



## LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL SUEÑO

### **Usando neurotoxinas para entender el circuito cerebral que regula el ciclo vigilia-sueño**

*Neurotoxins as tools to understand the circuit regulating sleep and wakefulness*

Carlos A. Blanco Centurión, Priyattam J. Shiromani

Department of Neurology. Harvard Medical School. Harvard University

Boston, Massachusetts, EUA

Blanco-Centurión CA, Shiromani PJ.

Usando neurotoxinas para entender el circuito cerebral que regula el ciclo vigilia-sueño

Rev Med UV 2008; Sup 2 8(1): 24-36.

#### RESUMEN

Una de las más importantes metas de una disciplina científica es elaborar modelos que expliquen los fenómenos que se están estudiando. Así, para el caso de la neurofisiología del sueño y la vigilia, hay varios modelos bien establecidos que intentan explicar cómo está constituida, así como la forma en que opera la red neuronal que regula estos fenómenos. Por otro lado, los modelos no sólo explican cómo los fenómenos ocurren; sino además; de ellos se pueden derivar predicciones basadas en su lógica interna. Basados en estas predicciones, los modelos se ponen a prueba constantemente y así se constata su veracidad. En este capítulo se abordará algunos ejemplos de cómo en nuestro laboratorio hemos usado neurotoxinas para probar directamente varias hipótesis en donde se propone que ciertos grupos de neuronas regularían los estados de vigilancia. El propósito de usar neurotoxinas es destruir estas neuronas para luego observar los efectos de estas lesiones sobre el sueño y la vigilia. Así, se revisarán las lesiones de las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus*, de las histaminérgicas de núcleo tuberomamilar, de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, así

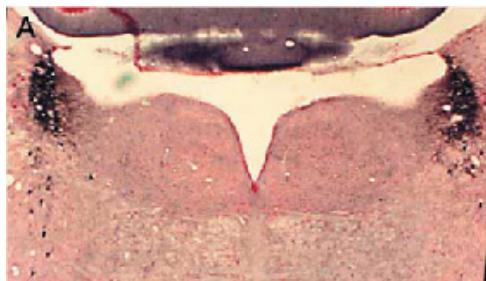
como finalmente se relatará los efectos sobre los estados de vigilancia de las lesiones múltiples de estos mismos grupos neuronales. Cada parte fue tratada brevemente y se dejaron los detalles metodológicos para ser consultados en las referencias respectivas.

**Palabras clave:** lesión, imunotoxinas, saporina, locus coeruleus, núcleo tuberomamilar, cerebro basal anterior

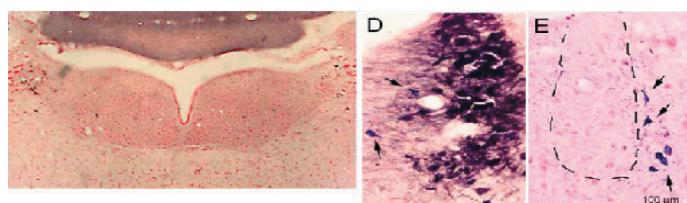
#### **El locus coeruleus como regulador de la vigilia y el sueño MOR.**

El locus coeruleus (LC) es un pequeño y muy compacto agregado de varios miles de neuronas que se ubica en la porción lateral de la sustancia gris pontina justo al lado del cuarto ventrículo (Fig. 1). Como neurotransmisor principal, las neuronas del LC usan noradrenalina. Las neuronas del LC inervan gran parte del cerebro y la médula espinal con excepción de los ganglios basales. Hay varias evidencias que indican que estas neuronas facilitan la vigilia. Por ejemplo, las neuronas del LC disparan predominantemente

durante este estado, mucho menos durante el sueño no-MOR y permanecen silenciosas durante el sueño MOR<sup>3</sup>. Durante la vigilia, estas neuronas disparan rítmicamente a baja frecuencia pero aceleran significativamente su actividad en asociación con estímulos de diferentes modalidades.

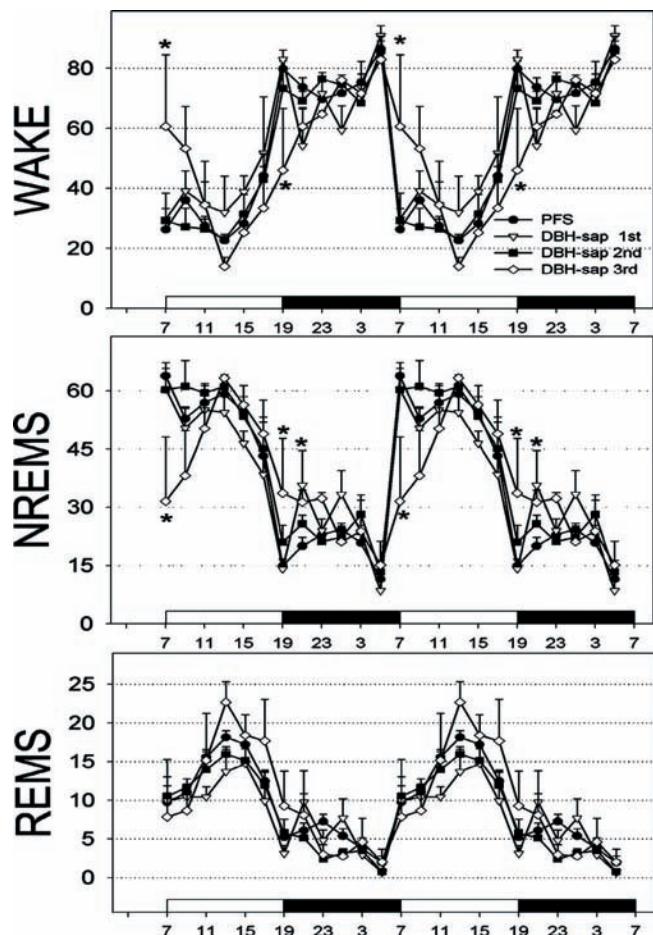


**Figura 1.** Las neuronas del LC como se observan en la rata. Para visualizar estas neuronas, la sección se incubó con anticuerpos que se unen a la enzima dopamina-beta-hidroxilasa. Esta enzima sólo está presente en células que sintetizan noradrenalina como en el caso del LC. El color negro proviene de haber hecho reaccionar la enzima peroxidasa (conjugada indirectamente al anticuerpo primario) con su substrato en presencia de níquel.



**Figura 2.** La inyección local de anti-DBH-saporina destruye la gran mayoría de las neuronas del LC. Panel c muestra una sección coronal a nivel del LC inmunomarcada para DBH (negro) y contrateñida con rojo neutro. Obsérvese como solo pocas neuronas noradrenérgicas sobrevivieron a la toxina. Panel d y e muestra una amplificación del LC en una rata control (inyección de solución salina 0.9%) y una rata lesionada respectivamente. Las células teñidas en azul marino son colinérgicas. Sólo las neuronas noradrenérgicas fueron destruidas por anti-DBH-saporina.

Asimismo, se activan transitoriamente cuando el sujeto presta atención a un estímulo novedoso o relevante<sup>4</sup>. Cuando las neuronas del LC son inhibidas, el EEG cambia de un patrón desincronizado a uno característico de sueño, mientras que cuando son estimuladas sucede lo contrario<sup>4-6</sup>. Más evidencia que apoya el papel alertador del LC proviene de la farmacología. Las inyecciones locales dentro del núcleo del septo medio de agonistas para los receptores adrenérgicos alfa<sub>1</sub> o beta producen alertamiento conductual y del EEG<sup>7,8</sup>. Por el contrario, la simultánea administración central de antagonistas alfa<sub>1</sub>/beta producen EEG sincronizado y sedación conductual aun cuando los



**Figura 3.** La destrucción de las neuronas noradrenérgicas del LC produce un aplanamiento del ritmo diario del sueño-vigilia. Los datos representan los porcentajes de tiempo que las ratas estuvieron en cada estado de vigilancia a lo largo de las 24 h. Las barras horizontales blancas representan el día y las negras la noche. Las ratas no lesionadas tienen mucho sueño no-MOR (NREMS) al inicio de la mañana, mientras que las ratas lesionadas durmieron significativamente menos. Al contrario, las ratas control están muy despiertas al inicio de la noche, mientras que las lesionadas estuvieron significativamente menos despiertas.

animales estén en un lugar novedoso<sup>7</sup>. Todo lo anterior ha dado origen a la hipótesis de que las neuronas noradrenérgicas del LC son componentes críticos dentro del circuito que regula el despertar y la atención<sup>9</sup>. Asimismo, se ha postulado que el LC está críticamente involucrado en la inhibición del sueño MOR<sup>10</sup>. Estas hipótesis se han visto reforzadas por el hallazgo reciente de que la principal eferencia de las neuronas hipocretinérgicas es hacia el LC<sup>11</sup> en donde hay además muchísimos receptores para este péptido<sup>12</sup>. En este sentido se observó además que la administración local de hipocretina activa estas neuronas y produce una respuesta de alertamiento en conjunción con

la supresión del sueño MOR<sup>13</sup>. Dado que la deficiencia de hipocretina produce deficiencias para mantenerse despiertos debido a la intrusión anormal del sueño MOR, se postuló que este defecto debía de estar probablemente mediado por la falta de excitación del LC.

En nuestro laboratorio, pusimos a prueba esta hipótesis lesionando específicamente las neuronas del LC y midiendo los efectos de esta lesión sobre la cantidad de vigilia y sueño por tres semanas consecutivas<sup>14</sup>. Para ello utilizamos una neurotoxina conocida como anti dopamina-beta-hidroxilasa (DBH)-saporina. Esta toxina consiste de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la enzima que sintetiza noradrenalina (DBH). Este anticuerpo está conjugado al inhibidor de la síntesis proteica saporina. Puesto que DBH sólo está presente en neuronas noradrenérgicas, saporina será incorporada únicamente dentro de este tipo de neuronas sin matar a ningún otro fenotipo. Para asegurar que anti-DBH-saporina sólo destruyera a las neuronas noradrenérgicas del LC y no afectara a otros agregados noradrenérgicos presentes también dentro del tallo cerebral, se inyectó esta toxina directamente en el LC. Como se observa en la figura 2, la inyección de anti-DBH-saporina destruyó casi la totalidad de las neuronas noradrenérgicas del LC. Otros agregados noradrenérgicos no fueron afectados, así como tampoco otros fenotipos (colinérgicas) que se hallan en la proximidad del LC. En relación con los efectos sobre la vigilia y el sueño, se observó que en ningún momento los niveles diarios de vigilia o sueño se vieron alterados por la destrucción de las neuronas del LC. Este resultado contradice fuertemente la hipótesis de que estas neuronas son importantes para mantener el cerebro despierto. Por otro lado, aunque los niveles globales de vigilia no cambiaron, sí se observaron cambios en las cantidades de vigilia o sueño en relación con día o la noche (el ritmo circadiano del sueño-vigilia). Así, una semana después de la inyección de la toxina, cuando la muerte neuronal es casi completa, las ratas presentaron 35% más sueño de ondas lentas por la noche, que es cuando normalmente están despiertas. En contraste, durante el día, cuando normalmente duermen, tuvieron 13% menos sueño de ondas lentas y 27% menos de sueño MOR. Estos cambios desaparecieron después de la segunda semana y el único cambio que se observó durante la tercera semana fue que

las ratas estuvieron significativamente menos despiertas durante las primeras horas de la noche pero más despiertas durante las primeras horas del día. A este efecto se le conoce como aplanamiento del ritmo sueño-vigilia. Estos resultados invitan a un replanteamiento de la hipótesis del papel de LC en la regulación de la vigilia y el sueño. Nosotros proponemos que estas neuronas reciben información del reloj biológico del hipotálamo, y que esta aferencia regula su actividad de modo que el cerebro despierte y se mantenga alerta al inicio de la noche (en los animales nocturnos), pero luego que se duerma durante la mañana. Nuestra hipótesis se ve apoyada por los hallazgos recientes que indican que el LC recibe inervación indirecta del núcleo supraquiasmático a través del núcleo dorsomedial del hipotálamo. Esta aferencia excita las neuronas durante la noche pero las inhibe durante el día<sup>15</sup>. Así pues, en conclusión, nuestro experimento de lesión selectiva de las neuronas del LC sugiere que estas neuronas son importantes para regular la vigilia y el sueño durante las transiciones día↔noche pero no son críticas para mantenerse despierto en general o para inhibir el sueño MOR. Asimismo no creemos que la narcolepsia/cataplexia se deba a una deficiencia en la sinapsis mediada por hipocretina a nivel del LC.

### El núcleo tuberomamilar como regulador de la vigilia.

Otro componente de la red neuronal que se postula regula a la vigilia es el núcleo tuberomamilar (TMN). Las neuronas del TMN utilizan el neurotransmisor histamina y son el único grupo de neuronas que sintetiza esta monamina. En forma similar al LC, el TMN es muy pequeño. Su parte principal se ubica en la porción ventrolateral del hipotálamo posterior extendiéndose medialmente hacia el tercer ventrículo (Fig. 4).

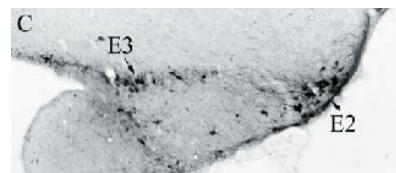
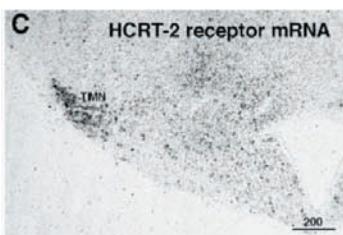


Figura 4. Aspecto hemilateral del TMN en la rata de laboratorio a nivel del hipotálamo posterior. Las neuronas histaminérgicas fueron marcadas con anticuerpos para la enzima adenosina-deaminasa, ya que esta colocaliza con la enzima histidina-decarboxilasa que es la que sintetiza histamina. E2 y E3 se refieren a subagregados de neuronas histaminérgicas, según la nomenclatura propuesta por Inagaki y cols.(1991)<sup>2</sup>.

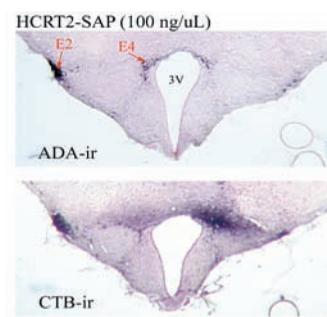
Al igual que el LC, las neuronas histaminérgicas del TMN inervan profusamente el cerebro y la medula espinal<sup>16</sup>. Hay varias evidencias que indican que el TMN ayuda a mantener el cerebro alerta. Por ejemplo, uno de los tipos de medicamentos más usados como inductores de sueño son los antagonistas de los receptores para histamina H<sub>1</sub> (ej. difenilhidramina). Además, los ratones mutantes para la enzima que sintetiza la histamina, histidina-decarboxilasa, muestran una respuesta de alertamiento deficiente cuando se exponen a un ambiente novedoso<sup>17</sup>. En contraste, las inyecciones centrales de histamina dentro del área preóptica del hipotálamo producen alertamiento<sup>18</sup>. Este hecho es muy significativo, ya que esta región del hipotálamo es muy importante para generar sueño sugiriendo que la histamina alerta el cerebro inhibiendo a las neuronas que generan el sueño. Por otro lado los registros unitarios indican que las neuronas del TMN exhiben su máximo nivel de actividad durante la vigilia que demanda atención mientras que están completamente silenciosas durante la vigilia pasiva, así como durante el sueño<sup>19</sup>. También se ha visto que estas neuronas permanecen activas durante la cataplexia, donde se observa parálisis muscular pero el sujeto permanece despierto<sup>20</sup>. La cataplexia es uno de los síntomas cardinales de la narcolepsia. Recientemente también se ha postulado que las neuronas hipocretinérgicas producen alertamiento a través del TMN. Las neuronas hipocretinérgicas inervan fuertemente al TMN, y cuando se inyecta localmente en este núcleo hipocretina se observa un aumento en la liberación de histamina en conjunción con alertamiento<sup>21</sup>.



**Figura 5.** El TMN contiene el receptor tipo 2 para hipocretina. El ARN mensajero para este receptor fue marcado mediante hibridación *in situ*. Obsérvese como la expresión máxima del receptor está concentrada en el TMN.

Esta respuesta no se observa en los mutantes que carecen a el receptor de histamina H<sub>1</sub>. Por todo lo anterior, se ha hipotetizado que las neuronas del TMN son críticas

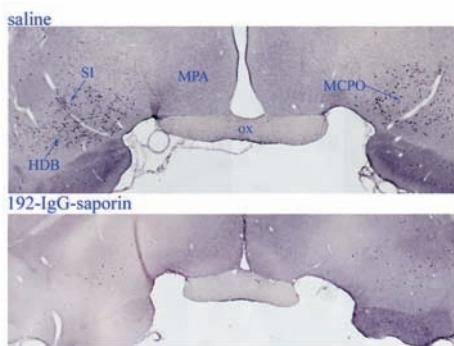
para regular la vigilia. Una manera directa de probarlo es lesionando estas neuronas ya que de ser cierta la hipótesis, estos animales deben de exhibir reducciones significativas en la cantidad de vigilia. Nosotros decidimos destruir a las neuronas del TMN usando la neurotoxina hipocretina-2-saporina. Otras toxinas como las excitotoxinas no destruyen a las neuronas del TMN, probablemente porque no tiene suficientes receptores glutamatérgicos. En contraste, el TMN contiene una gran cantidad de receptores para hipocretina tipo 2 (Fig. 5). El principio de acción de la hipocretina-2-saporina determina que ligando hipocretina-2 se une específicamente a su receptor, y cuando el receptor se internaliza se lleva consigo a la saporina que intoxará mortalmente a la neurona varios días después. Los efectos de la inyección local de hipocretina-2-saporina al TMN pueden verse en la figura 6. Esta toxina destruyó mas de 85% de las neuronas histaminérgicas dos semanas después de la inyección<sup>22</sup>. A pesar de la destrucción masiva del TMN, la cantidad de vigilia no se modificó en estos animales. No obstante, en el grupo lesionado se encontró una correlación positiva entre el número de neuronas histaminérgicas y la cantidad de tiempo que la rata puede permanecer despierta en forma continua. En otras palabras, ratas con muy pocas neuronas histaminérgicas no podían sostener la vigilia más allá de 10 min. Nuestros resultados contradicen la hipótesis que asume que el TMN es crítico para despertar el cerebro, aunque sugieren que las neuronas histaminérgicas ayudan a sostener la vigilia por períodos prolongados, quizás favoreciendo la atención sostenida.



**Figura 6.** Efectos de la inyección local de hipocretina-2-saporina en el TMN. El panel superior muestra los efectos de la inyección unilateral donde se observa la casi completa desaparición de los grupos histaminérgicos E2 y E4. Simultáneamente, con la toxina, el trazador retrógrado CTB fue inyectado (panel inferior), y se observan muchas células marcadas en lado contralateral indicando que las fibras no fueron afectadas.

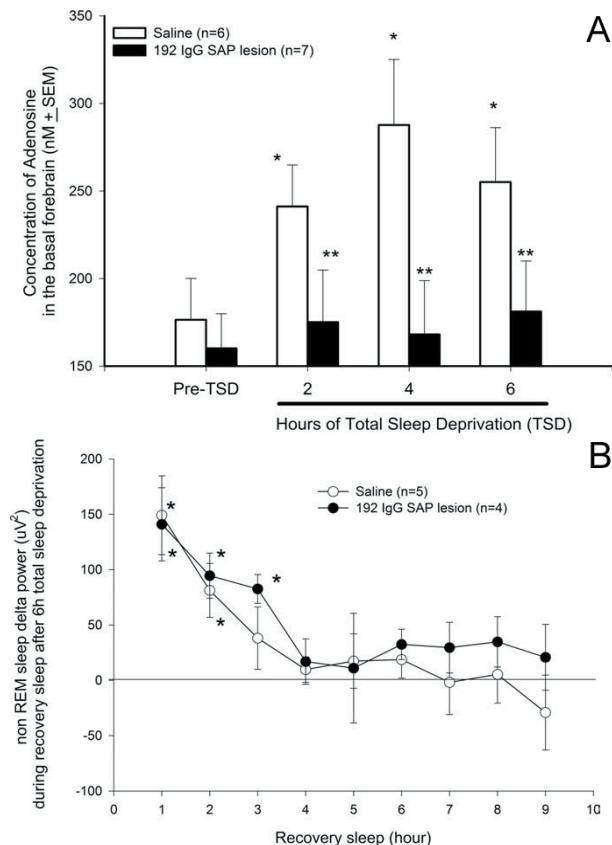
## Las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, la adenosina y la homeostasis del sueño.

Otra hipótesis bien establecida señala que las neuronas colinérgicas situadas en el cerebro basal anterior son críticas para producir la homeostasis del sueño<sup>23</sup>. Este modelo se basa en varias observaciones. Primero, cuando a los animales se les priva de sueño, se observa un aumento proporcional en las concentraciones extracelulares de adenosina en el cerebro basal anterior. Asimismo, cuando se les deja dormir, estas concentraciones disminuyen en paralelo con el rebote de sueño<sup>24,25</sup>. Además, cuando se inyecta localmente adenosina en esta área, se observa un aumento de sueño de ondas lentas muy similar al observado durante el rebote de sueño<sup>26,27</sup>. Por otro lado, se ha visto que sólo las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior responden con espigas de calcio al aumento en las concentraciones de adenosina que ocurre durante la privación de sueño<sup>28</sup> así como la adenosina es capaz de inhibir a estas neuronas *in vitro*<sup>29</sup>. En conjunto, se propone así que conforme la vigilia se prolonga, así mismo se activan las neuronas que facilitan este estado, y eso da como resultado una mayor liberación de adenosina. Ya que la adenosina es liberada en circunstancias de mayor demanda energética, es factible que cuanto más actividad tengan las neuronas, haya más adenosina extracelular. La mayor concentración de adenosina, entonces, inhibiría a las neuronas colinérgicas que a su vez produciría que estas neuronas promotoras de la vigilia se inactiven y luego entonces ocurra el rebote de sueño.



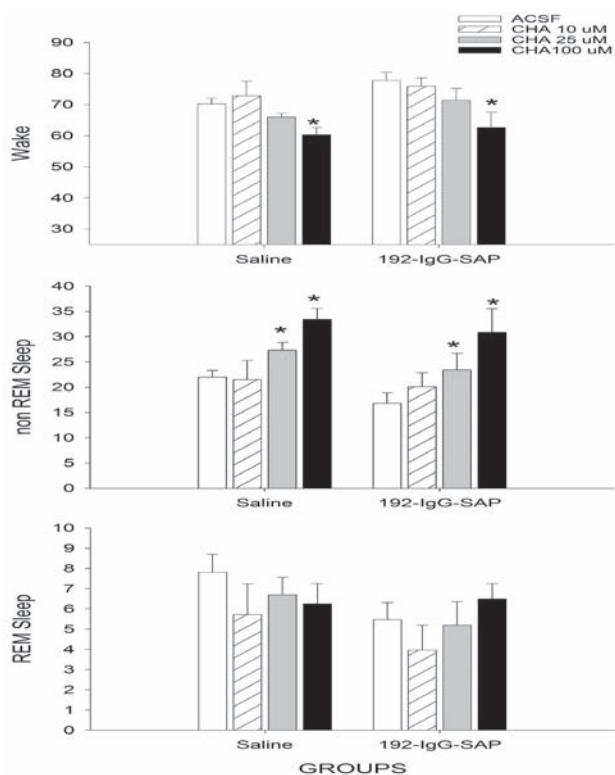
**Figura 7.** Efectos de la inyección intraventricular de 192-IgG-saporina sobre las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior. Las neuronas colinérgicas fueron marcadas usando un anticuerpo que se une a la enzima que sintetiza acetilcolina, i.e. acetilcolina-trasferasa. Esta sección coronal del corresponde al plano donde se ubican el n úcleo magnocelular preóptico (MCPO)-substantia innominata (SI)-parte horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB). Ox=quiasma óptico.

No obstante, en el cerebro basal anterior hay otras neuronas que al igual que las colinérgicas se activan durante la vigilia<sup>30</sup>. Más importante aún es que se ha comprobado que estas neuronas no-colinérgicas también son inhibidas por la adenosina<sup>29</sup>. De modo que existe la posibilidad de que las neuronas no-colinérgicas también participen en la homeostasis del sueño. Nosotros nos dimos a la tarea de probar si la adenosina es capaz de inducir la respuesta homeostática del sueño en ausencia de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior<sup>31</sup>. Hicimos esto destruyendo específicamente estas neuronas usando la imunotoxina conocida como 192-IgG-saporina. Esta toxina es específica para las neuronas colinérgicas ya que se une a un tipo de receptor exclusivamente presente en ellas, i.e. el receptor de baja afinidad para el factor de crecimiento neuronal. Cuando inyectamos 192-IgG-saporina intraventricularmente, observamos que más de 95% de estas neuronas fueron destruidas (Fig. 7). En estos animales, observamos además que la adenosina no se incrementó durante la privación de sueño (Fig. 8A), lo cual indica que las neuronas colinérgicas en efecto son responsables de este fenómeno. Sin embargo, en estas ratas lesionadas no hubo ninguna diferencia significativa en la respuesta homeostática del sueño. Nosotros medimos esta respuesta de varias formas como tiempo total de registro de sueño, midiendo además la acumulación gradual de la somnolencia usando la prueba de múltiples latencias, y también medimos la potencia delta durante el sueño no-MOR. La potencia delta es considerada el índice más confiable de la intensidad de la respuesta homeostática del sueño (Fig. 8B). Tampoco encontramos ninguna diferencia en los niveles basales de vigilia o sueño medidos a lo largo de las 24 hrs. Finalmente investigamos si la adenosina era capaz de inducir sueño en las ratas con destrucción de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior. Para ello se inyectó localmente un agonista del receptor para adenosina tipo A<sub>1</sub> (N6-ciclohexiladenosina o simplemente CHA). Al respecto se ha postulado que es precisamente este receptor el responsable de mediar el efecto inductor de sueño<sup>29</sup>. Desp ués de inyectar dentro del cerebro basal anterior tres diferentes concentraciones de CHA, no observamos



**Figura 8.** El panel A muestra las concentraciones extracelulares de adenosina medidas antes y durante 6 h de privación total de sueño en ratas lesionadas con 192-IgG-saporina o inyectadas con solución salina 0.9%. Las mediciones se hicieron mediante microdialisis-HPLC-UV en la región colinérgica del cerebro basal anterior. El panel B muestra la dinámica de la potencia delta en ambos grupos de animales durante el rebote de sueño. Obsérvese cómo en ausencia de neuronas colinérgicas no hay incremento de adenosina pero sí existe una normal respuesta homeostática de sueño indicada por la potencia delta.

ninguna diferencia entre las respuestas medidas en las ratas lesionadas versus las no lesionadas (Fig. 9). En conjunto, estos resultados confirman que, durante la prolongación de la vigilia, la adenosina es liberada principalmente por las neuronas colinérgicas. Sin embargo, también indican que la adenosina induce la respuesta homeostática de sueño a través de las neuronas no-colinérgicas. Nuestra hipótesis se ve apoyada por varias observaciones previas. Primero, las neuronas colinérgicas únicamente representan 6%<sup>32</sup> de toda la población de neuronas que proyectan hacia la corteza. Además, se ha visto que la adenosina inhibe *in vivo* a gran cantidad de neuronas activas durante la vigilia<sup>33</sup> y por ende es más probable que se trate de neuronas no-colinérgicas en su mayoría. Finalmente, los estudios *in vitro* también apoyan nuestra hipótesis<sup>29</sup>.

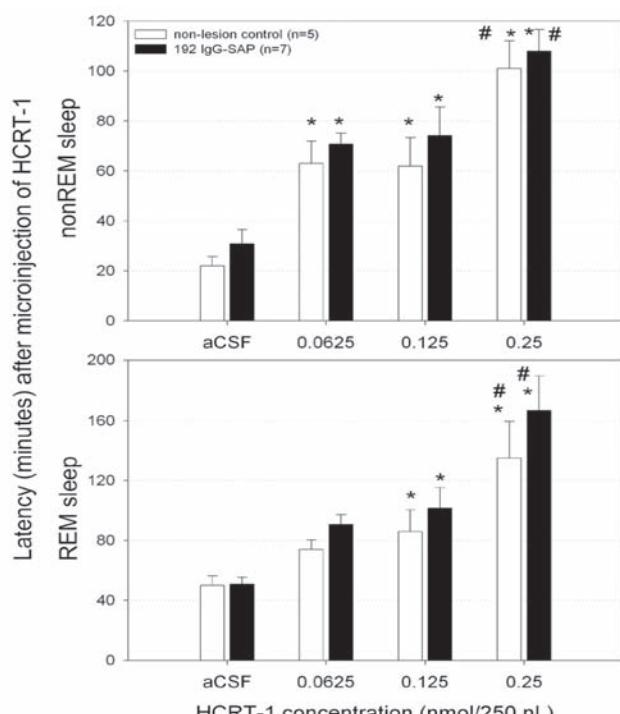


**Figura 9.** Efectos sobre la vigilia y el sueño de ondas lentas de la administración local del agonista para el receptor de adenosina A<sub>1</sub> CHA en ratas lesionadas con 192-IgG-saporina. CHA fue administrado vía microdialisis reversa en el área colinérgica del cerebro basal anterior durante la noche, que es cuando las ratas están mayormente despiertas. Nótese cómo el efecto inductor de sueño se observa en las ratas con lesión de las neuronas colinérgicas con la misma magnitud medida en las controles.

### El papel de la inervación hipocretinérgica hacia el área colinérgica del cerebro basal anterior en la vigilia

Otra hipótesis que se tiene respecto a cómo se mantiene el cerebro despierto tiene que ver con el papel de la inervación de las neuronas hipocretinérgicas hacia el cerebro basal anterior. En específico, se cree que las neuronas hipocretinérgicas excitan a las neuronas colinérgicas que a su vez mantienen la vigilia a nivel de la corteza y el hipocampo<sup>34-36</sup>. Por mucho tiempo se ha sabido que la acetilcolina juega un papel importante en la regulación del EEG durante la vigilia. Por ejemplo se sabe que las neuronas colinérgicas disparan en sincronía con las frecuencias rápidas del EEG que se observan predominantemente durante la vigilia y el sueño MOR, i.e. actividad desincronizada<sup>37</sup>. Asimismo durante la actividad EEG desincronizada, la liberación de acetilcolina medida en la corteza es máxima<sup>38,39</sup>. Confirmando lo anterior durante la vigilia prolongada

se observa un fuerte marcaje para el factor de transcripción c-fos en la mayoría de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior<sup>40</sup>. En contraste, el bloqueo de los receptores muscarínicos para acetilcolina con el alcaloide atropina produce un estado de sedación acompañado de la desaparición de frecuencias rápidas en el EEG<sup>41</sup>. Igualmente las lesiones selectivas de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior es seguida de una reducción en las frecuencias rápidas del EEG<sup>42</sup> y un decremento en la liberación de acetilcolina en esta región<sup>43</sup>.



**Figura 10.** Efectos de la infusión local de hipocretina 1 en el cerebro basal anterior sobre la latencia al sueño en ratas con lesión colinérgica. La lesión de las neuronas colinérgicas se llevó a cabo con la imunotoxina 192-IgG-saporina. Obsérvese que tanto las ratas lesionadas como las ratas controles tienen incrementos similares en la latencia a sueño después de la administración de hipocretina efecto alertador).

Por otro lado se han descrito la presencia de numerosos receptores para hipocretina en el cerebro basal anterior<sup>44</sup> así como se ha constatado que su estimulación excita específicamente a las neuronas colinérgicas<sup>34</sup> e induce una mayor liberación de acetilcolina en la corteza<sup>45</sup>. Finalmente se ha reportado que la infusión local de hipocretina dentro del área colinérgica produce un potente efecto de alertamiento<sup>35,36</sup>. Por todo lo anterior, se postula que la inervación hipocretinérgica de las neuronas

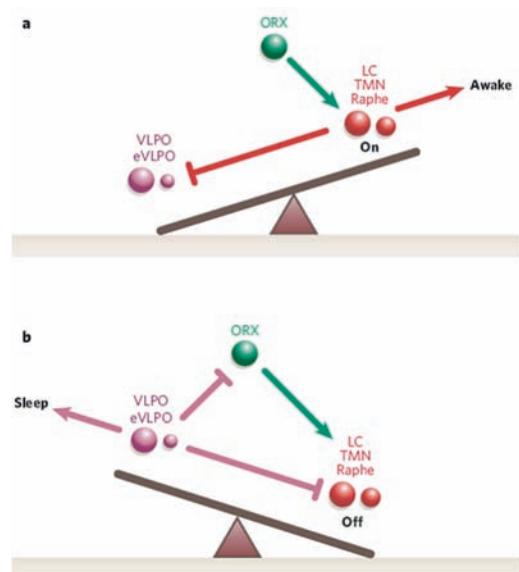
colinérgicas del cerebro basal anterior es importante para que el cerebro se mantenga alerta.

No obstante, además de las neuronas colinérgicas, existen otros tipos de neuronas corticofugales que también se activan durante la vigilia y por tanto pudiera ser que estas otras neuronas también sean inervadas y excitadas por las neuronas hipocretinérgicas. Nosotros decidimos poner a prueba esta hipótesis lesionando las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior para luego administrar localmente hipocretina y en seguida medir sus efectos sobre la cantidad de vigilia y sueño<sup>46</sup>. Como en el experimento anterior, lesionamos a las neuronas colinérgicas con una infusión intraventricular de 192-IgG-saporina. A las ratas lesionadas y los controles se les implantaron además cánulas guía en la región colinérgica del cerebro basal anterior. Dos semanas después de la lesión y en orden aleatorio, se inyectó a través de las cánulas guía varias dosis de hipocretina 1 para luego registrarse los estados de vigilancia por las siguientes tres horas. Lo que observamos es que las ratas con una destrucción mayor a 90% del total de las neuronas colinérgicas siguieron mostrando una respuesta de alertamiento dosis-dependiente de la misma magnitud medida en las ratas control (Fig. 10). Este resultado claramente indica que las neuronas no-colinérgicas son mucho más relevantes para mediar la excitación que se origina por parte de las neuronas hipocretinérgicas. Nuestros resultados además refuerzan la hipótesis de que la vigilia es regulada predominantemente por este tipo de neuronas que son mayoría dentro del cerebro basal anterior. Asimismo, nosotros y otros laboratorios<sup>47,48</sup> hemos demostrado que la lesión de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior no modifica la cantidad diaria de vigilia.

#### Lesión simultánea de tres sistemas involucrados en la regulación de la vigilia: poniendo a prueba el modelo del subibaja.

Como se acaba de describir en los subtítulos anteriores, la lesión selectiva de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, o de las neuronas histaminérgicas del tuberomamilar o de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior no produjo una reducción significativa en la cantidad diaria de vigilia. Esto sugiere en primera

instancia que estos sistemas no son críticos para regular la vigilia como se postula. Sin embargo, existe también la posibilidad en todos los casos de que la vigilia no se haya visto afectada porque la red neuronal que regula este estado de vigilancia es altamente redundante y por ende resistente al daño. En otras palabras, es probable que esta red haya sido capaz de compensar rápidamente la pérdida de unos de sus componentes con la sobreactivación de otro (u otros) grupos neuronales cuya función es análoga. Por ejemplo es posible imaginar que, ante la repentina destrucción del *locus coeruleus*, otros grupos neuronales como el TMN o las neuronas colinérgicas del cerebro basal hayan incrementado sus niveles de actividad; y como consecuencia de tal cambio, la vigilia no se haya visto afectada significativamente. El mismo argumento vale para la destrucción de los otros grupos neuronales.



**Figura 11.** Modelo del subibaja o “flip-flop” de la regulación del ciclo sueño-vigilia. Este modelo elaborado por el grupo de Cliff Saper en la Universidad de Harvard<sup>1</sup> propone que la interacción mutuamente inhibitoria entre dos redes neuronales produce que el cerebro esté casi siempre despierto o dormido pero no en un estado intermedio.

Al respecto, uno de los modelos teóricos más citados, que pretende explicar cómo funcionan la red neuronal que regula la vigilia y el sueño, postula la participación conjunta de varios grupos neuronales cuyas funciones son análogas. A este modelo se le conoce en inglés como el modelo del *flip-flop*, y tomó su nombre

de la propiedad que tienen algunos circuitos eléctricos interconectados de transitar rápidamente de un estado a otro cuando en uno de los lados del circuito se produce una señal más fuerte (Fig.11). Otra analogía simple de este modelo sería ilustrada en el modo de operación de un “subibaja”, donde dependiendo de la fuerza aplicada por cada uno de los dos ocupantes, será la posición en el subibaja. De este modo, el estado de la balanza casi siempre favorecerá a cualquiera de los lados pero raramente se encontrará en una posición equilibrada. El modelo del subibaja postula que por el lado de la vigilia hay al menos tres grupos neuronales cuya actividad producirá un despertar sostenido. Éstos son el LC, el TMN y el rafe dorsal este último agregado contiene neuronas que median su señal nerviosa usando la monoamina serotonina. Como elemento auxiliar, están las neuronas hipocretinérgicas u orexinérgicas (ORX) que también contribuyen a mantener despierto el cerebro. Por el lado de la regulación del sueño, están las neuronas de la parte ventrolateral del área preóptica del hipotálamo (VLPO). Ambos lados están interconectados y se inhiben mutuamente. La vigilia ocurriría cuando la actividad combinada del LC + TMN + Rafe + ORX sobrepasa la actividad del VLPO al que además inhibirá. En un momento dado y por razones que no se explican claramente en el modelo, el equilibrio se invierte, ya que la actividad del VLPO sobrepondrá su inhibición y al mismo tiempo inhibiría a su contraparte, lo que da como resultado el sueño. Este modelo intenta explicar cómo el cerebro permanece la mayor parte del tiempo ya sea despierto o dormido y no en un estado intermedio. Además de utilizar evidencia electrofisiológica y anatómica, el modelo del subibaja se apoya en las observaciones de los modelos de roedores narcolépticos. En estos animales se observa una deficiencia significativa para mantenerse despierto (ataques de sueño) pero además un aumento muy significativo en el número de transiciones entre los estados<sup>49</sup>. Este último fenómeno produce que el sueño se fragmente y dé lugar a que el narcoléptico no pueda sostener ni la vigilia ni el sueño. El modelo predice que la pérdida o daño a cualquiera de los componentes de la red alterará el equilibrio en el otro sentido pero además lo hará más inestable. En otras palabras, la lesión de los componentes críticos de la red que regula la vigilia producirá un aumento del sueño

pero además un mayor número de cambios de estado, i.e. fragmentación del sueño.

Fenotipo	ChAT-ir (BF)		ADA-ir (TMN)		DBH-ir (LC)		HCRT-ir (LH)
Group	Cel No.	% lesión	Cel No.	% lesión	Cel No.	% lesión	Cel No.
Salina (n=6)	4084.8 (85.9)	0	707.8 (62.6)	0	462.3 (21.6)	0	1070.2 (35.1)
BF+TMN+LC (n=6)	443.5*** (95.2)	89.2 (2.3)	174.3*** (30.0)	75.4 (4.2)	31.2*** (9.3)	93.3 (2.0)	988.3 (115.3)
BF+LC (n=7)	159.9*** (29.6)	96.1 (0.7)	355.9*** (21.5)	49.7* (3.0)	26.1*** (5.8)	94.3 (1.2)	1020.3 (90.2)
TMN+LC (n=4)	2589.3*** (359.0)	36.6** (8.8)	175.8*** (30.6)	75.2 (4.3)	16.5*** (6.1)	96.4 (1.3)	1104.8 (115.4)

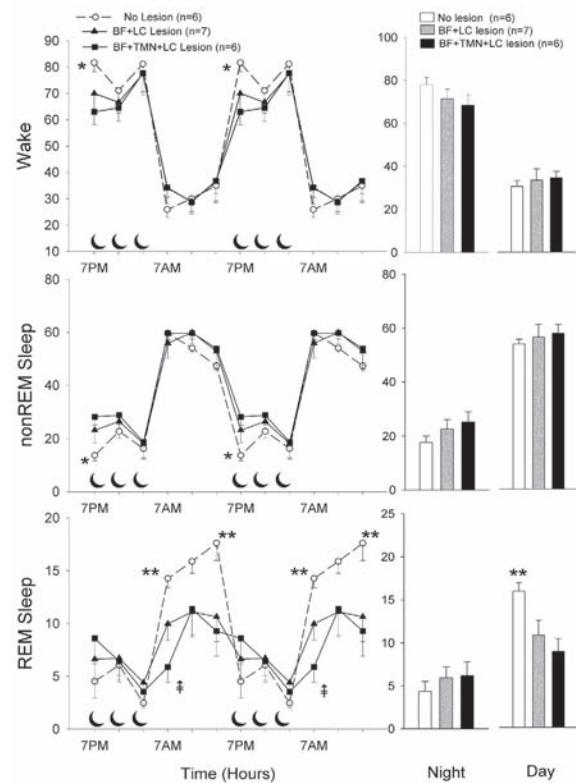
**Tabla 1.** Conteo semi-automatizado de diferentes fenotipos neuronales tres semanas después de la administración de tres diferentes conjugados de saporina. Se contaron el total de neuronas colinérgicas en once secciones correspondientes al cerebro basal anterior (CHAT-IR BF), siete secciones del hipotálamo posterior para estimar la lesión de las neuronas histaminérgicas (ADA-IR TMN), cuatro secciones del puente para las neuronas noradrenérgicas (DBH-IR-LC) y seis secciones para contabilizar las neuronas hipocretinérgicas del hipotálamo lateral (HCRT-IR-LH). Los planos escogidos correspondieron a la extensión completa de la distribución de cada fenotipo neuronal.

Nosotros decidimos poner directamente a prueba el modelo del subibaja realizando lesiones múltiples del LC, el TMN y las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior<sup>50</sup>. Aunque estas últimas no fueron consideradas en el modelo, otros investigadores explícitamente las han señalado como parte de la red neuronal que regula la vigilia<sup>51,52</sup>. Para realizar estas lesiones, usamos otra vez las imunotoxinas ya señaladas con anterioridad, sólo que en esta ocasión las inyectamos simultáneamente. Así pues, lesionamos las neuronas del *locus coeruleus* con anti-DBH-saporina, el TMN con hipocretina-2-saporina y las neuronas colinérgicas del cerebro basal con 192-IgG-saporina. Una vez realizadas estas inyecciones, registramos los estados de vigilancia de estas ratas por tres semanas consecutivas. Como controles, usamos inyecciones de solución salina a 0.9%. Como puede observarse en la tabla 1, se logró que un grupo de 6 ratas presentaran un porcentaje muy alto de lesión en los tres grupos neuronales. En este grupo fueron destruidas casi 90% de las neuronas colinérgicas del cerebro basal, 75% del TMN y más de 90% de las noradrenérgicas del LC. En total, más de 85% de estas neuronas fueron destruidas. Asimismo, se formaron dos grupos más, donde uno tuvo más de 94% de lesión en las neuronas colinérgicas y las noradrenérgicas, pero la lesión del TMN fue de solamente de 50% (n=7). Otro grupo menos numeroso (n=4) consistió

de ratas donde las neuronas del TMN y las del LC fueron destruidas en su gran mayoría, pero las colinérgicas sólo fueron afectadas en 36%. A estos dos últimos grupos se les denominó doble lesión, mientras que al primero se le denominó triple lesión. Dada la importancia de las neuronas hipocretinérgicas y que además son susceptibles de ser destruidas usando hipocretina-2-saporina<sup>53</sup> también se decidió contar estas neuronas. En ningún caso se encontró que su número fuera significativamente diferente con respecto al grupo control.

	Wake	non-REM	REM sleep
Salina (n=6)	54.18 (0.99)	35.68 (0.89)	10.14 (0.25)
BF+LC (n=7)	52.27 (6.28)	39.48 (6.82)	8.25 (2.01)*
BF+TMN+LC (n=6)	50.89 (5.52)	41.59 (5.81)	7.52 (1.06)*

**Tabla 2.** Porcentaje diario de vigilia (wake), sueño no-MOR (Non-REM) y sueño MOR (REM sleep) en ratas control (saline), con doble (BF+LC) o triple lesión (BF+TMN+LC) de grupos neuronales que regulan la vigilia. Estos porcentajes fueron obtenidos con base en 48h de registro continuo tres semanas después de la inyección de tres diferentes neurotoxinas. Nótese como las lesiones no producen una afectación de la cantidad de vigilia.



**Figura 12.** Porcentaje nocturno y diurno de los estados de vigilancia (paneles en la izquierda), así como ritmo diario (paneles en la derecha), tres semanas después de la lesión de tres diferentes grupos neuronales. Los animales con lesión triple tuvieron menos vigilia únicamente al inicio de la noche. Asimismo, durante el día tuvieron menos sueño MOR.

Contrario a lo que postula el modelo del subibaja, en las ratas que presentaron lesiones muy extensas de estos tres (o dos) grupos neuronales no se observó ningún cambio significativo en la cantidad diaria de vigilia o sueño de no-MOR aunque el sueño MOR si se redujo (tabla 2). Cuando se hizo un análisis de las cantidades totales durante el día o la noche, o los porcentajes cada cuatro horas, se observó que en los animales con triple lesión, la cantidad de vigilia se redujo significativamente sólo durante las cuatro horas posteriores al inicio de la noche; y asimismo, durante el día se redujo la cantidad de sueño MOR (Fig. 12). Se hizo además un análisis de la arquitectura de los diferentes estados de vigilancia y se encontró que los animales con triple o doble lesión mostraron significativamente menos episodios, así como éstos duraron significativamente más que los del grupo control. Además, se encontró una correlación altamente significativa entre el mayor número de neuronas pertenecientes a estos tres grupos y un mayor número de episodios. Por el contrario, se vio que a mayor número de neuronas, más breve fue la duración de estos episodios. En otras palabras, los animales con lesión triple o doble tienen menos transiciones entre los estados de vigilancia. Estos resultados contradicen totalmente los postulados del modelo del subibaja, ya que los animales con destrucción de gran parte del circuito que regula la vigilia deberían tener muchísimos más cambios de estado (subidas y bajadas) y no menos.

Nuestra interpretación de estos resultados es que parte de la red neuronal que regula la vigilia, la cual se compone de las neuronas del LC, el TMN y las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, es muy importante para que el cerebro se mantenga despierto pero sólo durante las primeras horas del periodo activo. Empero, después otros grupos neuronales son los principales responsables de esta función en particular, nosotros creemos que las neuronas hipocretinérgicas toman un papel más crítico en este momento del día. Como alternativa al modelo del subibaja que postula que la red neuronal está constituida por elementos análogos, nosotros proponemos una dinámica donde la red neuronal se *complementa* en diferentes tiempos. Como soporte de esta idea, se sabe que la noradrenalina y la serotonina inhiben a las neuronas hipocretinérgicas, mientras que la histamina y la acetilcolina

no producen efecto sobre estas neuronas<sup>54</sup>. La inhibición o la carencia de efectos de estos neurotransmisores sobre las neuronas hipocretinérgicas no es compatible con un modelo que plantea una red neuronal que regula la vigilia trabajando en sincronía pero sí es compatible con una red que opera en forma complementaria. Este nuevo modelo explicaría además por qué hubo una reducción durante el día del sueño MOR ya que las neuronas hipocretinérgicas inhiben poderosamente este tipo de sueño; y al no existir en los animales lesionados el grupo que inhibía a estas, el LC, daría como consecuencia que este tipo de sueño se verá significativamente inhibido. Esta idea de relativa independencia dentro de la red neuronal que controla la vigilia se ve apoyada por los experimentos de dobles KO para hipocretina y noradrenalina. En estos animales no se observa sinergismo en los efectos de ambas mutaciones, así como no se vio que duerman más que los ratones silvestres<sup>55</sup>. Asimismo, creemos que estos cuatro grupos neuronales constituyen sistemas de respuesta rápida del cerebro que le permiten despertarse o dormirse con más facilidad o alternativamente mantenerse despierto por más tiempo en función de demandas cambiantes del medio externo o interno. Nuestros resultados, en conjunto con las observaciones de KO para noradrenalina<sup>56</sup>, histamina<sup>17</sup> o la estimulación selectiva de las neuronas hipocretinérgicas<sup>57</sup> así lo corroboran.

En conclusión, brevemente se ha revisado cómo el uso de toxinas selectivas ha permitido poner a prueba en forma directa y económica modelos establecidos que intentan explicar cómo opera la red neuronal que regula los estados de vigilancia. El poner a prueba estos modelos resulta indispensable para mejorarlos o constatar su validez.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Saper C.B., Scammell T.E., and Lu J. (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437, 1257-1263.
2. Inagaki N., Toda K., Taniuchi I., Panula P., Yamatodani A., Tohyama M., Watanabe T., and Wada H. (1990) An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the

- rat. *Exp. Brain Res.* 80, 374-380.
3. Aston-Jones G. and Bloom F.E. (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* 1, 876-886.
  4. Foote S.L., Aston-Jones G., and Bloom F.E. (1980) Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 3033-3037.
  5. Berridge C.W. and Foote S.L. (1991) Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J. Neurosci.* 11, 3135-3145.
  6. Berridge C.W., Page M.E., Valentino R.J., and Foote S.L. (1993) Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *Neuroscience* 55, 381-393.
  7. Berridge C.W., Isaac S.O., and Espana R.A. (2003) Additive wake-promoting actions of medial basal forebrain noradrenergic alpha1- and beta-receptor stimulation. *Behav. Neurosci.* 117, 350-359.
  8. Berridge C.W. and Foote S.L. (1996) Enhancement of behavioral and electroencephalographic indices of waking following stimulation of noradrenergic beta-receptors within the medial septal region of the basal forebrain. *J. Neurosci.* 16, 6999-7009.
  9. Berridge C.W. and Waterhouse B.D. (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42, 33-84.
  10. Crochet S. and Sakai K. (1999) Alpha-2 adrenoceptor mediated paradoxical (REM) sleep inhibition in the cat. *Neuroreport* 10, 2199-2204.
  11. Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G., and Kilduff T.S. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996-10015.
  12. Greco M.A. and Shiromani P.J. (2001) Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 88, 176-182.
  13. Bourgin P., Huitron-Resendiz S., Spier A.D., Fabre V., Morte B., Criado J.R., Sutcliffe J.G., Henriksen S.J., and de Lecea L. (2000) Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.* 20, 7760-7765.
  14. Blanco-Centurion C., Gerashchenko D., Salin-Pascual R.J., and Shiromani P.J. (2004) Effects of hypocretin2-saporin and antidopamine-beta-hydroxylase-saporin neurotoxic lesions of the dorsolateral pons on sleep and muscle tone. *European Journal of Neuroscience* 19, 2741-2752.
  15. Aston-Jones G., Chen S., Zhu Y., and Oshinsky M.L. (2001) A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat. Neurosci.* 4, 732-738.
  16. Panula P., Pirvola U., Auvinen S., and Airaksinen M.S. (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28, 585-610.
  17. Parmentier R., Ohtsu H., Djebbara-Hannas Z., Valatx J.L., Watanabe T., and Lin J.S. (2002) Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knockout mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *J. Neurosci.* 22, 7695-7711.
  18. Lin J.S., Sakai K., and Jouvet M. (1994) Hypothalamo-preoptic histaminergic projections in sleep-wake control in the cat. *Eur. J. Neurosci.* 6, 618-625.
  19. Takahashi K., Lin J.S., and Sakai K. (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J. Neurosci.* 26, 10292-10298.
  20. John J., Wu M.F., Boehmer L.N., and Siegel J.M. (2004) Cataplexy-active neurons in the hypothalamus: implications for the role of histamine in sleep and waking behavior. *Neuron* 42, 619-634.
  21. Huang Z.L., Qu W.M., Li W.D., Mochizuki T., Eguchi N., Watanabe T., Urade Y., and Hayaishi O. (2001) Arousal effect of orexin A depends on

- activation of the histaminergic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9965-9970.
22. Gerashchenko D., Chou T.C., Blanco-Centurion C.A., Saper C.B., and Shiromani P.J. (2004) Effects of lesions of the histaminergic tuberomammillary nucleus on spontaneous sleep in rats. *Sleep* 27, 1275-1281.
23. Basheer R., Strecker R.E., Thakkar M.M., and McCarley R.W. (2004) Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog. Neurobiol.* 73, 379-396.
24. Porkka-Heiskanen T., Strecker R.E., and McCarley R.W. (2000) Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 99, 507-517.
25. Porkka-Heiskanen T., Strecker R.E., Thakkar M., Bjorkum A.A., Greene R.W., and McCarley R.W. (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276, 1265-1268.
26. Basheer R., Porkka-Heiskanen T., Stenberg D., and McCarley R.W. (1999) Adenosine and behavioral state control: adenosine increases c-Fos protein and AP1 binding in basal forebrain of rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 73, 1-10.
27. Portas C.M., Thakkar M., Rainnie D.G., Greene R.W., and McCarley R.W. (1997) Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 79, 225-235.
28. Basheer R., Arrigoni E., Thatte H.S., Greene R.W., Ambudkar I.S., and McCarley R.W. (2002) Adenosine induces inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated mobilization of intracellular calcium stores in basal forebrain cholinergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 7680-7686.
29. Arrigoni E., Chamberlin N.L., Saper C.B., and McCarley R.W. (2006) Adenosine inhibits basal forebrain cholinergic and noncholinergic neurons in vitro. *Neuroscience* 140, 403-413.
30. Duque A., Balatoni B., Detari L., and Zaborszky L. (2000) EEG correlation of the discharge properties of identified neurons in the basal forebrain. *J. Neurophysiol.* 84, 1627-1635.
31. Blanco-Centurion C., Xu M., Murillo-Rodriguez E., Gerashchenko D., Shiromani A.M., Salin-Pascual R.J., Hof P.R., and Shiromani P.J. (2006) Adenosine and sleep homeostasis in the Basal forebrain. *J. Neurosci.* 26, 8092-8100.
32. Gritti I., Henny P., Galloni F., Mainville L., Mariotti M., and Jones B.E. (2006) Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience* 143, 1051-1064.
33. Alam M.N., Szymusiak R., Gong H., King J., and McGinty D. (1999) Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *J. Physiol* 521 Pt 3, 679-690.
34. Eggermann E., Serafin M., Bayer L., Machard D., Saint-Mieux B., Jones B.E., and Muhlethaler M. (2001) Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience* 108, 177-181.
35. Espana R.A., Baldo B.A., Kelley A.E., and Berridge C.W. (2001) Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience* 106, 699-715.
36. Thakkar M.M., Ramesh V., Strecker R.E., and McCarley R.W. (2001) Microdialysis perfusion of orexin-A in the basal forebrain increases wakefulness in freely behaving rats. *Arch. Ital. Biol.* 139, 313-328.
37. Lee M.G., Manns I.D., Alonso A., and Jones B.E. (2004) Sleep-wake related discharge properties of basal forebrain neurons recorded with micropipettes in head-fixed rats. *J. Neurophysiol.* 92, 1182-1198.
38. Jasper H.H. and Tessier J. (1971) Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science* 172, 601-602.
39. Szerb J.C. (1967) Cortical acetylcholine release and electroencephalographic arousal. *J. Physiol*

- 192, 329-343.
40. Greco M.A., Lu J., Wagner D., and Shiromani P.J. (2000) c-Fos expression in the cholinergic basal forebrain after enforced wakefulness and recovery sleep. *Neuroreport* 11, 437-440.
41. Longo V.G. (1966) Behavioral and electroencephalographic effects of atropine and related compounds. *Pharmacol. Rev.* 18, 965-996.
42. Berntson G.G., Shafi R., and Sarter M. (2002) Specific contributions of the basal forebrain corticopetal cholinergic system to electroencephalographic activity and sleep/waking behaviour. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2453-2461.
43. Gutierrez H., Gutierrez R., Silva-Gandarias R., Estrada J., Miranda M.I., and Bermudez-Rattoni F. (1999) Differential effects of 192IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversion memory formation. *Brain Res.* 834, 136-141.
44. Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M., and Elmquist J.K. (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp Neurol.* 435, 6-25.
45. Fadel J., Pasumarthi R., and Reznikov L.R. (2005) Stimulation of cortical acetylcholine release by orexin A. *Neuroscience* 130, 541-547.
46. Blanco-Centurion C., Shiromani A., Winston E., and Shiromani P.J. (2006) Effects of hypocretin-1 in 192-IgG-saporin-lesioned rats. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2084-2088.
47. Bassant M.H., Apartis E., Jazat-Poindessous F.R., Wiley R.G., and Lamour Y.A. (1995) Selective immunolesion of the basal forebrain cholinergic neurons: effects on hippocampal activity during sleep and wakefulness in the rat. *Neurodegeneration*. 4, 61-70.
48. Kapas L., Obal F., Jr., Book A.A., Schweitzer J.B., Wiley R.G., and Krueger J.M. (1996) The effects of immunolesions of nerve growth factor-receptive neurons by 192 IgG-saporin on sleep. *Brain Res.* 712, 53-59.
49. Mochizuki T., Crocker A., McCormack S., Yanagisawa M., Sakurai T., and Scammell T.E. (2004) Behavioral state instability in orexin knockout mice. *J. Neurosci.* 24, 6291-6300.
50. Blanco-Centurion C., Gerashchenko D., and Shiromani P.J. (2007) Effects of saporin-induced lesions of three arousal populations on daily levels of sleep and wake. *J. Neurosci.* 27, 14041-14048.
51. Jones B.E. (2005) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 578-586.
52. Szymusiak R., Alam N., and McGinty D. (2000) Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep. *Behav. Brain Res.* 115, 171-182.
53. Gerashchenko D., Kohls M.D., Greco M., Waleh N.S., Salin-Pascual R., Kilduff T.S., Lappi D.A., and Shiromani P.J. (2001) Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J. Neurosci.* 21, 7273-7283.
54. Li Y., Gao X.B., Sakurai T., and van den Pol A.N. (2002) Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron* 36, 1169-1181.
55. Hunsley M.S., Curtis W.R., and Palmiter R.D. (2006) Behavioral and sleep/wake characteristics of mice lacking norepinephrine and hypocretin. *Genes Brain Behav.* 5, 451-457.
56. Hunsley M.S. and Palmiter R.D. (2004) Altered sleep latency and arousal regulation in mice lacking norepinephrine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 765-773.
57. Adamantidis A.R., Zhang F., Aravanis A.M., Deisseroth K., and de Lecea L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450, 420-424.