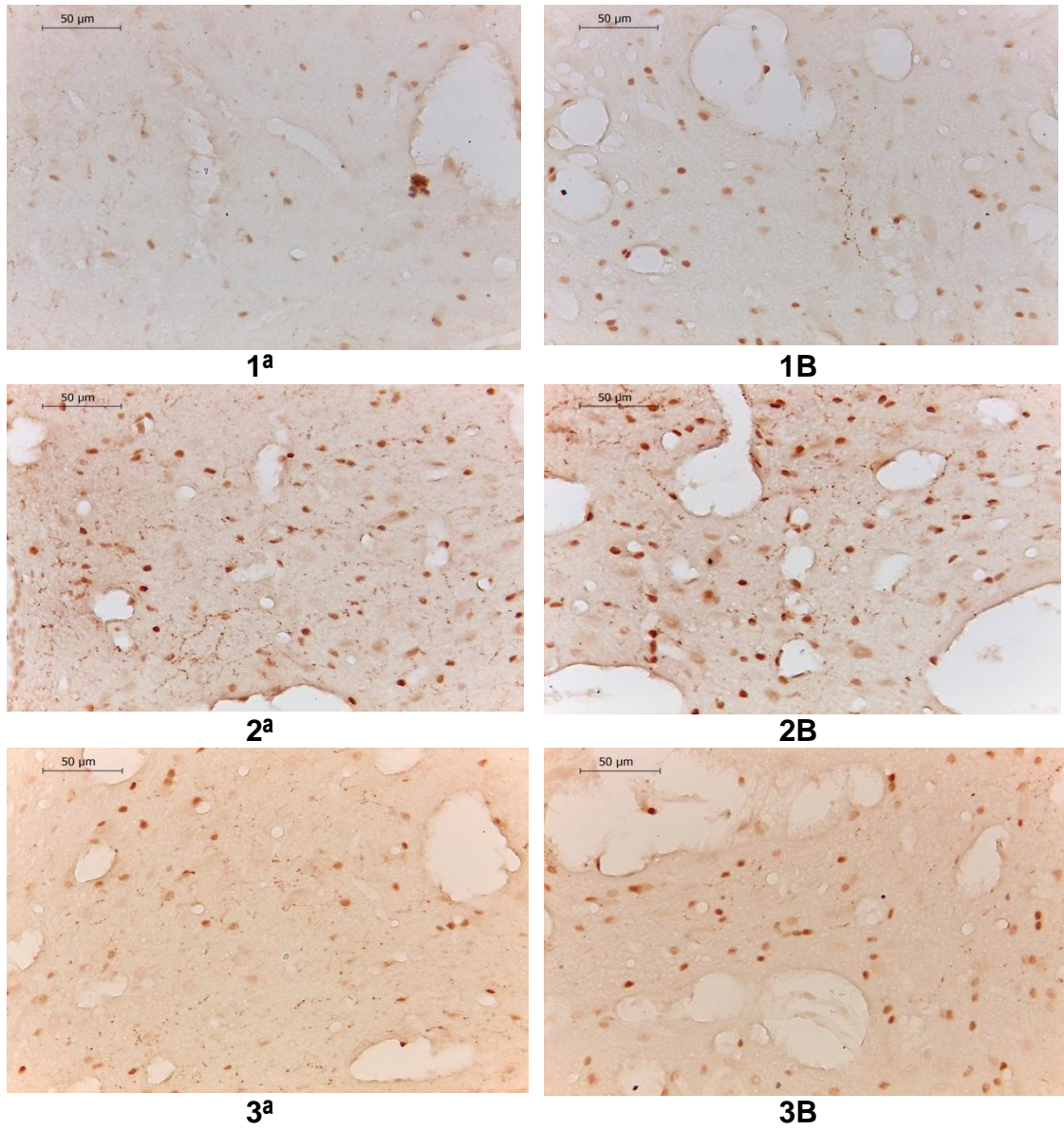


Figura 8. Inmunohistoquímica de NPY de las ratas de plataforma grande en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Primera Parte.**

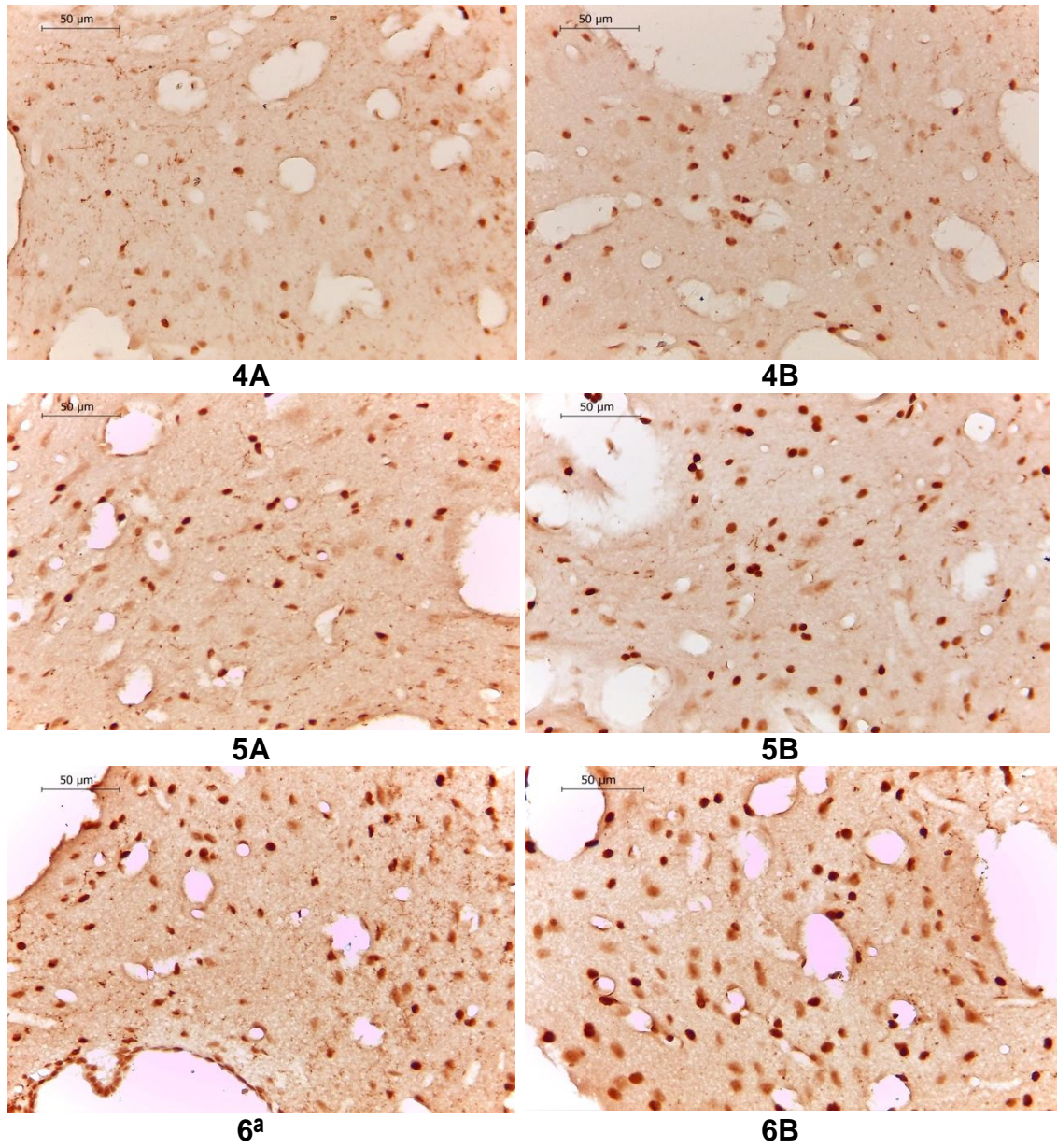


Figura 8. Inmunohistoquímica de NPY de las ratas de plataforma grande en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Segunda Parte.**

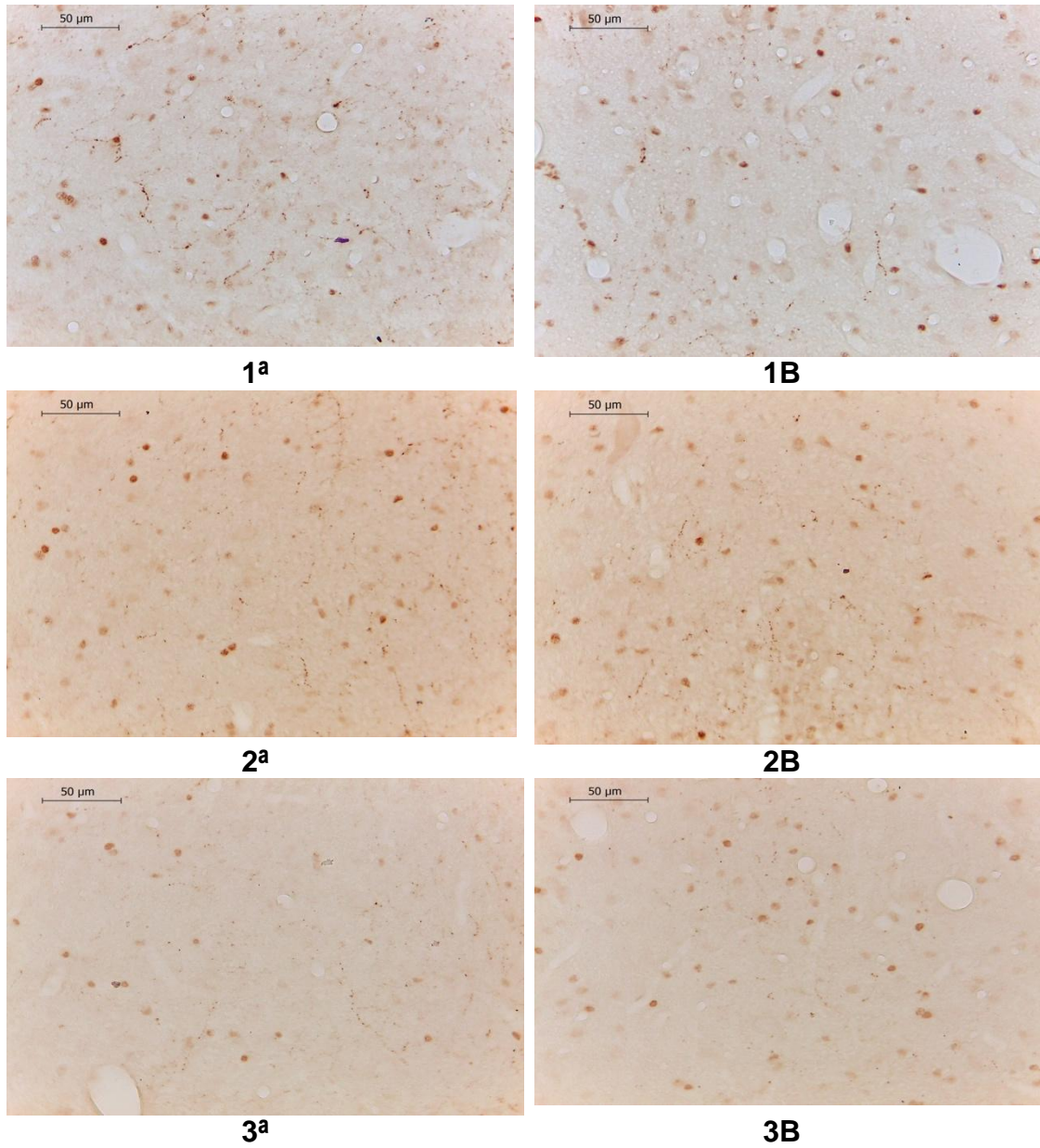


Figura 9. Inmunohistoquímica de NPY de las ratas de plataforma chica en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Primera Parte.**

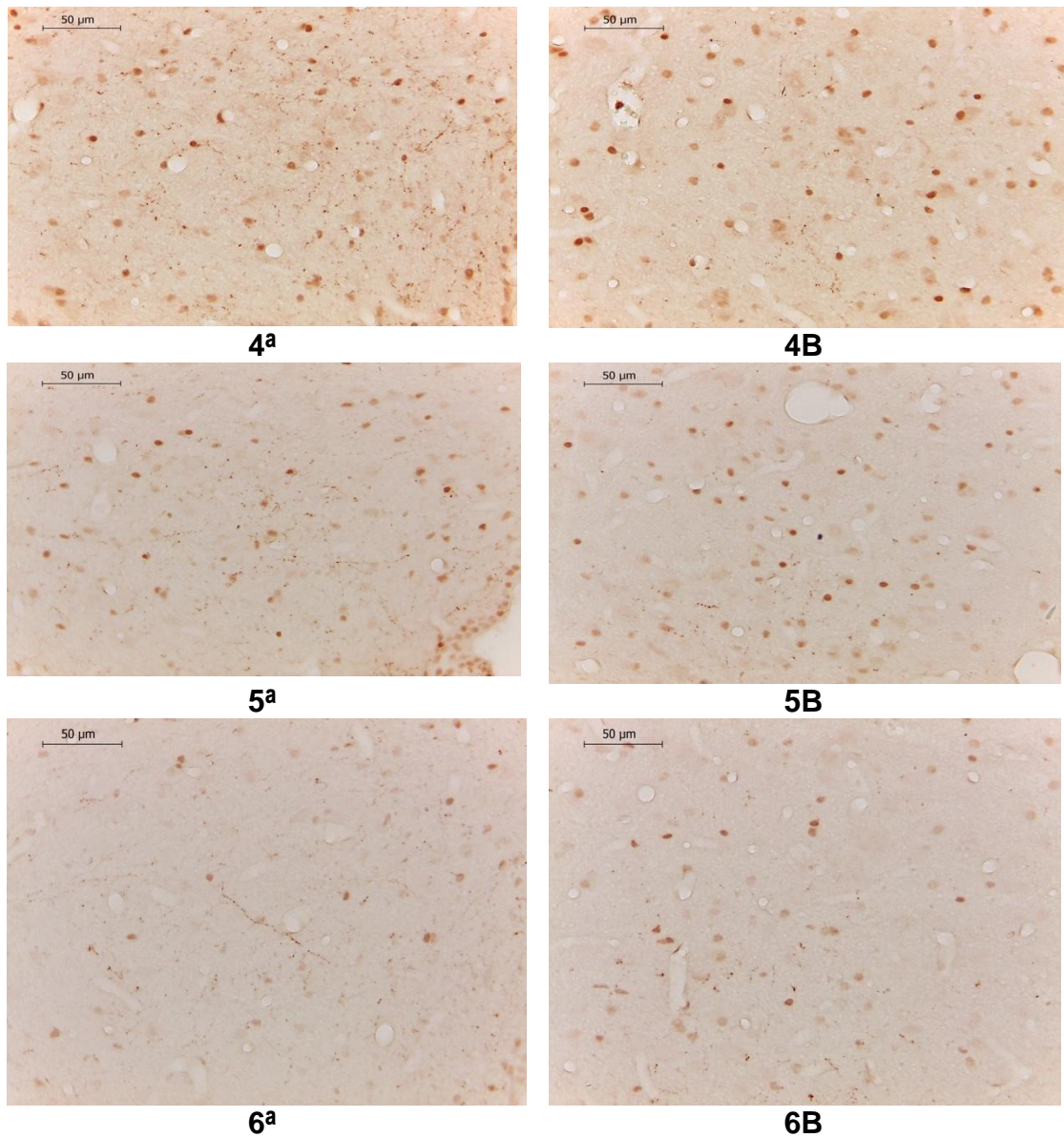


Figura 9. Inmunohistoquímica de NPY de las ratas de plataforma chica en el núcleo perifornical y en el núcleo hipotálamo lateral. **Segunda Parte.**