

# Revisión

Dr. Rafael J. Salin-Pascual

*Departamento de Psiquiatría y Salud Mental. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Sistema Nacional de Investigadores.*

## Optogenética: la luz como una herramienta para el estudio del funcionamiento cerebral en los mecanismos del sueño-vigilia y la conducta alimentaria

**Optogenetics: the light as a tool for the study of brain function in the mechanisms of the sleep-wake and eating behavior**

## Resumen

La optogenética es una tecnología que utiliza el efecto que la luz hace sobre canales iónicos fotosensibles. Estos pueden abrirse, como en el caso del canal de rodopsina (ChR2), con un efecto neto de despolarización, o con el canal de la halorodopsina, NpHR, producen una inhibición de las corrientes iónicas en las células. En la actualidad hay mas herramientas moleculares de este tipo, que son utilizadas para estudios in vitro, ex vivo y con animales los cuales expresan este tipo de proteínas de membranas celulares por manipulación genética (Knock-in). Se revisaron los artículos que utilizan este tipo de tecnología optogenética, en el papel de dos neuropéptidos, que regulan desde el hipotálamo lateral los estadios del dormir y la conducta alimentaria. Las orexinas, también llamadas hipocretinas, son dos neuropéptidos, que suprimen el sueño y selectivamente el sueño de movimientos oculares rápidos. La mutación en uno de los receptores, el subtipo dos de orexina, se ha detectad como el agente causal de la narcolepsia en perros Doverman, mientras que en seres humanos con narcolepsia también hay un defecto en este sistema de orexinas, pero se supone que es de tipo autoinmune. El otro neuropéptido es la hormona concentradora de melanina (MCH), que se localiza también en el hipotálamo lateral. Sus funciones sobre el sueño son aumentar del sueño MOR, y promover la conducta de alimentación por deficiencias calóricas. Mientras que las orexinas tienen una función sobre el consumo de alimentos apetecibles, aun cuando las necesidades calóricas estén satisfechas. El conocimiento confirmado por la optogenética de la interacción de estos dos neuropéptidos, en la regulación del sueño y la conducta alimentaria, pueden ayudar a comprender problemas de salud como la obesidad mórbida infantil, en donde la deficiencia de sueño se correlaciona de manera inversa con el aumento el los índice de masa corporal.

### Palabras clave.

*Optogenética, sueño, sueño MOR, orexina, hormona concentradora de la melanina, apetito*

## Abstract

---

Optogenetics is a technology that uses the effect of light on photosensitive ion channels. These can be opened, as in the case of rhodopsin channel-2 (Chr2), with a net effect of depolarization, or as the channel of halo rhodopsin, NpHR, in which light produces an inhibition of ionic currents. Currently there are more molecular tools of this type, which are used for in vitro, ex vivo and animal studies, which express this type of cell membrane proteins, by genetic manipulation (knock-in). Articles that used this type of optogenetic technology was reviewed, especially those of the role of two neuropeptides that regulate from the lateral hypothalamus different sleep stages and eating behavior. Orexins, also called hypocretins, are two neuropeptides, which selectively suppress sleep and sleep with rapid eye movement (REM sleep). Mutation in one of their receptors, orexin subtype two, has detected as the agent in Doberman dogs narcolepsy. While narcolepsy in humans, it has been proposed as autoimmune disease. The other

neuropeptide studied was melanin-concentrating hormone (MCH), which is also located in the lateral hypothalamus. Their function in sleep is to increased REM sleep, and promoting feeding behavior by calorie deficiencies. While orexin have a role on the consumption of palatable foods, even when calorie needs are already met. The knowledge of optogenetics confirmed by the interaction of these two neuropeptides in the regulation of sleep and eating behavior, can help to understand health problems such as childhood morbid obesity, where sleep deficiency correlates inversely with the increase the body mass index.

### Keywords

*Optogenetics, orexin, REM sleep, sleep, melanin concentrating hormone, appetite.*

#### Correspondencia:

Dr. Rafael J. Salín-Pascual  
Departamento de Psiquiatría y Salud Mental, Facultad de Medicina – UNAM  
Hidalgo 187 Casa 7, Barrio del Niño Jesús – Tlalpan  
México 14080, México  
Correo electrónico: rafasalin@yahoo.com

# Introducción

Las imágenes han sido muy importantes para poder entender el mundo que nos rodea. La descripción detallada de un evento queda reducida a una simple delineación de reglas metodológicas, que se aclaran cuando presenciamos el mismo evento en imágenes y movimiento. Esto es lo que ocurre con la optogenética.

En 1972, Francis Watson, codescubridor de la estructura del ADN, propuso que se debería de desarrollar un método neuronal que permitiera “prender” y “apagar”, las células nerviosas y que esto ocurriera en el preciso momento en que estaban desarrollando sus conexiones fisiológicas. Lo anterior asumía que no se deberían lesionar las células nerviosas. Veinte años después, el mismo Crick sugirió que esto podría implementarse con la utilización de la luz. Poco después, esa tecnología surgió a partir de las algas fotosensibles.<sup>1</sup>

El método nació en el años 2002, cuando un grupo de investigadores que estudiaban un tipo de algas fotosensibles, identificaron un canal iónico a sodio, el cual permite, que estos seres se muevan en función de la luz. Este receptor es el canal de rodopsina subtipo 2 (ChR2), que es alterable con la luz azul, y que permite que el ionóforo se abra e ingrese sodio, con lo cual se generan corrientes eléctricas y la despolarización.<sup>2</sup>

La alta fidelidad en las respuestas con aminoácidos foto evocada, es ideal para el mapeo de circuito asistidos con ChR2 y este enfoque, ha sido utilizado con éxito, en diferentes campos de la neurociencia. Por el contrario, los neuropéptidos emplean un modo lento de comunicación y podrían requerir mayor frecuencia y/o tiempo de estimulación para ser liberados y se ha propuesto como una limitante de este tipo de tecnología, que hasta hoy ha sido eficaz en neurotransmisores de bajo peso molecular.<sup>3</sup>

Las sondas optogenéticas, desarrolladas recientemente, expresan genéticamente canales iónicos fotosensibles y bombas que en principio

superan estas limitaciones. Las sondas optogenéticas permiten una resolución de milisegundos sobre el control funcional en las poblaciones neuronales seleccionadas, que han sido transfectadas con vectores virales para que expresen los canales de rodopsina-2. Este tipo de tecnología nos permitirá conocer el funcionamiento de los circuitos en enfermedades de tipo neurológicas y psiquiátricas.<sup>4</sup>

Por otro lado, la introducción de otro tipo de ARN que exprese canales sensibles a luz naranja, como es el caso de la halorodopsina, NpHR, producen una inhibición de las corrientes iónicas en las células, con lo cual se ha propuesto, que esta tecnología pueda ser utilizada para producir dispositivos que activan o inhiban circuitos neuronales, en determinadas enfermedades neuropsiquiátricas como la epilepsia, Parkinson, dolor crónico, autismo, y otras.<sup>4</sup>

Otras proteínas transmembranales de la célula, del tipo de bombas y canales iónicos se han agregado a las herramientas que se emplean en la optogenética. Entre otros, estos incluyen los receptores cis-trans foto-sensible isomerizables, pro-proteínas y ligandos, así como proteínas calcio fluorescentes y sensibles a colorantes y sensibles al voltaje. Aunque las más utilizadas en la mayoría de los estudios son las que utilizan rodopsinas como los canales de rodopsina, halorodopsina y bacteriorodopsina.<sup>5</sup>

Al igual que la terapia génica experimental, el control celular optogenético puede ser aplicado “in vivo” mediante inyección directa de un gen funcional que porta un vector en el tejido blanco, o “ex vivo”, por la transducción de las células cultivadas in vitro y en quienes se introduce el vector viral con dicho gen funcional. Esta última estrategia puede ser una de las que se emplee en seres humanos cuando se utilizan células multipotenciales (stem cells).<sup>5</sup>

Hasta la fecha, hay muchos artículos de investigación publicados y revisiones sobre el tema, los cuales describen esta nueva tecnología. Sin embargo, algunos de los informes se refieren a su aplicación a las enfermedades neuropsiquiátricas. La investigación optogenética más reciente en estas enfermedades, incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), la epilepsia, la esquizofrenia, la

ansiedad, el miedo, las conductas de recompensa, y trastornos del sueño.<sup>4</sup>

Algunos ejemplos sobre las aplicaciones de la optogenética en el campo de la psiquiatría es el modelo de roedor, en el que se desarrolla un paradigma de ansiedad, después de insertar canales sensibles a la luz en la amígdala, una vez que se aplica la luz, se observa que ratones ansioso se transformaban en sujetos temerarios. Lo interesante de este estudio fue, que se pudieron ubicar los canales en regiones específicas de la amígdala, de tal forma que si a los animales se les estimula la amígdala toda con luz, siguen estando ansiosos, pero esto no ocurre si la luz se dirige específicamente a un grupo nuclear, en donde se inhibe esta respuesta.<sup>6</sup>

En la EP se ha observado que, en un modelo de ratón de esta enfermedad la Inhibición optogenética en el núcleo subtalámico puede ser eficaz en la mejoría de las extremidades anteriores que presentan acinesia contralateral, pero no, en el cambio de preferencia extremidad anterior o para reducir la supersensibilidad de los receptor dopaminérgicos. Estos hallazgos son útiles como base para futuros estudios sobre la optogenética en la EP.<sup>7</sup>

## EL CICLO SUEÑO-VIGILIA

El dormir y el estar despierto son actividades cíclicas, que al contrario de lo que se opinaba en la primera mitad del siglo XX, no son simplemente procesos pasivos.<sup>8</sup> En la última década han cobrado especial interés las zonas del diencefalo, y en especial de hipotálamo lateral, en donde dos tipos de neuropéptidos: las orexinas (ORX) (también llamadas hipocretinas) y la hormona concentradora de melanina (MCH), han confirmado la visión ancestral y de conocimiento popular, de que el dormir tiene funciones “nutricionales”, a la vez que de restauración de energía, no solo del cerebro, sino del resto de los órganos del cuerpo.<sup>9-12</sup>

La hormona concentradora de melanina (MCH) es un péptido orexigénico (que promueve el hambre), hipotalámico de 19 aminoácido cíclicos aislada originalmente de la glándula pituitaria del pez teleosteo donde controla la pigmentación de la piel.

En los mamíferos, la MCH está involucrada en la regulación de la conducta alimenticia, el estado de ánimo y el equilibrio energético. Las neuronas que expresan la MCH están situadas en el hipotálamo lateral y en la zona incerta. A pesar de esta distribución, las neuronas MCH se proyectan ampliamente por todo el cerebro. Los ratones sin MHC son hipofágicos (comen menos) y son delgados. Cuando se le administra centralmente, el ratón incrementa su ingesta de comida y sube de peso.<sup>13</sup>

El estar despierto, el sueño sin movimientos oculares rápidos o sueño No-MOR y el sueño MOR, son regulados por una interacción coordinada entre neuronas específicas de determinadas zonas de hipotálamo y el tallo cerebral. Los grupos de excitación son colectivamente representado por las neuronas que contienen acetilcolina, histamina, norepinefrina y serotonina, o péptidos específicos, tales como la orexina. Las neuronas activas durante el dormir, están presentes en el hipotálamo lateral y el área ventral lateral preóptica (VLPO) del cerebro anterior basal.<sup>14,15</sup>

La estimulación optogenética de las neuronas de excitación de los núcleos antes mencionados despiertan al animal, lo que refuerza su posición en los modelos de las redes de la regulación del sueño-vigilia. Sin embargo, no se sabe si las estimulaciones son selectivas de las neuronas llamadas de sueño-activo, es decir, aquellas que inducen el dormir, dado que la metodología de estimulación eléctrica es poco específica y activa o inhiben un gran número de células además de las protagonista.<sup>16-18</sup>

Un grupo de neuronas activas durante el sueño activo contiene la MCH. Estas neuronas MCH se encuentran en el hipotálamo y proyectan ampliamente a todo el cerebro, incluyendo a las neuronas de activación de la vigilia. En un estudio reciente, el gen para el canal rodopsina-2 (ChR2) se insertó utilizando un promotor MCH cuya especificidad ya se ha establecido. Los investigadores demostraron que la estimulación optogenética de las neuronas MCH aumentan el sueño, contra un fuerte impulso de vigilia, pues se estimularon en la fase de oscuridad de los animales. Por lo tanto las

neuronas MCH, son candidatas a la inducción del sueño en los modelos de las redes de la regulación del sueño-vigilia.<sup>19</sup>

Las neuronas que contienen MCH se colocan con las neuronas productoras de orexina / hipocretina en el hipotálamo lateral, estando en diferentes neuronas, las primeras, con el fenotipo MCH, son más numerosas y se extienden en el hipotálamo rostro-caudalmente. Las neuronas MCH proyectan ampliamente a todo el cerebro y presentan una innervación densa a las estructuras colinérgicas y otros centros de excitación monoaminérgicos. También a las neuronas MCH se les ha encontrado como poseedoras de una gran actividad GABAérgica. Mientras que los receptores de MCH del tipo uno (MCHR1), son los únicos receptores que se encuentra en los roedores. Estos presentan una activación de subunidades Gq, Gi, y Go a nivel sub celular, por lo tanto el principal efecto de la activación de este receptor MCHR1, al disminuir los niveles de cAMP, es el de general una inhibición presináptica y efectos inhibitorios postsinápticos. Por lo tanto, las neuronas de MCH, ejercen efectos inhibitorios.<sup>20,21</sup>

Las neuronas MCH ha sido implicado en varias funciones, incluyendo alimentación, balance de energía, y la actividad locomotora,<sup>22-24</sup> su participación en el sueño y la vigilia también ha sido estudiado ampliamente. Inyecciones intra cerebro-ventricular de MCH, en el período temprano, en la fase de oscuridad, en donde se observa un aumento del sueño MOR en un esquema dosis dependiente,<sup>25</sup> aunque algunas dosis de MCH también aumentan el sueño No-MOR.<sup>19</sup>

Estos resultados son consistentes con la observación de que las inyecciones de MCH intra cerebro ventricular, aumentan ambos estados del sueño, pero está en desacuerdo con los resultados de la neuroanatomía funcional, la farmacológica y la optogenética, cuyos resultados indican, específicamente, el papel de las neuronas de MCH como más delimitadas en la regulación del sueño MOR.<sup>26</sup>

En este punto, hay una discrepancia entre el papel de las neuronas MCH en la regulación de las dos fases del dormir: sueño No-MOR y sueño MOR. Una fuente importante de discordancia en los estudios de optogenética, pueden ser el número de neuronas MCH transfectadas por el vector viral y que podrían no ser activadas por la foto estimulación. Para tratar de remediar esto, se desarrollaron ratones transgénicos mutantes (knock-in), que desplegaron el canal de rodopsina-2 para responder a la estimulación luminosa, o el canal ARCH rodopsina, con funciones de inhibición ante un espectro determinado de luz. Finalmente ambos canales debieron estar localizado sólo en las neuronas MCH. Este tipo de ingeniería genética, permite el desarrollo de ratones knock-in dobles, es decir que expresen proteínas, en este caso de canales sensibles a la luz, en un fenotipo neuronal específico.

Los autores de este estudio encontraron que la estimulación optogenética de las neuronas MCH induce el sueño MOR, y que la estimulación continua con luz de longitud de onda azul, produjo un aumento prolongado del sueño MOR neto, con una reducción del sueño No-MOR. Aunque la inhibición optogenética no mostró ningún efecto sobre el ciclo sueño-vigilia. La ablación con toxina diftérica de las neuronas MCH, mostró un estado de disminución de necesidad de sueño (hiposomnia).<sup>21</sup> Sin embargo, si bien la destrucción de las células MCH suprime el sueño No-MOR, no tiene ningún efecto sobre el sueño MOR. Lo anterior cuestiona una explicación causal lineal entre MCH y sueño MOR. Una explicación al respecto puede estar en relación al otro sistema neuronal con el que se conectan las neuronas MCH, las neuronas ORX, en el mismo hipotálamo lateral, y que parecen tener las mismas funciones pero de manera recíproca.

La orexina y la MCH residen en el área hipotalámica lateral (LHA) y regulan el sueño y el comportamiento de alimentación en mamíferos. En los roedores, las neuronas de orexina están implicados en la regulación de la vigilia y el consumo de comida apetecible (aquella que se ingiere por placer no para compensar las baja de

energía), mientras que las neuronas con MCH están implicados en la regulación del sueño y el consumo de calorías.<sup>19</sup>

La regulación de la alimentación también implica un circuito neuronal, descrito como el circuito de alimentación, que incluye las regiones de entrada y de salida del núcleo arcuato (ARC) en hipotálamo. La importancia de las neuronas del núcleo ARC para la conducta alimentaria se demuestra por la ablación de las principales neuronas del núcleo ARC, que puede causar una inanición fatal en ratas adultas.<sup>27</sup> Tanto el sistema activador ascendente (SAA) que interviene en parte, en el mantenimiento de la vigilia y en el circuito de alimentación, son moduladas por neuropéptidos que regulan la actividad de las neuronas principales en el LHA, a saber, las de orexina y las de MCH. Este par de familias de péptidos, regulan desde el hipotálamo la conducta del dormir y la alimentación. Estas conductas no son homogéneas. Por ejemplo el ciclo sueño-vigilia, presenta diferentes estados o fases, con un correlato neural y mental diferentes.<sup>15</sup> Lo mismo ocurre con la función de alimentación, en donde hay la dimensión de ingesta de alimentos por necesidad calórica y otro tipo de conducta de ingesta, que aún cuando puedan tener la misma función calórica, producen una condición extra de tipo placentera y pueden ser ingeridos aún cuando el animal este saciado calóricamente.

Las orexinas son dos péptidos OREX-A y OREX-B, que se producen por uno de los dos exones del gen preproorexina. Ambos péptidos se pueden unir a sus receptores OX1R y OX2R. Ambos receptores están acoplados a proteínas G. La OREX-A tiene mayor afinidad por el OX1R, en un orden de magnitud, en comparación al OX2B, al cual también se une. El OX2B, tiene la misma afinidad para los dos tipos de orexinas. Las orexinas pueden facilitar los potenciales excitatorios postsináptico mediados por la liberación de glutamato desde las mismas neuronas OREX (coliberación). Y se ha observado un efecto de tipo despolarización de las neuronas in vivo. Esto implica que las neuronas orexinérgicas generan potenciales excitatorios.<sup>10, 28</sup>

La MCH humana es uno de los tres neuropéptidos codificada por el gen PMCH. Hay dos GPCRs relacionados a la MCH, y hay dos tipos de receptores: receptor MCH 1 (MCHR1) y del receptor MCH 2 (MCHR2). Solamente los mamíferos de orden superior, tales como hurones, perros y primates expresan el MCHR2 funcional. Todas las neuronas MCH contienen ARNm para la isoforma 67 de la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD67)<sup>29</sup>. El MCH puede tener un papel de potenciar el efecto inhibitorio de la transmisión GABAérgica en las terminales neuronales MCH.

Los vertebrados pueden hacer la transición de un estado de excitación (Vigilia, sueño No-MOR o sueño MOR) a otro, en respuesta a los cambios en la actividad dentro de la SAA. Algunas regiones de SAA promueven o fomentan el sueño, la última clase se subdivide en las que promueven el sueño MOR (REMS-on) y las que promueven el sueño No-MOR (REMS-off). El SAA se divide en estructuras del tálamo y otras estructuras extra talámicas. Los núcleos pedunculopontino (PPT) y laterodorsal tegmental (LDT) tienen proyecciones hasta el tálamo, mesencéfalo o proyecciones a través de la formación reticular para el cerebro basal anterior (BF). El sistema extra talámico, consiste en el núcleo dorsal del rafe (DRN), locus coeruleus (LC), LHA, núcleo tuberomamilar (RGT), ventral y ventrolateral (VPAG), así como las sustancia gris periacueductal (vIPAG), y los núcleos paraventricular pre óptico (VLPO) y núcleo medial preóptico (MNPO).<sup>30</sup>

Los modelos funcionales de los circuitos SAA se han utilizado para explicar las transiciones de estado de excitación en los mamíferos. El interruptor de vigilia-sueño describe las transiciones entre la vigilia y el sueño No-MOR,<sup>31</sup> y los interruptores de sueño MOR y sueño No-MOR describe las transiciones entre los sueño No-MOR y sueño MOR durante el dormir.<sup>32</sup> Estos modelos consisten en conexiones inhibitorias mutuas, como se explica en un circuito flip-flop eléctricos, que permiten transiciones dicotómicas entre los estados de excitación.<sup>30, 33, 34</sup>

El interruptor de vigilia-sueño se compone principalmente de una inhibición recíproca de tipo GABAérgica entre los núcleos promotores del sueño, en la región preóptica (VLPO y MNPO) y los dos núcleos colinérgicos, promotores del despertar LDT y PPT, además de los núcleos glutamatérgicos del *peri locus cerúleos* y para braquiales (P-LC y PB) del tronco cerebral, todos ellos con funciones de promotores del despertar, con un aporte adicional del tipo monoaminérgico, como son los núcleos del rafe dorsal, *locus cerúleos*, el núcleo tuberomamilar y de la región de sustancia gris ventral *peri acueductal* (DRN, LC, TMN y VPAG). Los interruptores de la vigilia al sueño, pueden incorporar presión homeostática del sueño, en forma de activación de la región VLPO, con receptores a adenosina tipo 2 (A-2). Las neuronas con ORX pueden promover el estar despierto mediante la interacción de los núcleos de vigilia con un efecto de tipo homeostático (VLPO) y circadianos (núcleos supraquiasmáticos).<sup>35, 36</sup>

El LHA tiene tres poblaciones distintas de las neuronas principales: las neuronas con orexina, las neuronas con HCM y las neuronas que contienen la isoforma 65 de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), denominadas "neuronas GAD65".<sup>37</sup> Las neuronas con orexina disparan sólo durante la vigilia, mientras que las neuronas GAD65 y las MCH disparan sólo durante el sueño y su actividad máxima es durante el sueño MOR.<sup>38</sup> Estos perfiles de acción pueden ser impuestos por la actividad tónica de los promotores del despertar y las regiones SAA, para fomentar el sueño, como son la histamina, la cual pueden ser inhibida, de manera potente por las neuronas MCH *in vitro*.<sup>39</sup> Estos perfiles de descarga de las neuronas LHA permiten una simplificación de los interruptores flip-flop. Las transiciones de sueño No-MOR a vigilia, es el resultado de una sobre activación de las neuronas que dominan, en la reacción del despertar, es decir promotoras de la vigilia, como las neuronas con orexina (necesidad vigilia) y que se oponen a las que estimulan el sueño, esto es las neuronas MNPO / VLPO (la necesidad de sueño).<sup>40</sup>

Las neuronas con ORX se han estudiado *in vivo* a través de la foto-estimulación del canal

rodopsina-2 (ChR2) en roedores transgénicos para las neuronas de ORX, que co-expresan ChR2 (Ox / ChR2). La foto estimulación de neuronas con ChR2 puede activar la transmisión mediada por los receptores glutamatérgicos de AMPA. Las neuronas de orexina pueden inducir los despertares como la fotoestimulación de neuronas ChR2 durante el período reposo circadiano (luz) de manera significativa. Y disminuyen la latencia entre el inicio del sueño y el despertar, desde el sueño MOR y el sueño NO-MOR, respecto a los animales controles<sup>16</sup> esto en las ratas que son privadas durante más de dos horas de sueño.<sup>18</sup> En el experimento anterior, las ORX ejercieron su acción en contra de la presión de sueño, como resultado de la privación por dos horas. En resumen, en este trabajo, se ha confirmado el papel de las ORX en los mecanismos de promoción de la vigilia.

Por otro lado al menos dos estudios de foto estimulación han apoyado la capacidad de las neuronas MCH para promover el sueño MOR *in vivo*. En primer lugar, la foto estimulación de las neuronas MCH en el inicio de un episodio de sueño MOR prolonga su duración (~45%), mientras que la foto estimulación de las neuronas MCH al inicio de un episodio No-MOR aumenta la frecuencia de las transiciones (~80%) entre sueño No-MOR a Sueño MOR.<sup>26</sup> Investigaciones posteriores mostraron que la duración de los episodios de sueño MOR pueden ser aumentados por la foto estimulación de las terminales de MCH, lo cual indica que las neuronas con MCH inhiben la actividad promotora del despertar de las monoaminas.

En segundo lugar, las neuronas MCH, con foto estimulación durante el período activo circadiano (oscuridad), disminuyen significativamente la duración de la vigilia y aumenta la frecuencia de todas las transiciones entre las diferentes fases de vigilia y sueño.<sup>19</sup> En resumen, los estudios mediante optogenética han indicado que la señalización de las neuronas MCH puede aumentar y potenciar la duración y la frecuencia de los episodios de sueño MOR.

## CENTROS DE REGULACIÓN DE APETITO

El orquestar óptimamente los estados de comportamiento complejos, tales como la búsqueda y consumo de alimentos, es fundamental para la supervivencia de un organismo. El hipotálamo antero lateral (LHA) es una región neuroanatómica esencial para los comportamientos apetitivos y consumatorios, pero las neuronas individuales para estos procesos dentro de LHA, que puedan contribuir a esto y como están interconectadas se desconoce. Mediante la técnica optogenética selectiva de estimulación, se ha podido identificar, un subconjunto de neuronas, definidas en su fenotipo molecular dentro de LHA que corresponden a productoras de GABA o GABAérgica (neuronas que expresan VGAT) y glutamato. Estas regulan tanto el apetito y los comportamientos consumatorios. Mientras que la ablación genética de estas neuronas reducen estos fenotipos. Además, estas coordinan a un subpoblación de células en el LHA que contienen a la neuronas MCH y Orx.

La regulación de la alimentación implica respuestas de las neuronas del núcleo ARC a la entrada de señales como las leptinas. La resistencia a la leptina congénita, se correlaciona con la obesidad humana, y la leptina puede despolarizar las neuronas del núcleo ARC *ex vivo*.<sup>41</sup> Las conductas de forrajeo, la aversión al sabor y la ingesta de calorías implican un circuito neuronal descrito como el circuito de alimentación, que incluye conexiones desde y hacia las tres poblaciones neuronales GABAérgica del núcleo ARC: y los péptidos relacionado a agutí y el neuropéptido Y (AgRP), así como las neuronas con la proopiomelanocortina (POMC) y las otras que son sensibles a la insulina.

La fotoestimulación de las neuronas AgRP evocan forrajeo y un comportamiento de alimentación voraz en ratas, lo que indica que estas neuronas pueden determinar el hambre.<sup>42</sup> Hasta la fecha, seis proyecciones de axones han sido conocidas como con una actividad que induce la alimentación cuando son fotoestimuladas, cuatro de las cuales son proyecciones neuronales inhibitorias AgRP y hacia otro tipo de regiones del circuito de la alimentación.<sup>43</sup> La mayor subpoblación que

proyecta son las neuronas oxitocinérgicas hacia AgRP, y las neuronas del hipotálamo paraventricular (PVH). Como la ingesta de alimentos evocados por fotoestimulación de neurona AgRP son similares a los evocados por el silenciamiento de las neuronas PVH, la conectividad entre las neuronas AgRP y PVH puede ser particularmente importante para la alimentación.<sup>44</sup> Esto es apoyado por la presencia adicional de proyecciones desde el PVH a la AgRP, que evocan la alimentación cuando son estimuladas opto genéticamente.<sup>45</sup> La fotoestimulación de proyecciones neuronales desde la AgRP a la LHA también puede evocar la alimentación; sin embargo, el poblaciones neuronales LHA implicadas siguen sin ser identificadas.<sup>43</sup>

## Las neuronas de orexinérgicas motivan el consumo de alimentos apetecibles

Las neuronas de orexinérgicas pueden no regular significativamente la alimentación normal, como ocurre con los ratones knock-out para la prepro-orexina, ya que estos animales, al igual que los de tipo salvaje consumen cantidades similares de comida.<sup>46</sup> Sin embargo, la fotoestimulación de los terminales neuronales del núcleo de la cama de la estría terminalis (aBNST) a las neuronas glutamatérgicas de la región LHA, puede evocar el consumo de alimentos muy apetecibles, en ratones bien alimentados.<sup>47</sup> Esto indica que las neuronas de orexina median el consumo excesivo de alimento altamente apetecibles. El consumo de estos alimentos se basa en la señalización del péptido orexina, como se observó cuando se realizó la administración de un antagonista selectivo del receptor OX1R o un antagonista doble OX1R / OX2R, pero no con un antagonista selectivo para OX2R, estos antagonistas pueden reducir la ingesta de alimentos muy apetecibles de manera significativa, sin alterar la ingesta de comida.<sup>48</sup> Esto se ve apoyado por numerosos estudios en donde los antagonistas a OX1R reducen la autoadministración de sacarosa.<sup>49,50</sup> Estos hallazgos indican que los antagonistas selectivos al receptor OX1R son candidatos farmacológicos potenciales para el tratamiento del trastorno compulsivo de la alimentación.



Las orexinas también puede modular la excitación en respuesta al consumo de comida muy apetecible. El reemplazo del tipo de comida regular por comida apetecible, aumentó la frecuencia de eventos de tipo cataplexicos en ratones narcolépticos knock-out para la prepro-orexina - / -.51, 52 La ablación genética de las neuronas de orexina causas en esto ratones una disminución en el estado de vigilia, durante el período inactivo circadiano (luminoso) en relación al ayuno en los animales controles de tipo salvaje.<sup>53</sup> Esto sugiere una superposición de funciones entre los circuitos LHA que regulan el hambre y el sueño. La orexina puede mantener un estado de actividad aumentada en los animales hambrientos, durante los períodos inactivos circadianos para dar prioridad a la señal de inanición como una amenaza mayor a la supervivencia que a la privación sueño o un ataque de los predadores.<sup>54</sup>

La orexina puede evitar el hambre fatal también durante estados de hipersomnia, en donde los niveles bajos de glucosa después de periodos prolongados de sueño podría desinhibir el despertar actividad, esto es la actividad de la orexina es promotora del restablecimiento de la alimentación, mediante el despertar.

### **Las neuronas de orexina y MCH regulan la excitación con respecto al hambre**

Un animal sano evita la falta de sueño y el hambre. Busca el dormir poco después de comer y comer poco después de despertar. Esta estrategia de comportamiento puede ser regulada por la orexina y por las neuronas con MCH, ya que estas neuronas tienen un papel destacado en los circuitos neuronales que regulan el sueño y la alimentación. Dentro del SAA, las neuronas de orexina prolongan la duración de la vigilia, mientras que las neuronas de MCH prolongan la duración del sueño MOR. Dentro del circuito de alimentación, las orexina y las neuronas con MCH promueven la alimentación a través de la interacción con las neuronas del núcleo ARC de tal manera que las neuronas de orexina motivan la ingesta de alimento sabroso al consumo, mientras que las neuronas MCH motivan el consumo de comida calórica. Aquí, la interconectividad entre la LHA y el núcleo ARC, pueden coordinar juntos,

la duración del sueño y la alimentación en relación a las prioridades (inanición vs. privación del sueño) de continuas amenazas a la supervivencia de un animal. La dependencia de los circuitos neuronales que gobiernan los distintos programas de comportamiento de sueño y alimentación tienen una regulación común y conjunta de los sistemas de orexina y de las neuronas con MCH para facilitar la sintonía entre estos circuitos. En conclusión, la orexina y las neuronas de MCH podrán coordinar la alternancia entre dormir y la alimentación para reducir al mínimo las amenazas para la supervivencia, al caer o permanecer dormidos durante hambrunas severas. Otros sistemas son también relevantes en esta dirección, como es el caso de la adenosina, que activa al núcleo VLPO, el cual interactúa con los sistemas de vigilia, incluyendo las neuronas orexinérgicas y del SAA.<sup>55,56</sup>

## Conclusiones

La tecnología de la optogenética, parece cumplir su función de diseccionar de manera puntual el como las neuronas con determinados fenotipos de transmisión se interrelacionan y explican conductas complejas en su regulación como es el caso del dormir y la alimentación. Por supuesto, que además de los dos sistemas de neuropéptidos ejemplificados en esta revisión, existen otros sistemas de neurotransmisión implicados en las conductas aquí ejemplificadas. En particular el caso de la interacción entre el dormir y la conducta alimentaria se ha elevado a una nueva dimensión de estudio, por la epidemia de obesidad que se observa en la mayoría de los países de occidente, y en especial es el caso de los niños.<sup>57</sup>

Según la Organización Mundial de la Salud, este problema ha adquirido una dimensión de epidemia mundial, en la encuesta The National Health and Nutrition Examination Survey, conducida entre 2007 a 2008, se encontró que el 17 % de los niños entre 2 a 19 años eran obesos, siguiendo los criterios del índice de masa corporal (BMI > a 95 percentiles por edad y crecimiento). Esto es el triple de lo reportado con la misma encuesta en 1976-1980. De estos niños obesos, el 12% corresponden a obesidad mórbida. Estos datos por si mismos, están por arriba de la morbilidad combinada de enfermedades como la fibrosis cística, diabetes juvenil, VIH, y cáncer. Los niños

y adolescentes obesos son muy probable que sean adultos obesos, expuestos a enfermedades como diabetes, enfermedades cardiovasculares, síndrome de ovarios poliquísticos, síndrome de apnea obstructiva del sueño, alteraciones ortopédicas diversas, y una disfunción psicológica severa (ansiedad social)<sup>57</sup>.

Uno de los factores relevantes en este tipo de obesidad ha sido la restricción de sueño. En un meta-análisis de 20 estudios publicados entre 2004 y 2010, en los siete estudios que incluían niños, se demostró de manera consistente la relación inversa entre el tiempo de sueño y aumento de peso.<sup>58</sup>

Los resultados de esta revisión sobre la optogenética y la regulación de dos tipos de conducta interrelacionadas, dormir y alimentación, enmarcadas en el problema de la obesidad infantil, proponen que las contribuciones de las neurociencias permitan diseñar nuevas estrategias de detección genética y farmacológicas, que puedan ser de utilidad para limitar la epidemia de obesidad infantil. Este es un ejemplo, de cómo el conocimiento que resulta de la investigación básica, como es la optogenética, puede trasladarse hasta el terreno clínico y generar nuevas estrategias de entendimiento y tratamiento.

# Referencias

1. Fiala A, Suska A, Schluter OM. Optogenetic approaches in neuroscience. *Curr Biol*. 2010;20(20):R897-903.
2. Miesenbock G. The optogenetic catechism. *Science*. 2009;326(5951):395-399.
3. Arrigoni E, Saper CB. What optogenetic stimulation is telling us (and failing to tell us) about fast neurotransmitters and neuromodulators in brain circuits for wake-sleep regulation. *Curr Opin Neurobiol*. 2014;29:165-171.
4. Huang F, Tang B, Jiang H. Optogenetic investigation of neuropsychiatric diseases. *Int J Neurosci*. 2013;123(1):7-16.
5. Muller K, Weber W. Optogenetic tools for mammalian systems. *Mol Biosyst*. 2013;9(4):596-608.
6. Lalumiere RT. Optogenetic dissection of amygdala functioning. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:107.
7. Yoon HH, Park JH, Kim YH, Min J, Hwang E, Lee CJ, Suh JK, Hwang O, Jeon SR. Optogenetic inactivation of the subthalamic nucleus improves forelimb akinesia in a rat model of Parkinson disease. *Neurosurgery*. 2014;74(5):533-540; discussion 540-531.
8. Salin-Pascual RJ. Aspectos históricos del dormir y el soñar. Vol 1. 1a ed. Mexico: Planeación y Desarrollo Editorial, S.A de C.R.L.; 2014.
9. Astori S, Wimmer RD, Luthi A. Manipulating sleep spindles--expanding views on sleep, memory, and disease. *Trends Neurosci*. 2013;36(12):738-748.
10. Inutsuka A, Yamanaka A. The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:18.
11. Maejima T, Maseck OA, Mark MD, Herlitze S. Modulation of firing and synaptic transmission of serotonergic neurons by intrinsic G protein-coupled receptors and ion channels. *Front Integr Neurosci*. 2013;7:40.
12. de Lecea L. Optogenetic Control of Hypocretin (Orexin) Neurons and Arousal Circuits. *Curr Top Behav Neurosci*. 2014.
13. Gao XB. Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. *Peptides*. 2009;30(11):2025-2030.
14. Mura E, Pistoia F, Sara M, Sacco S, Carolei A, Govoni S. Pharmacological modulation of the state of awareness in patients with disorders of consciousness: an overview. *Curr Pharm Des*. 2014;20(26):4121-4139.
15. Salin-Pascual RJ. Neurobiología del Dormir y el Soñar. In: L. R-C, ed. *Neurología en la Medicina del Dormir*. Vol 1. 1a ed. Mexico: Academia Mexicana de Neurología; 2014:15.
16. Adamantidis A, Carter MC, de Lecea L. Optogenetic deconstruction of sleep-wake circuitry in the brain. *Front Mol Neurosci*. 2010;2:31.
17. Carter ME, de Lecea L. Optogenetic investigation of neural circuits in vivo. *Trends Mol Med*. 2011;17(4):197-206.
18. Carter ME, de Lecea L, Adamantidis A. Functional wiring of hypocretin and LC-NE neurons: implications for arousal. *Front Behav Neurosci*. 2013;7:43.
19. Konadhode RR, Pelluru D, Shiromani PJ. Neurons containing orexin or melanin concentrating hormone reciprocally regulate wake and sleep. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:244.
20. Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol A, Alreja M. Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(40):17217-17222.
21. Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, Tanaka KF, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, Yamanaka A. Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci*. 2014;34(20):6896-6909.
22. Antal-Zimanyi I, Khawaja X. The role of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and mood disorders. *J Mol Neurosci*. 2009;39(1-2):86-98.
23. Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*. 2006;40(6):375-401.
24. Matsui K. [Mind control with optogenetic mice: exploring the causal relationships between brain activity and the mind]. *Brain Nerve*. 2013;65(6):609-621.
25. Luppi PH, Peyron C, Fort P. Role of MCH neurons in paradoxical (REM) sleep control. *Sleep*. 2013;36(12):1775-1776.

26. Jogo S, Glasgow SD, Herrera CG, Ekstrand M, Reed SJ, Boyce R, Friedman J, Burdakov D, Adamantidis AR. Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci.* 2013;16(11):1637-1643.
27. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science.* 2005;310(5748):683-685.
28. Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao XB. Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci.* 2008;28(37):9101-9110.
29. Meister B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 2007;92(1-2):263-271.
30. Luppi PH, Clement O, Fort P. Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Curr Opin Neurobiol.* 2013;23(5):786-792.
31. Saper CB, Cano G, Scammell TE. Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. *J Comp Neurol.* 2005;493(1):92-98.
32. Fuller PM, Saper CB, Lu J. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol.* 2007;584(Pt 3):735-741.
33. Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW. Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1087-1187.
34. Siegel JM. The neurobiology of sleep. *Semin Neurol.* 2009;29(4):277-296.
35. Van Dort CJ, Zachs DP, Kenny JD, Zheng S, Goldblum RR, Gelwan NA, Ramos DM, Nolan MA, Wang K, Weng FJ, Lin Y, Wilson MA, Brown EN. Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(2):584-589.
36. de Lecea L, Huerta R. Hypocretin (orexin) regulation of sleep-to-wake transitions. *Front Pharmacol.* 2014;5:16.
37. Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol.* 2011;172(2):185-197.
38. Sapin E, Lapray D, Berod A, Goutagny R, Leger L, Ravassard P, Clement O, Hanriot L, Fort P, Luppi PH. Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS One.* 2009;4(1):e4272.
39. Williams RH, Chee MJ, Kroeger D, Ferrari LL, Maratos-Flier E, Scammell TE, Arrigoni E. Optogenetic-mediated release of histamine reveals distal and autoregulatory mechanisms for controlling arousal. *J Neurosci.* 2014;34(17):6023-6029.
40. Geerling JC. Waking under pressure. *Sleep Med.* 2013;14(11):1045-1046.
41. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001;411(6836):480-484.
42. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci.* 2011;14(3):351-355.
43. Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell.* 2013;155(6):1337-1350.
44. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature.* 2012;488(7410):172-177.
45. Krashes MJ, Shah BP, Madara JC, Olson DP, Strohlic DE, Garfield AS, Vong L, Pei H, Watabe-Uchida M, Uchida N, Liberles SD, Lowell BB. An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature.* 2014;507(7491):238-242.
46. Sharf R, Sarhan M, Brayton CE, Guarnieri DJ, Taylor JR, DiLeone RJ. Orexin signaling via the orexin 1 receptor mediates operant responding for food reinforcement. *Biol Psychiatry.* 2010;67(8):753-760.
47. Jennings JH, Sparta DR, Stamatakis AM, Ung RL, Pleil KE, Kash TL, Stuber GD. Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. *Nature.* 2013;496(7444):224-228.
48. Piccoli L, Micioni Di Bonaventura MV, Cifani C, Costantini VJ, Massagrande M, Montanari D, Martinelli P, Antolini M, Ciccocioppo R, Massi M, Merlo-Pich E, Di Fabio R, Corsi M. Role of orexin-1 receptor mechanisms on compulsive food consumption in a model of binge eating in female rats. *Neuropsychopharmacology.* 2012;37(9):1999-2011.
49. Cason AM, Aston-Jones G. Attenuation of saccharin-seeking in rats by orexin/hypocretin receptor 1 antagonist. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;228(3):499-507.
50. Cason AM, Aston-Jones G. Role of orexin/hypocretin in conditioned sucrose-seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;226(1):155-165.

51. Oishi Y, Williams RH, Agostinelli L, Arrigoni E, Fuller PM, Mochizuki T, Saper CB, Scammell TE. Role of the medial prefrontal cortex in cataplexy. *J Neurosci*. 2013;33(23):9743-9751.
52. Burgess CR, Oishi Y, Mochizuki T, Peever JH, Scammell TE. Amygdala lesions reduce cataplexy in orexin knock-out mice. *J Neurosci*. 2013;33(23):9734-9742.
53. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*. 2003;38(5):701-713.
54. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(3):171-181.
55. Alam MA, Kumar S, McGinty D, Alam MN, Szymusiak R. Neuronal activity in the preoptic hypothalamus during sleep deprivation and recovery sleep. *J Neurophysiol*. 2014;111(2):287-299.
56. Salin-Pascual RJ. [Hypocretins and adenosine in the regulation of sleep]. *Rev Neurol*. 2004;39(4):354-358.
57. Darukhanavala APS. Sleep and Obesity in Children and Adolescents. In: Reviews A, ed. *Global Perspective on Childhood Obesity*. USA: Elsevier Inc. ; 2011:167-241.
58. Magee L, Hale L. Longitudinal associations between sleep duration and subsequent weight gain: a systematic review. *Sleep Med Rev*. 2012;16(3):231-241.