

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades

11
24

EL PEPTIDO VASOACTIVO INTESTINAL (VIP) INDUCE LA RECUPERACION DEL SUEÑO MOR EN GATOS INSOMNES POR LESION DEL HIPOTALAMO ANTERIOR

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
ESPECIALIDAD NEUROCIENCIAS
P R E S E N T A :
MARIA TRINIDAD PACHECO CANO

Director de Tesis: Dr. René Druker Colín



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

Agradecimientos

Resumen

I.	INTRODUCCION	1
A.	El ciclo vigilia-sueño en el gato	3
B.	Substrato Neuroanatómico del sueño	6
C.	Substrato Neuroquímico del sueño:	19
C.1	Serotonina	19
C.2	Noradrenalina	21
C.3	Acetilcolina	22
C.4	Teoría Neurohumoral del Sueño y Factores de sueño.25	
C.4.1	Proteínas y Péptidos	28
D.	Modelos de Insomnio	35
II.	Objetivos	39
III.	Métodos y Resultados (Artículo)	40
IV.	Discusión	41
V.	Conclusiones	48
VI.	Referencias	49

A EL, creador del Universo

A Fernando

porque sin su paciencia, su apoyo, su cariño y su sonrisa en los momentos más difíciles, hubiera claudicado. Por ser el mejor compañero.

A la memoria de mi padre

A mi mamá con cariño y agradecimiento

A Lupis, Lelis, Pinita, Chachis, Paty, Teté, Miguelito, Delia Margarita, Mari Fer, Danielita y Ana Cristina, por su apoyo

A Tere, Luis, Marisol, Enrique, Gaby y Paco por ser mis amigos.

A Gloria, Tere Torres y a Juanito por animarme a seguir.

A mis amigos y compañeros.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. René Drucker Colín, jefe del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y mi asesor durante la maestría, por su apoyo y por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio.

Agradezco también al Dr. Eugenio Aguilar Parada jefe de la sección de patología endocrinológica de la Unidad de Investigación Biomédica del IMSS, por su apoyo

Agradezco a los doctores Jean Louis Charlie Casalonga, Carlos Arámburo de la Hoz, Javier Velázquez Moctezuma y León Cintra McGlone, todos ellos miembros del jurado, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Asimismo agradezco a los doctores Armando Gómez Puyou y Francisco Cervantes por su paciencia durante mis exámenes tutoriales.

Igualmente agradezco a las autoridades de la Unidad de Investigación Biomédica Básica del IMSS, así como a las del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por las facilidades que me brindaron, durante la elaboración de esta tesis.

RESUMEN

La lesión de ciertas áreas del cerebro anterior, como el hipotálamo anterior y la región preóptica, induce tanto en el gato como en el hombre, una disminución en el tiempo total de la fase de sueño de ondas lentas (NMOR) así como de la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). Por otro lado, los trabajos de Legéindre y Piéron llevaron a postular la existencia de un "factor hipnógeno". A partir de entonces y en particular desde los años 70's los mejores candidatos a ser considerados como dichos factores fueron las proteínas y los péptidos. Así, algunos estudios demostraron que ciertos inhibidores de la síntesis de proteínas como el cloranfenicol, disminuyen la cantidad de sueño MOR. Recientemente se ha demostrado que el péptido vasoactivo intestinal (VIP) es capaz de aumentar el sueño MOR tanto en gatos normales como en gatos insomnes pretratados con para-cloro-fenilalanina (PCPA).

La finalidad de este trabajo fué evaluar las propiedades hipnogénicas del VIP en un modelo de insomnio no farmacológico. Para este efecto se utilizaron gatos insomnes con lesiones bilaterales en el hipotálamo anterior y se les administró por vía intracerebroventricular (ICV) 200 ng de VIP el día 10 postlesión.

Los resultados mostraron que la lesión indujo un aumento en el tiempo total de la vigilia y una disminución en el tiempo total del sueño NMOR y del sueño MOR, a los días 7 y 9 postlesión. La administración del VIP al día 10 postlesión, restableció el tiempo total y la frecuencia del sueño MOR por 48

horas, mientras que los tiempos totales de sueño NMOR y de la vigilia fueron restablecidos únicamente por 24 horas. Se sugiere que el efecto del VIP es a través de la modulación de los niveles de excitabilidad de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus y de la región mesencefálica. Se concluye que el VIP ejerce una potente influencia moduladora sobre los mecanismos reguladores del sueño.

I. INTRODUCCION

Desde la antigüedad, el sueño ha interesado a los hombres de casi todas las disciplinas. Así, a través de la historia se le han asignado diferentes significados. Los antiguos griegos otorgaban a los ensueños una función premonitoria, en tanto que Freud le asignaba a los ensueños una función de guardián del sueño; ya que afirmaba que éstos tenían como papel proteger al durmiente de las perturbaciones que eventualmente pudieran surgir tanto provenientes del medio interno (deseos reprimidos) como del medio externo (estímulos ambientales). Los románticos por su parte, comparaban a la vida con un sueño. En la actualidad, sabemos que el sueño forma parte de un ciclo ó ritmo biológico que determina en gran medida las funciones y las actividades de los seres vivos, ocupando aproximadamente un tercio de sus vidas. Sin embargo, a pesar de ésto y de la gran cantidad de investigaciones que se han realizado sobre él, es aún muy poco lo que conocemos acerca de su significado, de su función y de los mecanismos neurofisiológicos y neuroquímicos involucrados en su generación, regulación y mantenimiento.

A principios de este siglo, Pavlov interesado en el estudio de las influencias psíquicas sobre las secreciones salival y gástrica inició el estudio de la actividad nerviosa superior relacionada con la formación y la modificación de los reflejos condicionados. En este trabajo, Pavlov identificó primero la inhibición interna. Por procedimientos experimentales apropiados, logró inducir respuestas condicionadas y también a establecer "un aprendizaje a no responder". A esta falta de respuesta producida

como consecuencia de una experiencia previa le llamó inhibición interna para distinguirla de la inhibición externa consistente en la suspensión de la respuesta conductual debida a estímulos fuertes, nuevos ó extraños que producen un reflejo de orientación. Durante la inhibición interna se produce un cambio notable en un perro alerta y activo capaz de responder regularmente a las señales. Las respuestas secretomotoras disminuyen gradualmente y desaparecen. Además, se desarrolla una somnolencia y una laxitud que se vuelven cada vez más profundas. Si el proceso es llevado hasta el extremo, el animal cierra los ojos, la cabeza cae, el cuerpo se afloja y cuelga de los tirantes que sostienen al animal, el cual pasa así a un estado de sueño emitiendo un ronquido ocasional. De estas observaciones Pavlov concluyó que el sueño se produce como consecuencia de la inhibición interna, al irradiarse y generalizarse en el cerebro. Además, propuso que la inhibición interna proporcionaba la oportunidad para una recuperación después de la excitación y la fatiga.

Con el advenimiento de la técnica de registro de la actividad eléctrica del cerebro (Berger, 1929), fué posible avanzar en el conocimiento de las características del sueño. En 1942 y 1943 Dempsey y Morrison encontraron que la estimulación eléctrica con baja frecuencia en la región talámica paramediana, producía un reclutamiento progresivo de respuestas en forma de husos corticales, semejante a la actividad eléctrica cortical registrada durante el sueño de ondas lentas. De estos estudios Dempsey y Morrison propusieron la existencia de un sistema

tálamo-cortical inespecifico con su origen en los núcleos intralaminares y en los de la línea media. Fué en 1953 que Aserinsky y Kleitman encontraron que el sueño podía dividirse en dos fases de acuerdo a sus características eléctricas. Así, una de estas fases presentaba además de una actividad eléctrica cortical rápida y de bajo voltaje, salvas de movimientos oculares rápidos, por lo que se le denominó sueño desincronizado ó de movimientos oculares rápidos (MOR), en contraste con la otra fase que presentaba una actividad eléctrica cortical más lenta y de alto voltaje, sin movimientos oculares rápidos por lo que se le llamó sueño sincronizado ó NO-MOR (NMOR).

Actualmente las fases del sueño han sido descritas tanto desde el punto de vista electroencefalográfico (EEG) como conductual en diferentes especies incluyendo a la rata (Michel y cols., 1961; Takeuchi, 1970), al gato (Jouvet, 1962; Sterman y cols., 1965) y al hombre (Loomis y cols., 1937; Williams y cols., 1974).

A. EL CICLO VIGILIA-SUEÑO EN EL GATO:

En el gato este ciclo es polifásico, es decir a lo largo de las 24 horas del día está durmiendo y despertando, Jouvet en 1962 lo caracterizó de acuerdo a los siguientes criterios:

1. Vigilia Alerta: La cabeza del animal se encuentra levantada, observándose una dilatación de la pupila (midriasis) y las membranas nictitantes retraídas. En el electromiograma se registra una gran actividad muscular. La actividad electroencefalográfica (EEG) cortical y subcortical es de bajo voltaje, inferior a 50 microvolts (μv) y rápida, de 20 a 30

ciclos por segundo (cps).

2. Vigilia sin atención: La frecuencia de la actividad cortical disminuye entre 5 y 8 cps. Los ojos del animal se encuentran parcialmente cerrados, las membranas nictitantes se ven relajadas de 2 a 3 mm de longitud, las pupilas tienen una dilatación aproximada de 2 mm, la actividad muscular es aún notoria y el ritmo cardiaco disminuye ligeramente al igual que el ritmo respiratorio.

3. Sueño lento: La actividad cortical está constituida por husos de sueño con una frecuencia que varía entre 12 y 18 cps (Jouvet, 1962) ó entre 8 y 16 cps (Sterman y col., 1965) y de alto voltaje, generalmente entre 100 y 200 μ v, predominantemente en las regiones frontales. Estos husos que al inicio del sueño se encuentran entremezclados con actividad lenta EEG de alto voltaje, se vuelven más frecuentes conforme avanza el sueño. Algunos autores dividen a esta etapa del sueño en fase I y fase II, dependiendo de la densidad de husos de sueño y de la cantidad de ondas lentas. El electromiograma por otro lado disminuye pero sin llegar a desaparecer. Las funciones vegetativas solamente presentan ligeras variaciones, la frecuencia cardiaca, así como la temperatura corporal sufren también una ligera reducción, mientras que la respiración se vuelve más lenta y la presión arterial desciende hasta 5 a 10 mm de mercurio. Conductualmente las características más sobresalientes (en cualquier especie) de esta fase de sueño son: ausencia de movimientos corporales, ojos cerrados y en algunos casos adopción de una postura especial. Durante la fase de somnolencia, el gato adopta una postura de esfinge, recargado

sobre el vientre, con la cabeza en el aire y los ojos cerrados. Conforme pasa a sueño MOR la cabeza desciende progresivamente hasta tocar el suelo.

4. Sueño MOR: Durante esta etapa los gatos cambian su postura al reclinar aún más la cabeza, echándose de costado con las extremidades relajadas. El sueño MOR empieza con la aparición progresiva de las denominadas espigas "PGO's" monofásicas, (denominadas así porque pueden registrarse en el puente, en el cuerpo geniculado lateral y en la corteza occipital) y la pérdida total del tono de los músculos antigravitatorios, especialmente los del cuello, lo cual se manifiesta por una línea isoeléctrica en el registro electromiográfico. La atonía de los músculos antigravitatorios coexiste con movimientos de las vibrisas y sacudidas repentinas de las orejas y de las extremidades, denominadas mioclonias. También aparecen salvas de movimientos oculares rápidos que pueden ser verticales, horizontales, circulares ó nistagmiformes pero siempre conjugados, acompañados de miosis extrema y de relajación de las membranas nictitantes. Las espigas PGO's, las mioclonias y los movimientos oculares rápidos junto con las descargas de la formación reticular mesencefálica y los cambios respiratorios, constituyen las manifestaciones fásicas más importantes del sueño MOR, desincronizado ó paradójico. El electroencefalograma por su parte, se hace desincronizado es decir, la actividad cortical se hace rápida, semejante a la de la vigilia alerta (por lo que Jouvet en 1967, también denominó a esta etapa como sueño paradójico), de bajo voltaje 20 a 30 μV y entre 20 y 30 cps

Por otro lado, la temperatura cerebral se eleva mientras que hay un incremento del flujo sanguíneo cerebral, estos cambios junto con la desincronización del EEG y la supresión del electromiograma constituyen los eventos tónicos que caracterizan a esta etapa de sueño. Por otro lado, en esta etapa ocurren las ensoñaciones, por lo que una de las metas del estudio del sueño es la de descubrir su función.

La secuencia temporal de estas etapas, así como las características electroencefalográficas y conductuales del ciclo vigilia-sueño descritas en el gato, son esencialmente las mismas en casi todas las especies estudiadas. Esta constancia a lo largo de la escala filogenética ha llevado de cierta manera, a investigar los mecanismos tanto neurofisiológicos como neuroquímicos involucrados en la generación y regulación de este ciclo.

B. SUBSTRATO NEUROANATOMICO DEL SUEÑO:

Frecuentemente ciertas ideas precientíficas pueden abrir nuevos caminos hacia la investigación científica; por ejemplo, hace 2000 años en los escritos de Lucrecio ya se manejaba el concepto de que el sueño era simplemente la ausencia de la vigilia. Dieciocho siglos más tarde este mismo concepto era expresado en los trabajos de Hartley (1749). Posteriormente en el siglo diecinueve, este concepto es manejado nuevamente en la "Filosofía del Sueño" de Macnish (1830). Contenidos en ambos puntos de vista, de Hartley y de Macnisch, se encuentra una de las ideas más importantes en la historia de la investigación del sueño, la de que el sueño es el resultado de la desactivación o desaferentación. Más tarde Ranson reportó que en el mono las

MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS



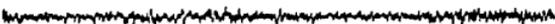
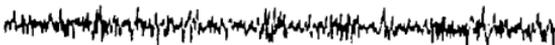
EEG



TONO MUSCULAR



HIPOCAMPO



A



B



C



FIGURA 1. Características EEG y conductuales de los tres estados de vigilancia en el gato. A. Vigilia B. Sueño de ondas lentas ó NMOR y C. Sueño MOR ó Paradójico. Ver explicación en el texto (modificado de Morrison, 1983).

lesiones bilaterales en las áreas hipotalámicas laterales provocaban adormecimiento y somnolencia (Ranson, 1939). Ranson interpretó estos hallazgos como pruebas de que el sueño era el resultado de la eliminación de la vigilia, es decir a la eliminación de las descargas descendentes del hipotálamo hacia el tallo cerebral, la médula espinal y el sistema nervioso periférico. Bremer por su parte en 1937, utilizando dos tipos de preparaciones que él desarrolló: el encéfalo aislado y el cerebro aislado, encontró que en los animales con cerebro aislado, el electroencefalograma desplegaba en forma consistente un ritmo de ondas lentas de 6-10 Hz (ver figura 2). Estos resultados él los atribuyó a la desaferentación sensorial provocada por la interrupción de las vías corticopetales, las cuales eliminaban el flujo de impulsos excitatorios, de origen principalmente cutáneo y propioceptivo responsables del estado de vigilia. Es decir él pensaba que el sueño era simplemente el resultado pasivo de una disminución en la actividad del sistema del despertar.

Fué quizá el oftalmólogo vienés Mauthner en 1890, el primero en reconocer que el sueño tenía una representación anatómica central, al concluir de sus observaciones sobre las enfermedades de Wernicke y Nona, que el área que rodea el núcleo oculomotor era de especial importancia en la regulación del sueño. Años más tarde estas observaciones fueron confirmadas (aunque las localizaciones dadas por Mauthner sufrieron pequeños cambios) cuando en 1918 y 1930 Von Economo, estudiando la enfermedad denominada "encefalitis letárgica" producida por un virus no identificado, encontró que ésta en su fase más aguda

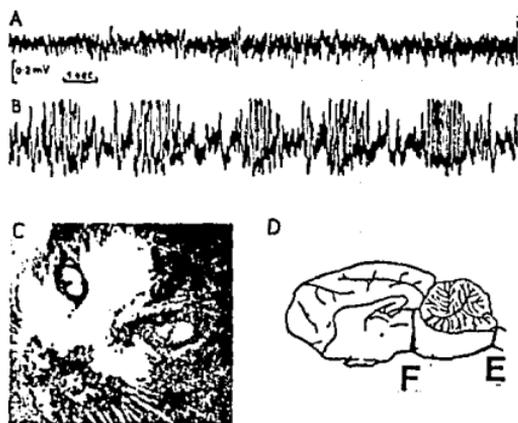


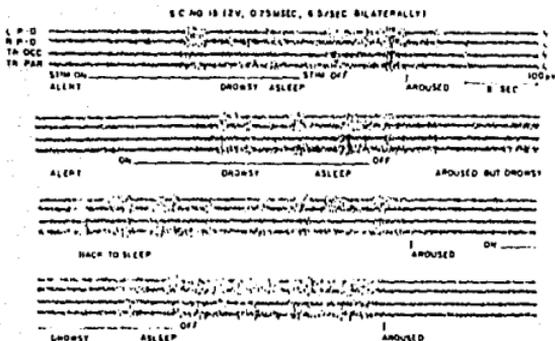
FIGURA 2. Registro de la actividad eléctrica cortical en los dos tipos de preparaciones desarrolladas por Frédéric Bremer. A. actividad típica del estado de alerta en la preparación de encéfalo aislado (transección hecha en la línea E, figura D) B. Husos corticales registrados en la preparación de cerebro aislado (transección hecha en la línea F, figura D). En C pueden observarse las pupilas contraídas de un gato con cerebro aislado semejantes a las observadas en un gato en sueño lento (modificado de Bremer, 1937).

provocaba alteraciones del sueño. Así, él describió dos síndromes opuestos: los pacientes que tenían lesiones en el tegmento mesencefálico y en el hipotálamo posterior sufrían de hipersomnia mientras que las lesiones que afectaban al cerebro anterior basal, incluyendo el hipotálamo anterior y la región preóptica, producían insomnio. Por lo que el hipotálamo posterior fué considerado como el centro de la vigilia, mientras que al cerebro anterior basal se le consideró como un centro hipnogénico ó centro regulador del sueño. Hess por su lado demostró en 1944, que el sueño podía ser provocado por la estimulación eléctrica a bajas frecuencias de ciertos áreas del cerebro anterior, incluyendo la masa intermedia del tálamo y las áreas hipotalámicas preóptica y supraóptica (ver figura 3). A la respuesta obtenida en estas ultimas áreas le denominó "adinamia," dado que ésta se caracterizaba por la caída en la presión arterial y en el tono muscular. Así, es posible inducir sincronización cortical así como todos los signos conductuales del sueño lento, estimulando eléctricamente y bilateralmente tanto con bajos como con altos voltajes, ciertas áreas del cerebro anterior incluyendo la región preóptica (Hess, 1933, 1944; Sterman y Clemente, 1962), la región supraóptica (ver figura 4) (Hess, 1944) y la banda diagonal de Broca (Sterman y Clemente, 1962) (ver figura 5). Efectos similares fueron reproducidos por medio de la aplicación local de pequeñas cantidades de acetilcolina (Ach) dentro de las mismas regiones (Hernández-Peón y Chávez-Ibarra, 1963). Por su parte, Sterman y Clemente en 1962, proponen que el nivel de activación cortical ó sincronización puede ser controlado por dos



FIGURA 3. Sueño inducido en un gato por la estimulación eléctrica del área preóptica. Observaciones realizadas en el laboratorio de Hess en 1944, en Zurich.

A



B

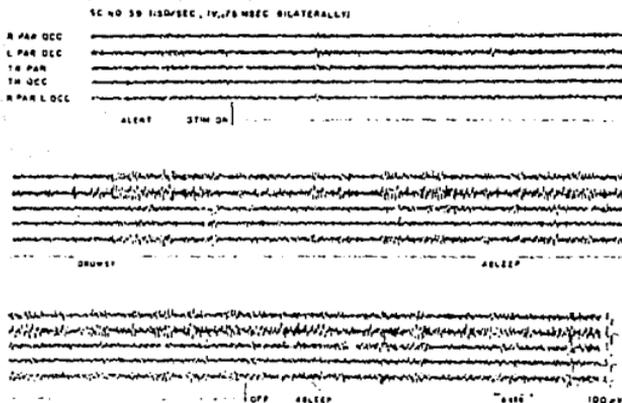


FIGURA 4. Inducción de los signos conductuales y EEG del sueño por estimulación eléctrica bilateral del área preóptica, en animales en libre movimiento. A. con bajas frecuencias y B. con altas frecuencias (modificado de Sterman y Clemente, 1962).

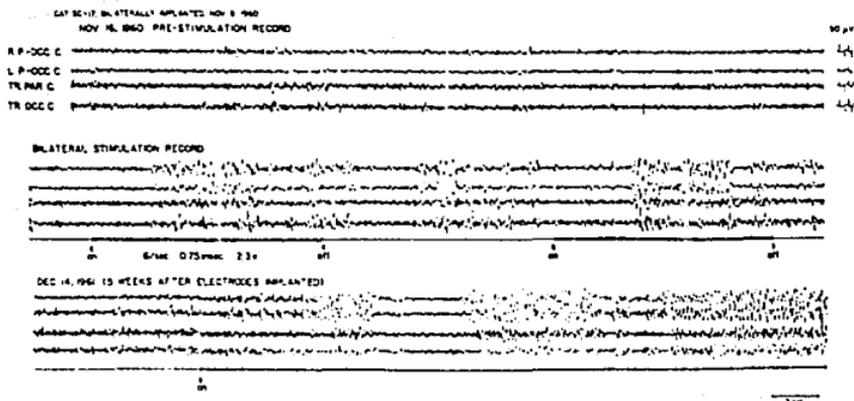


FIGURA 5. Sincronización del electroencefalograma inducida por la estimulación bilateral de la banda diagonal de Broca. Esta respuesta se obtuvo por largos períodos de tiempo independientemente de que la estimulación fuera periódica ó prolongada (modificado de Sterman y Clemente, 1962).

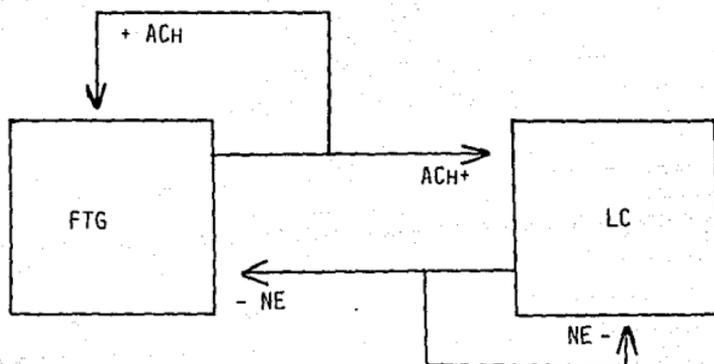
sistemas activos: el sistema reticular activador del tallo cerebral y un sistema inhibitorio interno localizado en el cerebro anterior. Otra evidencia más de que el hipotálamo está involucrado en la regulación del sueño, fué dada en el laboratorio de Nauta (1946), en el que observaron que transecciones colocadas en la parte rostral del hipotálamo producían un insomnio completo. Se ha encontrado también, que las lesiones electrolíticas (Mc Ginty y Sterman, 1968) ó por ácido kainico (Szymusiak y Mc Ginty, 1986) en éstas áreas del cerebro anterior, conducen a un estado de insomnio cuya severidad es proporcional al tamaño de la lesión. Así Mc Ginty y Sterman, en 1968, reportan insomnio completo en dos gatos con grandes lesiones bilaterales, mientras que en 8 gatos adicionales, lesiones similares pero de menor tamaño indujeron una reducción de ambas fases de sueño. Puesto que estos autores encontraron que la fase de sueño MOR desaparecía totalmente en forma temporal luego de la lesión en estas áreas, ellos sugirieron en 1970, que la lesión libera un proceso que en condiciones normales estaría inhibiendo estructuras pontinas involucradas en el disparo del sueño MOR. Por otro lado es bien conocido el hecho de que la enfermedad denominada Alzheimer en humanos, enfermedad que se caracteriza por la degeneración de las neuronas magnocelulares de la región basal del cerebro anterior, está asociada a ciertas anormalidades como la supresión de las fases profundas del sueño 3 y 4 (en el humano el sueño lento se divide en 4 fases) y la reducción del sueño MOR.

Los estudios de la actividad eléctrica neuronal en estas áreas del cerebro anterior durante el ciclo vigilia-sueño también

han contribuido a apoyar estas ideas. La mayoría de ellos coinciden en que las neuronas de estas áreas del cerebro descargan con máxima frecuencia durante el sueño lento ó NMOR y durante las transiciones de vigilia a sueño. Siendo comparativamente inactivas durante la vigilia alerta y con patrones semejantes a la vigilia durante el sueño MOR activo (Kaitin, 1984; Dètari y cols., 1984; Szymusiak y Mc Ginty, 1986). El aumento de las descargas de estas neuronas activas durante el sueño coincidió con el inicio del sueño NMOR anticipando su aparición.

Con el descubrimiento por Moruzzi y Magoun en 1949 de la existencia en el tallo cerebral de un sistema involucrado en la vigilia y el despertar, se dió también gran importancia al tallo cerebral como posible centro de regulación del sueño. Una de las preguntas que más interés ha causado desde entonces, es la localización y la extensión anatómica crítica de la región del tallo cerebral involucrada en el control del sueño MOR. Las transecciones hechas a diferentes niveles del cerebro, pusieron de manifiesto que son necesarias estructuras caudales al mesencéfalo y rostrales a la médula espinal para que el sueño MOR aparezca y que el puente es suficiente para que los signos característicos del sueño MOR aparezcan. Así, la búsqueda de los mecanismos controladores del sueño MOR ha sido enfocada principalmente en las estructuras rostrales del puente. Hobson y col. en 1974, postularon que las neuronas del campo tegmental gigantocelular del puente (FTG) son una parte crítica del sistema que está relacionado con la generación del MOR, al observar en

sus estudios que las neuronas del FTG del puente, aumentaban su actividad específicamente de forma dramática durante este estado de vigilancia. Las células noradrenérgicas del núcleo locus coeruleus y las serotoninérgicas de los núcleos del rafe mostraron, por el contrario, un decremento en su actividad, siendo proporcionalmente más alta durante la vigilia, disminuyendo en el sueño lento y más baja durante el sueño MOR. Basándose en estos hallazgos, Hobson y Mc Carley en 1975 en un intento de explicar los mecanismos tanto neuroanatómicos como neuroquímicos involucrados en la regulación del sueño MOR, propusieron su modelo de interacción recíproca (ver figura 6) en el cuál ellos sugirieron que la oscilación de los ciclos de sueño MOR a nivel celular estaría regulada de la siguiente manera: el inicio del sueño MOR ó desincronizado está determinado por el decremento en la actividad neuronal de las neuronas noradrenérgicas del núcleo locus coeruleus y de las neuronas serotoninérgicas del núcleo rafe dorsalis; éste decremento produce una desinhibición de las neuronas del campo tegmental gigantocelular (FTG). La desinhibición de estas neuronas permite el reclutamiento de la actividad de estas neuronas vía colaterales autoexcitatorias y cuando estas neuronas del FTG alcanzan un umbral de excitabilidad, el sueño MOR se presenta. Estas conclusiones fueron obtenidas de los experimentos realizados en animales restringidos de movimiento. Por lo que estas ideas han sido muy controvertidas. Vertes en 1977 y Siegel y Mc Ginty en el mismo año demostraron que estas neuronas del FTG también aumentaban su frecuencia de disparo en animales en libre movimiento durante la



EL SUEÑO MOR OCURRE CUANDO LA EXCITACIÓN COLINÉRGICA ES ALTA
Y LA INHIBICIÓN NORADRENÉRGICA ES BAJA

FIGURA 6. Modelo de Interacción Recíproca propuesto por Hobson
y McCarley en 1975.

vigilia y en relación a movimientos específicos. Siegel en 1985, encuentra que es necesaria la interacción de mecanismos ponto-bulbares para producir el sueño MOR. En apoyo a estos hallazgos se encontró que el aumento en la frecuencia de disparo no es una propiedad específica de las neuronas del FTG, sino que también las neuronas de la formación reticular mesencefálica y bulbar comparten esta propiedad. Por otro lado, Drucker Colín y col. en 1983 demostraron que las lesiones con ácido kaínico del FTG no previenen la aparición del sueño MOR. De estos estudios se concluyó que las células del FTG no son esenciales en la generación del MOR, sino que el sueño MOR es el resultado de la activación de varios grupos neuronales, siendo las células del FTG y su activación colinérgica parte integral de dicho sistema.

Por su parte Mc Ginty y Drucker Colín en 1982, proponen un modelo del sueño MOR que incorpora 3 características importantes: 1) dependencia de la síntesis de proteínas; 2) dependencia de un rango crítico en la excitabilidad del tallo cerebral y 3) dependencia en el acoplamiento de diferentes sistemas neuronales.

Ellos sugieren este modelo en base al curso que toman los eventos que ocurren durante el sueño. Así, ellos asumen que el sueño MOR está controlado por el acoplamiento de un sistema multioscilandor, ya que los eventos que ocurren durante el sueño, no son la consecuencia de fluctuaciones al azar de la actividad del sistema nervioso, sino que son causados por el acoplamiento ó interacción entre varios grupos neuronales. Asimismo, ellos sugieren en este modelo que el acoplamiento de los diferentes sistemas neuronales está mediado por receptores sensibles a la síntesis de proteínas. Es decir, que el elemento crítico en

la regulación del sueño MOR, es la regulación dinámica de los receptores involucrados en dichos sistemas celulares. De tal forma que la síntesis de proteínas alteraría los mecanismos de los receptores, aumentando su excitabilidad y por lo tanto su respuesta a los neurotransmisores.

Así pues, en estos modelos se pone de manifiesto que en los mecanismos reguladores del ciclo vigilia-sueño, hay una importante participación de elementos neuroquímicos.

C. SUBSTRATO NEUROQUIMICO DEL SUEÑO:

La neuroquímica del sueño y las regiones cerebrales involucradas en su producción se han dirigido principalmente a dos aspectos: la búsqueda de una región neuronal específica o centro responsable de la manifestación del sueño y la búsqueda del "factor" ó "factores" hipnogénicos relacionados con éste. Dicha búsqueda ha dado como resultado el descubrimiento de una gran variedad de estructuras, neurotransmisores (monoaminas y acetilcolina) y proteínas y péptidos que se han postulado como responsables de la generación de ambas fases de sueño. A pesar de ello no existe hasta la fecha una teoría que explique convincentemente los mecanismos relacionados con el sueño (Drucker-Colin y col., 1985).

C.1 SEROTONINA

Fué Jouvett en 1969 el primero en puntualizar la importancia de la serotonina y de los núcleos del rafe en el disparo y en el mantenimiento del sueño de ondas lentas. Su teoría denominada

teoría monoaminérgica es una de las que más aceptación ha tenido. En ésta sostiene que el sueño de ondas lentas ó NMOR es iniciado por la liberación de la 5 - hidroxitriptamina (5-HT) por las neuronas del núcleo del rafe dorsal en el tallo cerebral, mientras que el sueño MOR, es disparado por la liberación de la 5-HT de las neuronas del núcleo rafe caudal. Así, una vez iniciado el sueño MOR, las células que contienen norepinefrina del tercio caudal del locus coeruleus serían el marcapaso para la actividad PGO. Mientras que la vigilia y el alertamiento cortical serían dependientes de la noradrenalina de las neuronas del tercio anterior del locus coeruleus, de las neuronas dopaminérgicas de la formación reticular mesencefálica y de las células colinérgicas de la corteza.

Algunas evidencias han apoyado a esta teoría. Así, se ha demostrado que la administración de la para-clorofenilalanina (PCPA), la cuál inhibe la actividad de la triptofano hidroxilasa y por lo tanto disminuye los niveles de serotonina, induce insomnio en ratas (Mouret, J.R. y cols. 1968) y en gatos (Delorme, F., 1966). Estudios de lesión y de actividad unitaria coinciden también, en que las neuronas de los núcleos del rafe en el mesencéfalo que contienen 5-HT participan en el control del sueño de ondas lentas ó NMOR. Sin embargo, en cuánto a su participación en el sueño MOR, algunos autores (McGinty y col. 1974; Steriade y Hobson, 1976) han considerado a estas neuronas junto con las del núcleo pontino locus coeruleus, células reguladoras del nivel de disparo de las neuronas del FTG.

C.2 NORADRENALINA

El papel que la noradrenalina (NA) juega en la regulación del ciclo vigilia-sueño, es aún muy controvertido. Por ejemplo, se ha demostrado que los fármacos que reducen los niveles de noradrenalina (6-hidroxidopamina, alfa metil paratirosina), producen una disminución paralela del sueño MOR (Laguzzi y col., 1972). Sin embargo, los antidepressivos tricíclicos y los inhibidores de la monoamina oxidasa, quienes incrementan la disponibilidad de norepinefrina también disminuyen el sueño MOR (Vogel, 1983).

Hernández-Peón y Chávez-Ibarra, en 1963 demostraron que la aplicación de microcristales de NA y adrenalina (A) en el hipotálamo, inducen un estado de vigilia con desincronización cortical, lo que sugiere que la NA interviene en los procesos de la vigilia. Estudios farmacológicos también han revelado que la inhibición de la síntesis de la NA a nivel de la tirosina hidroxilasa con la alfa metil-paratirosina, ó a nivel de la dopamina beta hidroxilasa con el disulfiram, produce un decremento en la vigilia en el gato. Adicionalmente a este efecto sobre la vigilia, la inhibición de la síntesis de NA con estos fármacos produjo un decremento en la densidad de espigas PGO y del sueño MOR. Más aún, el alfa-metil-dopa condujo a una supresión total del sueño MOR (por algunas horas) en el gato. Sin embargo, se ha demostrado que las células noradrenérgicas del locus coeruleus no son necesarias para la generación del sueño MOR. Jones y col. en 1977, mostraron que las lesiones electrolíticas del locus coeruleus con la consecuente disminución de NA, no previenen la aparición del sueño MOR. Del mismo modo la

destrucción química del locus coeruleus por la inyección intraventricular de la 6-hidroxidopamina, no afecta la aparición del sueño MOR.

Por otro lado, los registros de actividad unitaria han demostrado que las neuronas noradrenérgicas del LC son tónicamente activas durante la vigilia y el sueño lento ó NO-MOR, e inactivas durante el sueño MOR. Este hecho ha llevado a considerar a éstas células del LC como células "OFF" durante el sueño MOR y a las células del campo tegmental gigantocelular (FTG) (Hobson y col., 1975), como células "ON". El significado funcional del silencio de estas neuronas "OFF" durante el sueño MOR es aún desconocido. McCarley y Hobson y Hobson y col. en 1975, en su modelo de interacción recíproca, propusieron que éstas células son inhibitorias de las células del FTG.

Jones por su parte en 1972, propone que las células noradrenérgicas de la formación reticular mesencefálica y pontina están involucradas en la activación cortical de la vigilia, mientras que aquellas del tegmento pontino están involucradas en la generación de las espigas PGO's y en el sueño MOR.

C.3 ACETILCOLINA

Fué Hernández Peón en 1964, el primero en postular la existencia de un circuito hipnogénico colinérgico limbico-mesencefálico que va desde la región preóptica hasta el tegmento ponto-mesencefálico medial, al observar que la aplicación local de pequeñas cantidades de cristales de Ach, en las diferentes áreas del sistema nervioso que componen este circuito, conduce a la aparición de los signos tanto conductuales como

electroencefalográficos del sueño. Posteriormente, otros estudios (George y col., 1964; Baxter y col., 1969; Mitler y Dement, 1974) confirmaron que la inyección de carbacol (un agonista colinérgico, que no es degradado por la colinesterasa) era capaz de inducir el sueño MOR (al cuál denominaron D-Carb, por ser inducido por el carbacol) y que el tegmento pontino anterior era una zona de disparo en estos efectos. Así, George y col. en 1964 al inyectar carbacol u oxotromorina en los núcleos reticularis pontis caudalis y oralis, 2-3 mm lateral a la línea media del tegmento pontino, observaron dos tipos de respuestas, una de las cuales semejaba a un estado de sueño MOR: atonía muscular, movimientos oculares continuos, actividad teta hipocámpica, desincronización EEG cortical, relajación de las membranas nictitantes y miosis pupilar. La importancia de este estudio radica en la demostración de que los agonistas colinérgicos eran capaces de producir episodios semejantes al sueño MOR cuando se inyectaban en la formación reticular pontina. Estos hechos fueron confirmados por Baghdoyan y cols. en 1984. Estos autores realizaron microinyecciones de carbacol en tres sitios diferentes del tallo cerebral y encontraron que éstas inducían todos los signos tanto conductuales como electroencefalográficos del sueño MOR cuando se realizaban en el puente, observando una supresión de esta fase cuando se realizaban en el mesencéfalo ó en la médula oblongada. Por otro lado, algunos investigadores se abocaron a investigar el sitio anatómico preciso dentro del puente en el cuál la administración de agonistas colinérgicos reprodujeran la aparición de los signos conductuales y

electroencefalográficos del sueño MOR (McKenna y col.,1974; Amatruda y col.,1975; Baghdoyan y cols.,1987). De estos estudios se concluyó que el FTG es un área muy importante en la producción de estos efectos. Estos hallazgos correlacionaron muy bien con los resultados obtenidos de estudios de lesión (Jouvet,1962; Hobson,1965) y con los obtenidos en registros unitarios (Hobson y col., 1974a,b), en ambos tipos de estudios se puntualiza la importancia del FTG en el sueño MOR. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la lesión del FTG con ácido kainico, no impide la presentación de dicha fase de sueño (Drucker-Colin y col., 1983). Este hecho indica que esas neuronas son importantes más no indispensables para producir el sueño MOR.

Otros agonistas colinérgicos han reproducido también estos efectos, estudios en los que se utilizaron agentes colinérgicos de corta y de larga duración indican fuertemente que tanto la activación EEG y la supresión electromiográfica dependen de un sistema en el tallo cerebral colinérgico y/o colinoceptivo (Mitler y Dement, 1974; Baghdoyan y col.,1984); Vivaldi y cols., 1980; Cordeau y cols., 1963).

Recientemente Quattrochi y cols.(1989) en experimentos muy elegantes, demostraron que las microinyecciones en el FTG de carbacol conjugado a microesferas fluorescentes, induce episodios de sueño MOR que no difieren de aquellos producidos por el carbacol libre. Utilizando estas microesferas ellos también demostraron que la zona colinoceptiva de disparo del sueño MOR en el tallo cerebral, recibe aferencias ipsilaterales y contralaterales de núcleos colinérgicos provenientes del tegmento pedunculopontino (PPT), del núcleo parabraquialis (PbN) y del

tegmento dorsolateral (DLT). Asimismo, observaron aferencias aminérgicas marcadas provenientes de los núcleos del Rafé y del Locus Coeruleus, lo cual apoya a la idea de la supresión recíproca del generador del sueño MOR sugerida por experimentos de registro extracelular (Hobson y cols., 1975), estimulación farmacológica (Masserano y King, 1982) y de lesión selectiva (Cespuglio y cols., 1979). Todos estos efectos colinérgicos han sido correlacionados principalmente a receptores de tipo muscarínico (Delashaw, y col., 1979; Hobson, y col. 1983). Recientemente Velázquez-Moctezuma y cols. (1989) demostraron que el subtipo de receptor muscarínico M2 está involucrado tanto en la generación del sueño MOR fisiológico como del inducido por agentes colinérgicos. Asimismo encuentra que las microinfusiones de nicotina en la formación reticular pontina medial aumenta la cantidad de sueño MOR (1990). Sin embargo, este aumento no es tan grande como el observado con las microinfusiones de los agentes muscarínicos M2. Estos resultados confirman la hipótesis de que la activación mediada por los receptores muscarínicos de las neuronas pontinas mediales son muy importantes para la generación del sueño MOR. Siendo a su vez estas neuronas activadas por las neuronas colinérgicas dorsolaterales (Mitani y cols., 1988; Shiromani y cols., 1988a y b).

D. TEORIA NEUROHUMORAL DEL SUEÑO Y FACTORES DE SUEÑO

A principios de este siglo, antes de que se identificaran las monoaminas en el cerebro y de que se les involucrara en la generación y regulación del sueño, existía la

idea de que el inicio del sueño estaba relacionado con factores humorales. Así, el postulado principal en esta teoría era de que ciertas sustancias depresoras se acumulaban en la sangre a un nivel tal que su acción depresora se manifestaba como un estado de sueño. Aunque la mayoría de las teorías humorales de sueño pertenecían al grupo de las "teorías pasivas" que consideraban al sueño como una simple ausencia de la vigilia, algunos autores como Dubois (1901) postularon hipótesis más complejas, en las cuales asumían la acción humoral de estas sustancias sobre un "centro del sueño".

Posteriormente, las observaciones de Legéndre y Pierón en 1910, de que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de perros privados de sueño inyectado intraventricularmente inducía sueño en perros normales no privados, llevaron a estos investigadores a proponer la existencia de un factor "hipnógeno" que se acumula durante la vigilia. Estos hallazgos, fueron confirmados más tarde por Schnerdof e Ivy (1939). A pesar de esto en las décadas siguientes, el trabajo de Piéron y sus ideas tuvieron poco impacto en la investigación del sueño siendo considerada generalmente su teoría de las hipnotoxinas como una proposición romántica e improbable. Así, inicialmente los experimentos fueron conducidos a investigar la transmisión humoral del sueño.

Monnier en 1963, reportó la presencia de un factor inductor del sueño en la sangre venosa de conejos a los cuáles se les había estimulado eléctricamente en el tálamo. Observó que los dializados sanguíneos de estos animales inducía una conducta de sueño cuando era administrado a animales receptores. Posteriormente, este péptido fué caracterizado como un

nonapéptido (Shoenenberger y Monnier, 1977), al cual denominaron Péptido Inductor de Sueño Delta (DSIP). Estos autores reportaron que pocos minutos después de su administración, el DSIP sintético era capaz de inducir predominantemente, sueño con un EEG de ondas lentas . De igual manera se encontró en ratas y en gatos, que la administración sistémica del DSIP era capaz de aumentar el sueño. Sin embargo, se observó que en el gato, el principal efecto era un aumento en el sueño de movimientos oculares rápidos, en contraste al aumento del sueño de ondas lentas observado por Monnier en el conejo.

Por su parte Pappenheimer y col. (1976) de la Universidad de Harvard en un intento de detectar la presencia de un factor inductor de sueño , inyectaron el LCR de cabras privadas de sueño, en el sistema ventricular de las ratas estudiadas. El principio activo encontrado, fué designado como Factor S. Este Factor S fué extraído, parcialmente purificado y concentrado del cerebro de las cabras y de los borregos (Pappenheimer y cols.,1975), así como de los conejos y de las vacas (Krueger y cols., 1978). El efecto del factor S se caracteriza porque produce un aumento gradual en el porcentaje del sueño de ondas lentas, concomitante a un aumento en la amplitud de las ondas delta EEG; estos cambios alcanzan su nivel máximo 2 horas después de la infusión y su duración es de aproximadamente 5 a 10 horas. Este factor S que inicialmente había sido extraído y parcialmente purificado del LCR y del cerebro de animales privados de sueño, fué posteriormente detectado en la orina humana (Krueger y col.,1980). Garcia- Arrarás, en 1981 reporta que la infusión

intraventricular del factor S obtenido de la orina humana a gatos, les induce un aumento en el sueño de ondas lentas y cambios muy pequeños en la cantidad de sueño MOR. Otras sustancias derivadas de la orina humana y del cerebro del conejo denominadas como péptidos muramil, han demostrado poseer propiedades promotoras del sueño NMOR (Krueger y cols. 1986 y 1987.)

C.4.1 Proteínas y Péptidos

Fué Oswald en 1969 el primero en sugerir una correlación entre la intensidad de síntesis de proteínas y el sueño MOR. Así, él pensaba que el rebote de sueño MOR observado luego del retiro de una droga, reflejaba una fase de reparación neuronal denotada por un aumento en la síntesis de proteínas. Fué a partir de los años 70's que las proteínas empezaron a considerarse como los mejores candidatos de "factores inductores de sueño". Stern en 1975 y Drucker-Colin en el mismo año demostraron que la inyección de hormona de crecimiento (HC) tanto en gatos como en ratas, provocaba un aumento importante del sueño MOR. En el hombre, se ha confirmado en repetidas ocasiones que las fases de sueño lento 3 y 4 están asociadas con un aumento de la HC en el plasma sanguíneo. Dado que la hormona del crecimiento es una hormona anabólica que ejerce importantes efectos en la síntesis de proteínas, se ha sostenido que el aumento de la fase del sueño MOR observado luego de la inyección de esta hormona, podría ser el resultado indirecto de la formación de macromoléculas. Estas ideas fueron fuertemente apoyadas por experimentos en los cuales se demostró que diferentes tipos de inhibidores de la síntesis de proteínas

reducen específicamente el sueño MOR en ratones (Pegram y col., 1973), en ratas (Kitahama y Valatx, 1975; Rojas Ramirez y col., 1977) y en gatos (Petitjean, 1979; Drucker-Colin, R. y col. 1979). En experimentos más específicos, Drucker-Colin y col., en 1975, demostraron con la técnica de "Push-Pull" que en el gato, hay una liberación cíclica de proteínas de la Formación Reticular Mesencefálica (FRM) y que los picos máximos, en el ciclo de las proteínas, corresponden a los períodos más grandes de sueño MOR del animal. Siendo comparativamente mayor la liberación de proteínas durante el MOR que durante la vigilia (Drucker-Colin, y Spanis, 1975). Más aún, se encontró que el insomnio producido por las lesiones bilaterales del área preóptica (Drucker-Colin, y Gutiérrez, 1976), anulaba la liberación cíclica de las proteínas, obtenidas de la perfusión de la formación reticular mesencefálica (MRF), a través de la técnica de Push-Pull (ver figura 7). Esta ciclicidad en los niveles de las proteínas puede ser abolida también por la administración de cloranfenicol, el cual reduce específicamente el sueño MOR (ver figura 8).

En experimentos adicionales se ha mostrado que ciertos inhibidores de la síntesis de proteínas afectan la frecuencia promedio de la actividad unitaria en la FRM y en la formación reticular pontina (FRP), durante el NMOR y el periodo de ondas PGO's, justamente antes del inicio del MOR. Estos hechos sugieren que la aparición del sueño MOR depende de un cierto nivel de actividad neuronal, de tal forma que si la actividad neuronal cae abajo de un umbral crítico, el sueño MOR no se presenta. Es probable que el cloranfenicol prevenga el inicio del sueño MOR

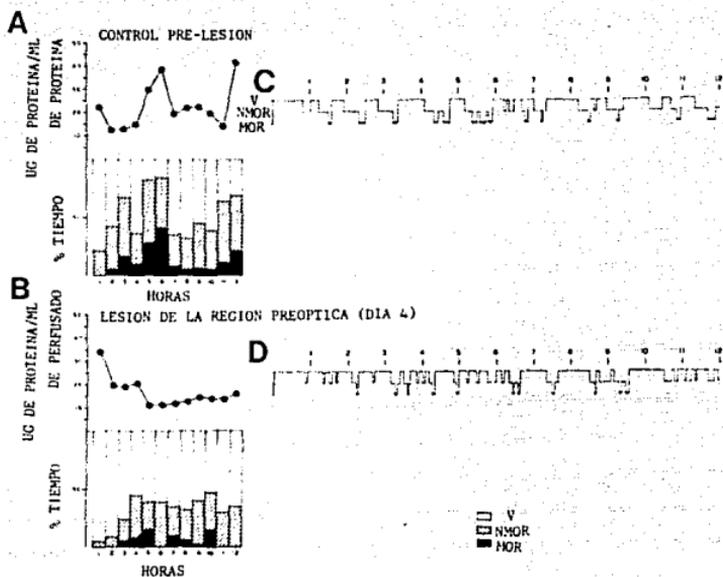


FIGURA 7. Niveles de proteínas y porcentajes de tiempo en vigilia, sueño NMOR y MOR obtenidos de gatos normales prelesión (A) y con lesión bilateral de la región preóptica (B). C y D muestra los hipnogramas de dichos animales (modificado de Drucker Colin, 1981).

al impedir que las neuronas del tallo cerebral alcancen un nivel crítico de excitabilidad.

Otros autores como Ricu en 1982 y Jouvet en 1984, investigaron la acción promotora de sueño de una variedad de neuropéptidos. Sin embargo no observaron ningún efecto hipnogénico en la angiotensina 11, la arginina vasotocina, la substancia P, la neurotensina, la beta endorfina y las encefalinas. Contrariamente a estos hallazgos, algunos derivados de la proopiomelanocortina (Chastrette y col., 1985) y la somatostatina (Danguir, 1986) demostraron poseer propiedades inductoras del sueño MOR.

Con el descubrimiento de que ciertos péptidos como la colecistocinina (CCK-8) y el péptido vasoactivo intestinal (VIP), identificados inicialmente en el tracto gastropancreático, están presentes naturalmente en el sistema nervioso central de los mamíferos y especialmente en aquellas áreas del sistema nervioso central que se han relacionado con la regulación del sueño, recientemente algunos estudios han sido dirigidos a investigar el papel de estos péptidos en el sueño. A pesar de que ambos péptidos no tienen ninguna relación estructural.

El VIP es un polipéptido formado por 28 aminoácidos, que fué aislado en 1970 del duodeno porcino (Said y Mutt, 1970). Estructuralmente está relacionado con otros péptidos como el péptido gástrico inhibitorio (GIP), la secretina, el glucagon, el péptido porcino histidina isoleucina (PHI) y la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GRF) (Rosténe, 1984). Técnicas como la inmunohistoquímica y el radioinmunoanálisis han ayudado a determinar su distribución y su localización

subcelular, dentro del sistema nervioso central de la rata y en el de otras especies (Besson y cols., 1979; Eiden, y cols., 1982)

En general, el VIP ha sido localizado en mayores proporciones en áreas telencefálicas como la corteza cerebral, la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo, mientras que en el tallo cerebral las concentraciones más altas están confinadas a las regiones dorsales, especialmente en la sustancia gris periacueductal, estructuras adyacentes al cuarto ventrículo como el Locus Coeruleus y el núcleo reticular gigantocelular y en los núcleos mesencefálicos cercanos al acueducto cerebral, como el rafe dorsal y el magnus (Eiden y cols., 1982). Estudios electrofisiológicos en ratas y gatos han revelado que el VIP produce diversos efectos en las neuronas tanto del sistema nervioso central como del periférico. Así, estudios con registros extracelulares han demostrado que el VIP puede alterar (aumentar ó disminuir) la frecuencia de disparo de las neuronas de la corteza cerebral (Ferron y cols., 1985), el hipotálamo (Haskins y cols., 1982), el mesencéfalo (Phillis y cols., 1978) y el locus coeruleus (Wang y Aghajanian, 1989).

Besson y cols. en 1986 estudiaron las características bioquímicas y la distribución topográfica de los sitios de unión del VIP en el cerebro de la rata y encontraron que entre las zonas de mayor densidad se encuentran la glándula pineal, el núcleo dorsomedial del hipotálamo y el hipocampo. Por su parte Martin y colaboradores en 1987, observaron en sus estudios autoradiográficos que en el cerebro de la rata el locus coeruleus posee una de las densidades más altas de sitios de

unión para el VIP. Por otro lado, el hecho de haberse localizado en las terminaciones nerviosas, el que pueda ser liberado de éstas de una manera dependiente de calcio por el potasio, y el que pueda unirse a receptores específicos acoplados a la adenilato ciclasa, han sugerido que el VIP podría estar funcionando como un neurotransmisor ó como un neuromodulador (Giachetti y cols., 1977; Emson y cols., 1978). Así, se ha reportado que el VIP interactúa con varios neurotransmisores. Por ejemplo en la corteza cerebral, se ha encontrado que el VIP sinergiza la acción de la NA deprimiendo la actividad espontánea de ciertas neuronas (Schaad y cols., 1987). En el sistema nervioso periférico, se ha demostrado que el VIP puede coexistir con la acetilcolina en las neuronas parasimpáticas y simpáticas ganglionares (Lundberg y cols., 1979) y que puede tener acciones moduladoras selectivas sobre la transmisión colinérgica de los ganglios simpáticos y en la glándula salival del gato (Kawatami y cols., 1985; Mo y Dun, 1984). Altas concentraciones de VIP han sido detectadas en el líquido cefaloraquídeo liberado del cuarto ventrículo, por estimulación colinérgica (Kaji, 1983).

El VIP administrado por vía intraventricular, ha demostrado poseer propiedades hipnogénicas bajo diferentes situaciones experimentales. En ratas normales, éste es capaz de aumentar los niveles de sueño lento y/o de sueño MOR, dependiendo si es administrado durante el período de luz ó durante el período de obscuridad. También se ha observado una recuperación de ambas fases de sueño a niveles aproximadamente normales, en las ratas a las cuáles se les produjo insomnio a través de la inyección intraperitoneal de la p-clorofenilalanina (PCPA, que es un

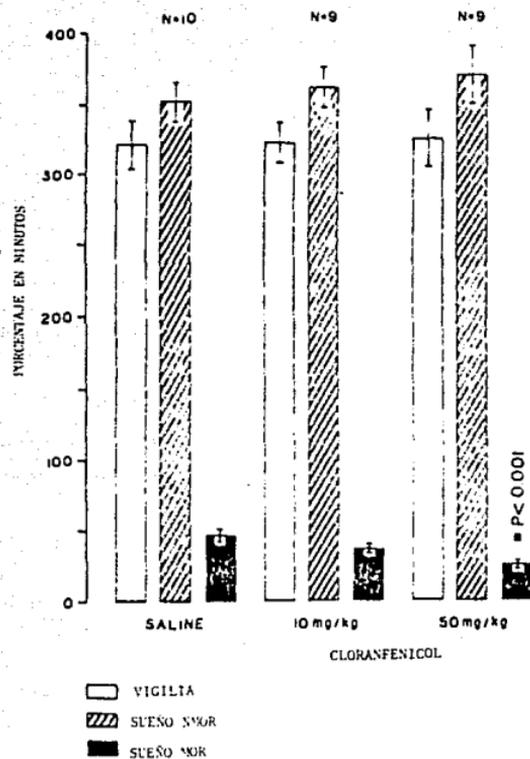


FIGURA 8. Histogramas que muestran el efecto del clorfenicol en la vigilia, el sueño NMOR y el sueño MOR. Como puede observarse únicamente la dosis de 50 mg/Kg redujo significativamente el sueño MOR (modificado de Drucker Colin, 1981).

inhibidor de la triptofano hidroxilasa y por lo tanto disminuye los niveles de serotonina) ó por la inyección del cloranfenicol, (Riou y cols., 1982). Asimismo, se ha demostrado que el VIP administrado en el 4o. ventriculo restablece los niveles de sueño MOR en gatos privados de sueño pretratados con PCPA (Prospéro García, y cols., 1986) e incrementa los niveles de sueño MOR en gatos normales (Drucker Colin, y cols., 1984). Por otro lado, también se ha estudiado la acción hipnogénica de la CCK-8, que es otro péptido gastropancreático localizado también en el cerebro y que no está relacionado estructuralmente con el VIP. Dichos estudios han mostrado reultados contradictorios. Asi, Jouvét (1984) encontró que este péptido no posee propiedades hipnogénicas, sin embargo otros investigadores encontraron un incremento en los niveles de sueño MOR, tanto en ratas (Obál, 1986) como en gatos pretratados con PCPA (Prospéro García, y cols., 1987).

D. Modelos de Insomnio:

Una de las estrategias más empleadas en el estudio del sueño es la de reducir el tiempo total de ambas fases de sueño, prolongando la vigilia de forma anormal, utilizando diferentes procedimientos. Este tipo de intentos empezaron a realizarse en el siglo pasado, así, Manecaine en 1894 (Corsi, 1983) privó de sueño a un grupo de cachorros durante cuatro a cinco días hasta que se murieron. La autopsia de estos animales reveló hemorragias capilares en el cerebro. Otras investigaciones revelaron también cambios degenerativos en el tejido nervioso, especialmente en la corteza prefrontal, luego de privar de sueño a los animales (Legendre y Piéron, 1907). Sin embargo, Kleitman en 1927 no

observó en el cerebro del grupo privado, ningún cambio degenerativo adicional al observado en el grupo control.

Recientemente se han reportado varios métodos para privar de sueño a los animales (ratas o gatos). Entre los cuales podemos mencionar:

1) A través de la inyección intraperitoneal de un inhibidor de la síntesis de la serotonina, la PCPA o paraclorofenilalanina. Induciendo así, un profundo insomnio de larga duración en el gato y en la rata; ya que de acuerdo a la teoría monoaminérgica de Jouvét (1969) las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafé están críticamente involucrados en la inducción del sueño de ondas lentas ó NMOR y en la preparación del sueño MOR. Este modelo de insomnio aunque es ampliamente utilizado en los estudios de sueño, presenta ciertas desventajas como es la de que disminuye los niveles de serotonina presentes en todas las regiones del cerebro además de que altera en mayor o menor grado la síntesis de las catecolaminas.

2) Otro método farmacológico empleado por algunos investigadores para disminuir el tiempo total de sueño MOR es a través de la administración intraperitoneal del cloranfenicol (que es un inhibidor de la síntesis de proteínas). Ya que se ha reportado (Drucker Colin, 1975) que la generación de sueño MOR es dependiente de la síntesis de proteínas.

4) Otro de los métodos ampliamente utilizados en los estudios de sueño es la técnica conocida como del florero invertido, también denominada como la de la plataforma sobre el agua (Jouvét y col., 1964; Vimont Vicary y col., 1966). Esta técnica permite privar

selectivamente a los animales de sueño paradójico y consiste en colocar a los animales sobre una plataforma muy pequeña, del tamaño suficiente para que se puedan mantener parados o con una relajación parcial, pero que no les permite una relajación total; de tal manera que cada vez que se inicia la atonía característica del sueño paradójico el animal cae y se despierta. El agua que los rodea los obliga a subir de nuevo a la plataforma. Entre las ventajas que se pueden mencionar de esta técnica, es que por un lado permite que el animal tenga vigilia y sueño lento, además de que se puede privar a varios animales simultáneamente sin necesidad de observación continua ni de registro de la actividad eléctrica. Sin embargo, este sistema tiene también una serie de desventajas que hacen difícil la interpretación de los resultados, por ejemplo, se ha observado en estudios en los que se han realizado registros poligráficos simultáneos que el sueño lento también sufre una disminución, lo que nos dice que el método no priva selectivamente en forma total de sueño paradójico. Otra de las desventajas de este método, es el estrés que causa a los animales el confinamiento y las caídas constantes al agua, que los mantiene mojados. Una variante de esta misma técnica explorada por Mitler y Levine (1970), con excelentes resultados, consiste en colocar la plataforma sobre un piso electrizado, en lugar de agua. Esta variante sin embargo también produce estrés en los animales.

5) Un sistema diferente consiste en estimular directamente la formación reticular cada vez que el animal entra a sueño MOR (Siegel y Gordon, 1965).

6) Otra técnica es la combinación de una rueda de actividad

locomotora, sumergida parcialmente en el agua. Desgraciadamente este sistema le permite al animal tener lapsos de sueño de 15 a 20 segundos mientras da vuelta la rueda, que sumados pueden alcanzar hasta el 40% del tiempo. Además, se produce simultáneamente privación de sueño lento y de sueño MOR, lo que dificulta la interpretación de los resultados, cuando la intención es privar selectivamente de sueño MOR.

7) Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la lesión de ciertas áreas del cerebro anterior como la región preóptica y el hipotálamo anterior, induce la disminución o la supresión total de ambas fases de sueño dependiendo del grado de lesión. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún trabajo en el cuál utilicen este tipo de animales lesionados en dichas áreas, como modelo de insomnio ó como método de privación de sueño.

De las técnicas mencionadas, las más utilizadas son las del florero invertido y la de la inyección de PCPA.

11. OBJETIVOS

Basándonos en los antecedentes antes mencionados, el objetivo del presente trabajo fué el de evaluar las propiedades hipnogénicas del VIP en un modelo de insomnio no farmacológico, provocado por las lesiones bilaterales de ciertas áreas del cerebro anterior como el hipotálamo anterior y la región preóptica.

III. Métodos y Resultados **(Artículo)**

Vasoactive Intestinal Polypeptide Induces REM Recovery in Insomniac Forebrain Lesioned Cats

*†María T. Pacheco-Cano, *Fernando García-Hernández,
*Oscar Prospéro-García, and *René Drucker-Colín

**Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional de Autónoma de México; †Unidad de Investigación Biomédica Básica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México.*

Summary: Basal forebrain (BF) lesions in cats produces insomnia by reducing both slow wave sleep (SWS) and rapid-eye-movement (REM) sleep time. Recently it has been shown that vasoactive intestinal polypeptide (VIP) may be a specific REM inductor in the parachlorophenylalanine (PCPA) insomniac model. The purpose of this study was to test the hypnogenic properties of VIP in a nonpharmacological model of insomnia. Cats were rendered insomniac by delivering a DC current through stainless steel tripolar electrodes implanted in the basal forebrain area (BFA). Sleep-waking cycle recordings were done prior to lesions and on days 7, 9, 10, 11, 14, and 21 days after BF lesion. On day 10 after the lesion, 200 ng of VIP was injected into the 4th ventricle. Results showed that on postlesion days 7 and 9, SWS and REM sleep total times decreased, while waking time increased significantly. VIP restored REM sleep total time and frequency for almost 48 h, and SWS sleep total time for 24 h. On days 14 and 21 postlesion, insomnia was reestablished. Results are discussed in terms of the possible anatomical and neurochemical substrates whereby VIP can induce the recovery of sleep-waking control values. **Key Words:** Forebrain—Vasoactive intestinal polypeptide—Rapid-eye-movement sleep—Insomnia—Sleep.

It has long been shown that basal forebrain areas (BFAs) are involved in electroencephalogram (EEG) and behavioral sleep mechanisms. In 1918 von Economo (1) when studying patients who suffered encephalitis lethargica postulated the existence of a Sleep Center located in the forebrain. Later, in 1946, Nauta (2) gave additional support for the concept of an active forebrain sleep mechanism. Lesions of these regions resulted in a significant total time reduction in both slow wave sleep (SWS) and rapid-eye-movement (REM) sleep (3). Moreover, recent unit activity studies have shown a

Accepted for publication January 1990.

Address correspondence and reprint requests to Dr. René Drucker-Colín at Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-600, 04510 México, D. F., Mexico.

significantly higher discharge rate of basal forebrain (BF) cells during SWS sleep when compared to REM sleep (4,5).

Recently, the classical concept of humoral control of sleep, postulated by Legendre and Pieron (6,7), has been revived. Many substances obtained from blood (8), cerebrospinal fluid (CSF) (9,10), urine (11), and brain (9,11,12) have shown to have sleep-inducing properties, thus possibly acting as endogenous sleep factors. Since the 1970s peptides have emerged as the best candidates. Among them, gastropancreatic peptides, recently localized in the CNS, are particularly evident in those brainstem regions involved in sleep regulation (13). It is thus possible that these peptides participate in the regulation of sleep parameters. In fact, this has been demonstrated in rats (14) as well as intact (15) and insomniac cats (14). Moreover, we have shown that cholecystokinin (16) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) (17) induced significant REM sleep recovery in parachlorophenylalanine (PCPA) insomniac cats. It has also been shown that the intraventricular application of a VIP-antagonist decreased REM sleep in rats (18).

This study was therefore designed to determine whether the hipnogenic properties of VIP can occur in cats rendered insomniac by (BF) lesions.

METHODS

Experiments were carried out on five cats of either sex weighing between 2.5 and 3.5 kg. Surgery was made under pentobarbital anesthesia (35 mg/kg) under aseptic conditions. All animals were implanted according to the stereotaxic coordinates of Snider and Niemer (19). Screw electrodes were placed over the sensorimotor cortex for EEG recording, and on the external canthus of the eye for electro-oculographic (EOG) recording. Electromyography (EMG) was recorded through stainless steel wires inserted in the neck muscles, and PGO activity was recorded through a tripolar electrode placed in the lateral geniculate body. Additionally, two bilateral tripolar electrodes were directed to the BF area ($A = 14.0$ to 16.0 , $L = 1.0$ to 5.0 , and $H = -4.0$ to -1.0), and a stainless steel guide cannula (21 gauge) was directed into the fourth ventricle. The final position of the cannula was verified by extracting CSF with the aid of a Hamilton syringe. At this point the cannula was fixed with dental acrylic. Animals were allowed to recover for 1 week after surgery before recording. Two days before the first recording session animals were kept inside a cage within a sound-attenuated recording chamber for habituation.

Sleep-waking cycle recordings were taken during 8-h periods (1000 to 1800) with a Grass 79D polygraph. All animals were recorded twice before lesioning and used as their own controls. Electrolytic lesions of the BF were made by applying a DC current through each forebrain tripolar electrode tip. The current was delivered by a Grass S88 stimulator through a constant unit. Lesion parameters used were 3.5 ma/min/tip. Recordings were made on days 7, 9, 10, 11, 14, and 21 after the lesion.

Based on a dose-response curve established previously in our laboratory, we decided to use the dose with maximum potency (200 ng) over total REM sleep time in normal and PCPA insomniac cats. Thus, on day 10 postlesion, a 200 ng/100 μ l solution of VIP was injected into the 4th ventricle through a guide cannula using a Hamilton syringe.

At the end of the experiment all cats were sacrificed intracardially. They were perfused with 0.9% saline solution and 10% buffered formol. The brains were removed sectioned and stained with the Kluver-Barrera method for histological analysis.

Sleep recordings were scored visually according to standard criteria. All data were analyzed on the basis of total time in min of waking and SWS and REM sleep. An analysis of correlated student's *t* test was performed to determine significance, comparing postlesion data with the prelesion values. The criteria used to consider a cat as insomniac was to have had less than 50% with respect to the normal control. For comparative effects, two cats received vehicle injections in the fourth ventricle in the same way as VIP was injected.

RESULTS

Basal forebrain lesions (BFLs) yielded important changes in the sleep-waking cycle in the five animals. From day 7 after BFL, cats were rendered partially insomniac; SWS and REM sleep times showed a significant decrease (SWS: $t = 6.89$, $p < 0.05$; REM: $t = 5.86$, $p < 0.05$), while waking significantly increased ($t = 7.62$, $p < 0.05$). Nine days postlesion, REM sleep occupied less than 50% with respect to the normal control, as seen in Fig. 1. Some individual differences were observed as a result of the lesion. For

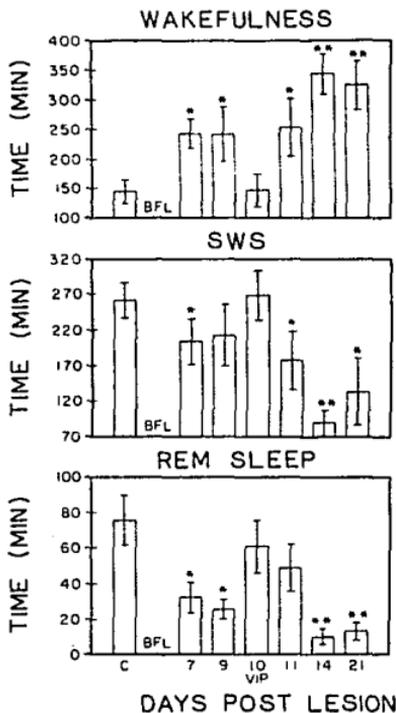


FIG. 1. Histograms of the mean time \pm SEM spent in wakefulness, slow wave sleep (SWS), and rapid-eye-movement (REM) sleep: C = control; 7, 9, 10 [vasoactive intestinal polypeptide (VIP)], 11, 14, and 21 days after basal forebrain lesion (BFL). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control values.

example, recordings of cats showed abortive REMs and not a single complete REM during the 8 h of recordings. This latter state was completely eliminated during at least 1 recording session, 1 on day 7, 2 on day 14, and 1 on day 21.

On this basis VIP or its vehicle were injected on day 10. Our results showed that VIP was able to normalize REM sleep time as well as waking and SWS on this day. However, on day 11 only REM sleep remained similar to control values. No statistical differences were seen since waking and SWS returned to values similar to postlesion days 7 and 9. This means that VIP effects on REM sleep lasted 48 h, while its effects on waking and SWS lasted only 24 h (Fig. 1). Saline solutions did not modify the insomnia produced by forebrain lesions (day 10: Waking [W] = 294.5 min; SWS = 181.4 min; REM = 5.3 min. Day 11: W = 347.3 min; SWS = 126.9 min; REM = 5.8 min). On days 14 and 21 insomnia reappeared. Sleep-waking time values and normal control values were again significantly different ($p < 0.01$). Behaviorally the cats were restless, alternating with long periods of quiet sitting and standing. Only 1 cat presented drinking and feeding behavior deficits, with consequent weight loss requiring special care.

Neither REM sleep duration nor REM latency were significantly modified with the lesion or with the VIP injection. However, BFL and VIP significantly affected REM epoch frequency. BFL significantly reduced REM frequency ($t = 4.35$, $p < 0.05$) from day 7 and more than 50% on days 14 ($t = 4.44$, $p < 0.05$) and 21 ($t = 12.8$, $p < 0.001$). VIP was able to restore REM frequency almost to control amounts in the first 24 h. This effect was observed 48 h later. One day after its application, REM frequency began to show a reducing tendency. The percentage decrease of REM sleep was always greater than the decrease of SWS sleep.

Histological analysis showed that the lesioned areas included part of the Diagonal Band of Broca, the Anterior Commissure, the Preoptic Area, and the Substantia Inominata (Fig. 2).

DISCUSSION

Our results support the idea that the BFA contains neural structures whose integrity is essential for the normal pattern of the sleep-waking cycle, as postulated by McGinty and Sterman (3). The insomnia produced by BFA lesions provides a useful model of studying the effects of postulated sleep factors, in spite of the fact that the underlying mechanisms are not well known.

This study is an attempt to use the BFA lesioned cats as an insomniac model for the study of VIP effects upon the sleep-waking cycle. Our results show that VIP was capable of reverting insomnia by normalizing REM sleep time and REM frequency. These findings are in agreement with the effects produced by VIP in the well known pharmacological model of insomnia using PCPA in rats (13) and cats (13,14). However, in this model VIP appeared to restore waking and SWS sleep time to control on the injection day, but not subsequently. REM sleep, on the other hand, returned to control levels on injection day as well as on the following day. This effect could be expected since VIP was applied to the 4th ventricle close to the brainstem areas involved not only in REM sleep, but also in SWS and waking states. These areas coincide with the sites where VIP has been localized (13).

The increase in waking time in our results could suggest that BFLs may release ascending influences from brainstem areas involved in waking expression. This supports the idea that the forebrain-brainstem integrity is essential for the excitability

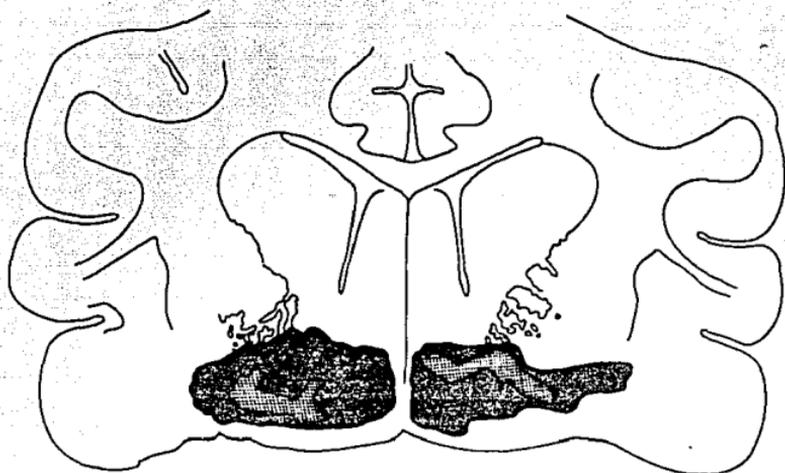


FIG. 2. Diagram of the coronal section of cat's forebrain showing the location of maximum (□) and the minimum (■) lesion areas obtained.

balance of both areas, and that when this balance is disrupted, the function of the nondamaged area predominates (3,20).

This excitability relationship can be modulated by different sensory stimuli (21) and VIP as well, perhaps modifying the excitability of certain brainstem areas to the necessary levels needed to produce REM sleep (22). Since acetylcholine and cholinergic agents can induce REM sleep (23,24) and VIP is able to modulate the muscarinic activity in sympathetic ganglia (25-27), it has been suggested that the cholinergic system could be playing an important role in the VIP hypnogenic effect of the PCPA insomniac rats (14). However, recent studies have shown that simultaneous administration of carbachol into the pontine cells and intracerebroventricular injection of VIP failed to induce REM sleep (28). These results suggest that the REM-enhancing properties of VIP may not involve cholinergic actions (29).

The way in which VIP is capable of eliminating the insomniac effects of BFL in our model could include stimulation of brainstem regions involved in both REM and waking (30-33). Since VIP has a synergistic effect with noradrenaline in the cerebral cortex (34), a noradrenergic-VIP interaction via the locus coeruleus could possibly modify waking and REM time values in our model.

On the other hand, the forebrain and especially the hypothalamus contain high concentrations of VIP (35) and are densely innervated by serotonin positive nerve terminals originating from the raphe nuclei (35). In normal conditions, the relationship of the hypothalamus-raphe nuclei must be important to regulate SWS sleep. It may be reasonable to suggest that in this case VIP may play an important modulatory effect over neurotransmitter receptor sensitivity. After BFA lesions this relationship is broken and VIP modulatory action is lost, causing SWS sleep to decline. VIP administration may

restore its modulatory action including the raphe nuclei to act upon other synchronizing structures, like the thalamus. As a result, we observe a clear transient increase of SWS sleep lasting for the first 24 h after VIP administration. However, the possibility that SWS sleep time recovery is a consequence of the recovery of waking and REM sleep time cannot be ruled out. In sum, it can be suggested that VIP is a powerful modulating influence on the mechanisms serving REM sleep.

Acknowledgment: We thank Dr. Tito Livio García for aid in the care of animals, Mr. Juan Lopez-Magaña for his technical assistance, and Mrs. Maria Teresa Torres for typing this manuscript.

REFERENCES

1. Economo von C. Die Encephalitis Lethargica. Wien: Deuticke, 1918.
2. Nauta WJH. Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J Neurophysiol* 1946;9:285-316.
3. McGinty DJ, Stermán MB. Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science* 1968;60:1253-5.
4. Kaitini KI. Preotic area unit activity during sleep and wakefulness in the cat. *Exp Neurol* 1984;83:347-57.
5. Szymusiak R, McGinty D. Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. *Brain Res* 1986;370:82-92.
6. Legendre R, Pieron H. Le probleme des facteurs du sommeil. Resultats d'injections vasculaires et intracerebrales des liquides insomniacs. *CR Soc Biol (Paris)* 1910;68:1077-8.
7. Legendre R, Pieron H. De la propriete hypnotique des humeurs developpees en course d'une veille prolongee. *CR Soc Biol (Paris)* 1912;72:210-2.
8. Monnier M, Hoshi L. Dyalysis of sleep and waking factors in blood of the rabbit. *Science* 1964;146:796-9.
9. Pappenheimer JR, Kosky G, Fenel V, Karnovsky MI, Krueger J. Extraction of sleep-promoting factor S from cerebrospinal fluid and from brains of sleep-deprived animals. *J Neurophysiol* 1975;38:1299-1311.
10. Sallanon M, Buda C, Janin M, Jouvet M. Restoration of paradoxical sleep by cerebrospinal fluid transfer to PCPA pretreated insomniac cats. *Brain Res* 1982;251:137-47.
11. Krueger JM, Bacsik J, Garcia-Arteras J. Sleep-promoting material from human urine and its relation to factor S from the brain. *Am J Physiol* 1980;238:E116-E123.
12. Inoue S, Uchizono K, Nagasaki H. Endogenous sleep promoting factors. *HINS* 1981;5:218-20.
13. Eiden LE, Nilaver G, Palkovitz M. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat brainstem nuclei. *Brain Res* 1982;231:472-7.
14. Riou F, Cespuglio R, Jouvet M. Endogenous peptides and sleep in the rat. III. The hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide. *Neuropeptides* 1982;2:265-77.
15. Drucker-Colin R, Bernal Pedraza J, Fernández Cancino F, Oksenberg A. Is vasoactive intestinal peptide a sleep factor? *Peptides* 1984;5:837-40.
16. Prospero-García O, Oit T, Drucker-Colin R. Cerebroventricular infusion of cholecystokinin (CCK-8) restores REM sleep in parachlorophenylalanine (PCPA) pretreated cats. *Neurosci Lett* 1987;78:205-10.
17. Prospero-García O, Morales M, Arankowsky-Sandoval G, Drucker-Colin R. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and cerebral cerebrospinal fluid (CSF) of sleep deprived cats restores REM sleep in insomniac recipients. *Brain Res* 1986;385:169-73.
18. Mirmiran M, Krusbrink J, Box NPA, Van der Werf D, Boer GJ. Decrease of rapid eye movement sleep in the light by intracerebral application of a VIP-antagonist in the rat. *Brain Res* 1988;458:192-4.
19. Snider RW, Niemer WT. A stereotaxic atlas of the brainstem of the cat. II. Chicago: University of Chicago Press, 1964.
20. Bremer F. The neurophysiological problem of sleep. In: Delafresnaye JF, ed. *Brain mechanisms and consciousness*. Oxford: Blackwell, 1954:137-8.
21. Arankowsky-Sandoval G, Aguilar-Roblero R, Prospero-García O, Drucker-Colin R. Rapid eye movement (REM) sleep and ponto-geniculo-occipital (PGO) spike density are increased by somatic stimulation. *Brain Res* 1987;400:155-8.
22. McGinty DJ, Drucker-Colin RR. Sleep mechanisms, biology and control of REM sleep. *Int Rev Neurobiol* 1982;23:391-435.
23. Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo MI, McCarty RW, Hobson A. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res* 1984;306:39-52.
24. Hernández-Peón R. Sleep induced by localized electrical or chemical stimulation of the forebrain. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol [Suppl]* 1963;24:188-98.
25. Kawatani M, Rutigliano M, de Grant WC. Selective facilitation effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on muscarinic firing in vesical ganglia of the cat. *Brain Res* 1985;366:223-34.

26. Lundberg JM, Hokfelt T, Schultzberg M. Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence for combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. *Neurosci* 1979;4:1539-59.
27. Mo N, Dun NJ. Vasoactive intestinal polypeptide facilitates muscarinic transmission in mammalian sympathetic ganglia. *Neurosci Lett* 1984;52:19-21.
28. Drucker-Colin R, Prospero-García O. Microinjection of carbachol into the pontine area is unable to modify insomnia induced by p-chlorophenylalanine (PCPA). *Brain Res* 1988;426:163-6.
29. Drucker-Colin R, Prospero-García O, Pérez-Montfort R, Pacheco MT. Vasoactive Intestinal Polypeptide: a possible REM sleep factor. *Ann NY Acad Sci* 1988;527:627-9.
30. Aston-Jones G, Bloom FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1981;1:876-86.
31. Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brain stem neuronal groups. *Science* 1975;189:55-8.
32. Jones BE. The respective involvement of noradrenaline and its metabolites in waking and paradoxical sleep: a neuropharmacological model. *Brain Res* 1972;39:121-36.
33. Steriade M, Hobson JA. Neuronal activity during the sleep-waking cycle. *Prog Neurobiol* 1976;6:155-379.
34. Schaad NC, Schorderet M, Magistretti PJ. Prostaglandins and the synergism between VIP and noradrenaline in the cerebral cortex. *Nature* 1987;328:637-40.
35. Rostene WH. Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP). *Prog Neurobiol* 1984;22:103-29.

IV. DISCUSION

Dada la constancia de su fenomenología, es posible estudiar al sueño en especies inferiores al hombre, como el gato y la rata. Así, se han descrito en estas especies diferentes modelos de insomnio, los cuales han sido producidos 1) a través de la manipulación farmacológica de los diferentes neurotransmisores que participan en las diferentes etapas del ciclo vigilia-sueño; 2) lesionando por métodos químicos ó electrolíticos las vías que participan en su regulación, 3) ó bien colocando a los animales en determinadas situaciones físicas que les impida dormir (método del florero invertido). Todos estos modelos ofrecen obviamente ventajas y desventajas con respecto el uno del otro. En el presente trabajo utilizamos por primera vez, animales lesionados en el cerebro anterior basal (región preóptica e hipotálamo anterior) como modelo de insomnio para evaluar las propiedades hipnagógicas del VIP, así como de cualquier otra sustancia.

Dicho modelo descrito ya con anterioridad por Mc Ginty y Sterman en 1968, nos pareció adecuado para estudiar las propiedades hipnagógicas del VIP en el sueño MOR ya que la lesión altera principalmente aquellas áreas del cerebro que participan en el sueño de ondas lentas, siendo la reducción del sueño MOR consecuencia de la reducción del sueño NMOR. Es decir que dichas lesiones nos dejarían intactas las estructuras del tallo cerebral que están involucradas en la regulación del sueño MOR, lo que nos permitiría probar directamente al VIP, a través de su aplicación en el 4o. ventrículo adyacente a todas las estructuras del tallo cerebral involucradas en la regulación del

sueño MOR. Aunque en la actualidad existen sustancias neurotóxicas como el ácido kainico, que permite hacer lesiones mucho más específicas y más localizadas de los cuerpos neuronales sin dañar las vías de paso, en este trabajo decidimos realizar en primera instancia (aunque ofrezca ciertas desventajas, como inespecificidad) las lesiones electrolíticas, ya que el modelo original fué descrito utilizando éste tipo de lesiones.

Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que el cerebro anterior basal contiene estructuras cuya integridad es esencial para el patrón normal del ciclo vigilia-sueño. A pesar de ésto, hasta la fecha no se conocen los mecanismos que subyacen al insomnio producido luego de ser lesionadas estas áreas, sin embargo, existen algunas evidencias e ideas que tratan de explicar este fenómeno. Así, en sus estudios electrofisiológicos, Bremer en 1970 encuentra que existe una interacción tónica inhibitoria mutua entre la región preóptica del cerebro anterior y la formación reticular mesencefálica. Serman y Clemente por su parte en 1970, sugieren que el sueño inducido en animales despiertos por la estimulación eléctrica del cerebro anterior basal, es consecuencia del antagonismo funcional entre el sistema reticular activador ascendente involucrado en la vigilia (formación reticular mesencefálica) y el cerebro anterior basal involucrado en el sueño de ondas lentas. Por otro lado Drucker Colin y cols. (1976), demostraron en sus estudios que las lesiones de estas áreas no sólo fragmentan y disminuyen la cantidad de sueño, sino que también interrumpen completamente la liberación cíclica de las proteínas obtenidas de la formación reticular mesencefálica de gatos en libre movimiento. Existen

además evidencias anatómicas recientes (Dinopoulos, A. y cols. 1989; (Divac, I., 1975) que apoyan la interrelación entre las áreas del cerebro anterior basal y las del tallo cerebral que han sido involucradas en la regulación sueño-vigilia. Estos hechos van en contra de la clásica idea de un centro regulador del sueño, lo que nos da una idea de la increíble complejidad de la neuroanatomía y de la neurofisiología del sueño.

Tomando en cuenta estas evidencias sugerimos dos mecanismos a través de los cuales podrían estar afectando estas lesiones al ciclo sueño-vigilia: 1) La destrucción de estas áreas del cerebro anterior involucradas en el sueño lento libera a las neuronas del sistema reticular activador ascendente (formación reticular mesencefálica), lo que se manifiesta como un aumento en la cantidad de vigilia. Durante este estado de vigilancia como se mencionó en la introducción, las neuronas de los núcleos del rafe y del locus coeruleus se encuentran muy activas inhibiendo las células del FTG y por lo tanto impiden que se dispare el sueño MOR y 2) Puesto que se ha sugerido que ciertas macromoléculas como las proteínas pueden participar en los mecanismos que regulan que se dispare el sueño MOR (Drucker Colin, R., y cols. 1980), es probable que la disminución en los niveles de dichas proteínas (causado por la lesión del hipotálamo anterior y de la región próptica) no permita que se alcance el nivel de excitabilidad neuronal necesario para que se dispare el sueño MOR.

En este trabajo confirmamos las propiedades hipnogénicas del VIP, determinadas anteriormente en otros modelos y en otras

especies. Así, el VIP restableció casi por 48 horas los tiempos totales de sueño MOR. Sin embargo, también observamos que restableció la vigilia y el sueño lento por 24 horas. La interpretación de estos resultados es muy difícil, si consideramos como ya se mencionó anteriormente la complejidad en la neuroanatomía, la neurofisiología y la neuroquímica del sueño y especialmente cuando se conoce tan poco acerca del papel de las peptidasas en la regulación de la actividad de los neuropéptidos a nivel de las sinapsis. Se ha demostrado, por otro lado, que por la acción de exopeptidasas, endopeptidasas ó aminopeptidasas sobre los neuropéptidos se pueden generar nuevas especies de péptidos biológicamente activos. Por lo tanto queda la posibilidad de que los efectos observados sean debidos a la formación de metabolitos biológicamente activos. A este respecto Bodanszky en 1973 reportó que la actividad biológica de los fragmentos sintéticos del VIP, es dependiente de la longitud de la cadena, es decir a mayor longitud mayor actividad. Sin embargo Fournier en 1984, encontró en sus estudios in vivo sobre la presión sanguínea e in vitro en tejido cardiaco, que el único fragmento de VIP que conservó actividad biológica, fué el correspondiente a la cadena 2 - 28. Este resultado sugirió que la histidina, no es esencial para la activación del receptor, sino que más bien juega un papel importante para la afinidad. Por otro lado, se ha propuesto que las monoaminas y los neuropéptidos funcionan principalmente de una manera lenta y prolongada modificando la excitabilidad de grupos neuronales, provocando frecuentemente cambios metabólicos sostenidos en las células blanco (Iversen, L., 1986).

Partiendo de los antecedentes antes expuestos, sugerimos tres mecanismos a través de los cuáles el VIP puede estar ejerciendo sus propiedades hipnogénicas en este modelo:

1. Basándonos en las observaciones de Drucker Colin y cols. de que las lesiones en el cerebro anterior disminuyen los niveles de proteínas necesarios para que se alcance un nivel de excitabilidad en las neuronas involucradas en la regulación del sueño MOR. Sugerimos que el VIP podría ser uno de los péptidos involucrados en modular dicho grado de excitabilidad, por lo que su administración exógena por vía ICV en los animales lesionados, permitiría que se alcanzase nuevamente el nivel de excitabilidad necesario para que se dispare el sueño MOR.

2. Dada la coexistencia y el sinergismo entre el VIP y la noradrenalina en la corteza y apoyándonos en el modelo de interacción reciproca de Hobson y McCarley (1975), sugerimos que el VIP podría estar regulando el grado de excitabilidad de las neuronas del locus coeruleus (la cuál se encontraba aumentada luego de la lesión), inhibiendo el disparo de estas neuronas, de tal forma que este decremento conduce a que se desinhiban las células del FTG, disparándose de esta forma el sueño MOR. Esta idea se ve apoyada por el trabajo de Martin y cols. en 1987, en el cual observaron que el locus coeruleus posee una de las densidades más altas de de sitios de unión para el VIP. Además, en estudios en los que se han realizado registros extracelulares, se ha demostrado que el VIP puede alterar (aumentar ó disminuir) la frecuencia de disparo de las neuronas de la corteza cerebral (Ferron y cols., 1985), el hipotálamo (Haskins y cols., 1982), el

mesencéfalo (Phillis y cols., 1978) y el locus coeruleus (Wang y Aghajanian, 1989).

3. Y por último basándonos en las ideas de Bárbara Jones, (1972), en la presencia de los receptores al VIP en el tallo cerebral (Martín y cols., 1987) y en la acción del VIP en las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus y de la corteza cerebral (Wang y Aghajanian, 1989; Ferron y cols., 1985), sugerimos que el VIP estaría actuando en las poblaciones noradrenérgicas de la formación reticular mesencefálica involucradas en la vigilia y en las del locus coeruleus involucradas en la regulación del sueño MOR, por lo que observamos una recuperación del ciclo sueño-vigilia. Siendo la recuperación del sueño NMOR, consecuencia del restablecimiento de la fase de sueño MOR y de la vigilia. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la recuperación de esta fase de sueño NMOR sea a través de mecanismos serotoninérgicos, como lo postuló Jouvet en 1984.

Para la corroboración ó eliminación de las hipótesis mencionadas será necesario estudiar el grado de excitabilidad de las neuronas noradrenérgicas del núcleo locus coeruleus, de la formación reticular mesencefálica y del rafe dorsal, a través del registros de la actividad unitaria de dichas neuronas durante el ciclo vigilia - sueño, en las siguientes condiciones:

- 1) en gatos normales
- 2) en gatos insomnes lesionados en el cerebro anterior (hipotálamo anterior, región preóptica, etc.)

- 3) en los mismos gatos insomnes, después de inyectar el VIP en el 4o. ventriculo
- 4) en los mismos gatos insomnes pero aplicando el VIP "in situ", es decir en las regiones del tallo cerebral antes mencionadas y en el FTG
- 5) Verificando los sitios de registro y de aplicación del VIP, a través de técnicas histológicas y de inmunocitoquímica.

V. CONCLUSIONES

Del presente trabajo podemos concluir que:

1.- Ciertas áreas del cerebro anterior, como el hipotálamo anterior, la región preóptica, la banda diagonal de Broca, la substancia inominada y la comisura anterior, forman parte muy importante de un circuito neuronal involucrado en la regulación de las dos fases de sueño.

2.- La lesión de estas áreas cerebrales nos ofrece por lo tanto, un buen modelo para estudiar las propiedades hipnogénicas de ciertos péptidos como el VIP, ya que elimina factores como el estrés y efectos farmacológicos colaterales que hacen desventajosos a otros modelos.

3.- EL VIP es una potente influencia reguladora de los mecanismos del sueño MOR, en este modelo.

VI. Referencias

- Amatruda, T.T., Black, D.A., McKenna, T.M., McCarley, R.W., Hobson, J.A. Sleep cycle control and cholinergic mechanisms: Differential effects of carbachol at pontine brainstem sites. *Brain Res.* 98: 501-515, 1975.
- Aserinsky, E. and Kleitman, N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-274, 1953.
- Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W., Hobson, J.A. Site specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res.* 306: 39-52, 1984.
- Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res.* 414: 245-261, 1987.
- Baxter, B.L. Induction of both emotional behavior and a novel form of REM sleep by chemical stimulation applied to cat mesencephalon. *Exp. Neurol.* 23: 220-230, 1969.
- Berger, H. *Das Elektroencephalogramm des menschen.* Acta Nova Leopold: 173, 1938.
- Besson, J., Rotsztejn, W., Laburthe, M., Epelbaum, J., Beaudet, A., Kordon, C., Rosselin, G. Vasoactive intestinal peptide (VIP): brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in male rats. *Brain Res.* 165: 79-85, 1979.

- Besson, J., Sarrieu, A., Vial, M., Marie, J.C., Rosselin, G., Rostene, W. Characterization and Autoradiographic Distribution of Vasoactive Intestinal Peptide Binding Sites in the rat Central Nervous System. Brain Res. 398: 329-336, 1986.
- Bodanszky, M., Klausner, Y., Said, S. Biological Activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasoactive intestinal peptide. Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 382-384, 1973.
- Bremer, F. Cerveau "isolé" et physiologie dur sommeil. C.R. Soc. Biol. 118: 1235-1241, 1935.
- Bremer, F. L'activité cérébrale au cours dur sommeil et de la narcose: contribution à l'étude du mécanisme du sommeil. Bull. Acad. R. med. Belg. 4: 68-86, 1937.
- Cespuglio, R., Gómez, M., Walker, E. and Jouvet, M. Effets du refroidissement et de la stimulation des noyaux du système du raphe sur les états de vigilance chez le chat. Electroencephalogr. clin. neurophysiol. 47: 289-308, 1979.
- Cordeau, J.P., Moreau, A., Beaulnes, A., Laurin, C. EEG and behavioral changes following microinjection of acetylcholine in the brainstem of cats. Arch. Ital. Biol. 101: 30-47, 1963.
- Chastrette, N., Cespuglio, R. Influence of proopiomelanocortin deprived peptides on the sleep-wake cycle of the rat. Neurosci. Lett. 62: 365-370, 1985.
- Corsi Cabrera, M. Efectos de la privación del sueño. En: Psicofisiología del sueño. María Corsi Cabrera Editor.

Trillas, México. 243-280, 1983.

- Danguir, J. Intracerebroventricular infusion of somatostatin selectively increase paradoxical sleep in rats. Brain Res. 367: 26-30, 1986.
- Delashaw, J.B., Foutz, A.S., Guilleminault, C., Dement, W.C. Cholinergic mechanisms and cataplexi in dogs. Exp. Neurol. 66: 745-757, 1979.
- Delorme, F., Froment, J.L., Jouvét, M. Suppression du sommeil par la p-chlorométhamphetamine et p-chlorophénylalanine. CC Soc. Biol. 160: 2347-2351, 1966.
- Dempsey, E.W. and Morison, R.S. The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. Am. J. Physiol. 135: 293-300, 1942.
- Dempsey, E.W. and Morison, R.S. The electrical activity of a thalamocortical relay system. Am. J. Physiol. 138: 283-296, 1943.
- Dinopoulos, A., Papadopoulos, C., Parnavelas, J.G., Antonopoulos, J., Karamanlidis, A.N. Basal forebrain projections to the lower Brainstem in the rat. Exp. Neurol. 105: 316-319, 1989.
- Drucker Colin, R.R., Spanis, C.W., Cotman, C.W., Mc Gaugh, J.L. Changes in protein levels in perfusates of freely moving cats: Relation to behavioral state. Science 187: 963-965, 1975.
- Drucker Colin, R.R., Spanis, C.W., Hunyadi, J., Sassin, J.F., McGaugh, J.L. Growth hormone effects on sleep and wakefulness in the rat. Neuroendocrinol. 18: 1-8, 1975.
- Drucker Colin, R.R., Spanis, C.W. Neurohumoral correlates of

sleep: increase of proteins during rapid eye movement sleep.
Experientia 3: 551-552, 1975.

- Drucker Colin, R.R., Gutiérrez, M.C. Effects of forebrain lesions on release of proteins from the midbrain reticular formation during the sleep-wake cycle. *Expl. Neurol.* 52: 339-344, 1976.
- Drucker Colin, R.R., Zamora, J., Bernal Pedraza, J., Sosa, B. Modifications of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors. *Exp. Neurol.* 63: 468-477, 1979.
- Drucker Colin, R.R., Gutiérrez, M.C., Bernal Pedraza, J. G. Polypeptide regulation of REM sleep. *Front. Horm. Res.* Vol.6: 138-155, 1980.
- Drucker-Colín, R.R., Bernal-Pedraza, J. Kainic acid lesions of gigantocellular tegmental field (FTG) does not abolish REM sleep. *Brain Res.* 272: 387-391, 1983.
- Drucker Colin, R.R., Bernal Pedraza, F., Fernández Cancino, F., Oksenberg, A. Is vasoactive intestinal polypeptide (VIP) a sleep factor? *Peptides* 5: 837-840, 1984.
- Drucker-Colín, R., Aguilar-Roblero, R., Arankowsky-Sandoval, G. Reevaluation of the hypnogenic factor notion. *En: Sleep: Neurotransmitters and neuromodulators.* Wauquier, A., Radulovacki, H., Monti, J., Gaillard, J. (Eds.) Raven Press, N.Y., USA, 1985.
- Dubois, R. Le centre du sommeil. *C. R. Soc. Biol.* 53: 229-230, 1901.
- Eiden, L.E., Nilaver, G., Palkovitz, M. Distribution of

- vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat brainstem nuclei. *Brain Res.* 231: 472-477, 1982.
- Emson, P.C., Fahrenkrug, J. Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Jessell, T.M., Iversen, L.L. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): vesicular localization and potassium evoked release from rat hypothalamus. *Brain Res.* 143: 174-178, 1978.
 - Ferron, A., Siggins, G.R., Bloom, F.E. Vasoactive intestinal polypeptide acts synergistically with norepinephrine to depress spontaneous discharge rate in cerebral cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8810-8812, 1985.
 - Fournier, A., Saunders, J.K., St-Pierre, S. Synthesis, conformational studies and biological activities of VIP and related fragments. *Peptides*, 5: 169-177, 1984.
 - García-Arrarás, J.E. Effects of sleep-promoting factor from human urine on sleep cycle of cats. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 241: E269-E274, 1981.
 - George, R., Haslett, W.L., Jenden, D.J. A cholinergic mechanism in the brain stem reticular formation: induction of paradoxical sleep. *Int. J. Neuropharmacol.* 3: 541-552, 1964.
 - Giachetti, A., Said, S., Reynolds, R.C., Koniges, F.C. Vasoactive intestinal polypeptide in brain: Localization in and release from isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3424-3428, 1977.
 - Hartley, D. Observations on man, his frame, his duty and his expectations. London, Leake and Frederick, 1749.

- Haskins, J.T., Samson, W.K., Moss, R.L. Evidence for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) altering the firing rate of preoptic, septal and midbrain central grey neurons. Regul. Pept. 3: 113-123, 1982.
- Hernández-Peón, R., Chávez-Ibarra, P., Morgane, P., Timolaria, C. Limbic cholinergic pathways involved in sleep and emotional behavior. Exp. Neurol. 8: 93-111, 1963.
- Hernández-Peón, R. A cholinergic limbic-forebrain-hindbrain hypnogenic circuit. EEG Clin. Neurophysiol. 17: 444-445, 1964.
- Hess, W.R. Das Schlafsyndrom als folge Dienzephaler Riezung. Helv. Physiol. Acta 2: 305-344, 1944b.
- Hess, W.R. Der Schlaf. Klin. Wochenschr. 12: 129-134, 1933.
- Hess, W.R. Hypothalamische Adynamie. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 2: 137-147, 1944.
- Hobson, J.A., McCarley, R.W., Pivik, R.T., Freedman, R. Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. J. Neurophysiol. 37: 497-511, 1974a.
- Hobson, J.A., McCarley, R.W., Freedman, R., Pivik, R.T. Time course of discharge rate changes by eat pontine brain stem neurons during sleep cycle. J. Neurophysiol. 37: 1297-1309, 1974b.
- Hobson, J.A., Goldberg, M., Vivaldi, E., Riew, D. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjections of the muscarinic agonist bethanichol. Brain Res. 275: 127-136, 1983.
- Hobson, J.A., McCarby, R.W., Wyzinski, P.W. Sleep cycle

- oscillation: Reciprocal discharge by two brain stem neuronal groups. *Science* 189: 55-58, 1975.
- Iversen, L.L. Chemical signaling in the nervous system. In: T. Hokfelt, K. Fuxe and B. Pernow (Eds.) Coexistence of neuronal messengers: A new principle in chemical transmission. *Progress in Brain Research*, Vol.68, Elsevier, Amsterdam, pp 15-21, 1986.
 - Jones, B.E., Harper, S.T. and Halaris, A. Effects of locus Coeruleus lesions upon cerebral monoamine content, sleep-wakefulness states and the response to amphetamine in the cat. *Brain Res.* 124: 473-496, 1977.
 - Jones, B.E. The respective involvement of noradrenaline and its metabolites in waking and paradoxical sleep: a neuropharmacological model. *Brain Res.* 39: 121-36, 1972.
 - Jouvét, M. Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch. Ital. Biol.* 100: 125-206, 1962.
 - Jouvét, D., Vimont, P., Delorme, F., Jouvét, M. Etude de la privation sélective de la phase paradoxal de sommeil chez la chat. *C.R. Soc. Biol.* 158: 756, 1964.
 - Jouvét, M. The states of sleep. *Sci. Am.* 216: 67-72, 1967.
 - Jouvét, M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163: 32-41, 1969a.
 - Jouvét, M. Neuromédiateurs et Facteurs Hypnogènes. *Rev. Neurol (Paris)* 140: 389-400, 1984.
 - Kawatami, M., Rutigliano, M., de Grant, W.C. Selective facilitation effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on muscarinic firing in vesical ganglia of the cat.

Brain Res. 366: 223-234, 1985.

- Kitahama, K., Valatx, J.L. Effet du chloramphenicol et du thiamphenicol sur le sommeil de la souris. Comptes rendies Soc. Biol. (Paris) 169: 1522-1525, 1975.
- Kaitin, K. Preoptic area unit activity during sleep and wakefulness in the cat. Exp. Neurol. 83: 347-357, 1984.
- Kaji, H., Chihara, K., Minamitani, N., Kodama, H., Yanaihara, N., Fujita, T. Release of vasoactive intestinal polypeptide into the cerebrospinal fluid of the fourth ventricle of the rat: involvement of cholinergic mechanism. Brain Res. 269: 303-310, 1983.
- Kleitman, N. Studies on the physiology of sleep. V: Some experiments in pupies. Am. J. Physiol., 84: 386-395, 1927.
- Krueger, J.M., Baccik, J., Garcia-Arraras, J. Sleep-promoting material from human urine and its relation to factor S from the brain. Am. J. Physiol. (Endocrinol Metab.) 238: E116-E123, 1980.
- Krueger, J.M., Rosenthal, R.S., Martin, S.A., Walter, J., Davenne, D., Shoham, S., Kubillus, S.L., Beemann, K. Bacterial peptidoglycans as modulators of sleep I. Anhydro forms of muramyl peptides enhance somnogenes potency. Brain Res. 403: 249-257, 1987.
- Krueger, J.M., Davenne, D., Walter, J., Shoham, S., Kubillus, S.L., Rosenthal, R.S., Martin, S.A., Biemann, K. Bacterial peptidoglycans as modulators of sleep II. Effects of muramyl peptides on the structure of rabbit sleep. Brain Res. 403: 258-266, 1987.

- Laguzzi, R., Petetjian, F., Piyol, J., Jouvét, M. Effets de l'injection intraventriculaire du 6-hydroxydopamine II. Sur le cycle veille-sommeil du chat. *Brain Res.* 48: 295-310, 1972.
- Legendre, R., Pieron, H. Les rapports entre les conditions physiologiques et les modifications histologiques des cellules cérébrales dans le sommeil expérimentale. *C. R. Soc. Biol.* 62: 312-314, 1907a.
- Legendre, R., Pieron, H. Le problème des facteurs du sommeil. Résultats d'injections vasculaires et intracérébrales des liquides insomniaques. *CR Soc. Biol. (Paris)* 68: 1077-8, 1910.
- Loomis, A.L., Harvey, E.N., Hobart, G.A. Cerebral states during sleep, as studied by human brain potentials. *J. Exp. Psychol.* 21: 127-144, 1937.
- Lundberg, J.M., Hokfelt, T., Schultzberg, M. Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence for combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. *Neurosci.* 4: 1539-1555, 1979.
- Macnish, R. *The Philosophy of Sleep.* Glasgow, E.M. Phun, 1830.
- Martin, J.L., Dietl, M.M., Hof, P.R., Palacios, J.M., Magistretti, P.J. Autoradiographic mapping of [mono [123I] iodo-tyr10, Met017] vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat brain. *Neuroscience* 23: 539-565, 1987.
- Masserano, J.M. and King, C. Effects on sleep of

- acetylcholine perfusion of the locus coeruleus of cats. *Neuropharmacology* 21: 1163-1167, 1982.
- Mauthner, L. Zur Pathologie und Physiologie des Schlafes, nebst Bemerkungen uber die "nona" Wien *Med. Wochenschr.* 40: 961-1188, 1890.
 - McCarley, R.W., Hobson, J.A. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: A structural and mathematical model. *Science* 189: 58-60, 1975.
 - McGinty, D.J., Sterman, M.B. Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science* 160: 1253-1255, 1968.
 - McGinty, D.J., Drucker-Colin, R. Sleep mechanisms: Biology and control of REM sleep. *Intern. Rev. Neurobiology* 23: 391-436, 1982.
 - McGinty, D.J. Neurochemically defined neurons: behavioral correlates of unit activity of serotonin-containing cells. En: *Brain Unit Activity during Behavior*, pp. 244-267. M.I. Phillips (ed.) Thomas Springfield, 1974.
 - McKelvy, J.F. Inactivation and Metabolism of Neuropeptides. *Ann. Rev. Neurosci.* 9: 415-434, 1986.
 - McKenna, T., McCarley, R.W., Amatruda, T., Black, D., Hobson, J.A. Effects of carbachol at pontine sites yielding long duration desynchronized sleep episodes. En: *Sleep Research* 3: 39. M.H. Chase., W.C. Stern and P.L. Watler (eds.) BIS/BRI, Los Angeles.
 - Mitani, A., Ito, K., Hallenger, E.A., Wainer, B.H., Kataoaka, K. and McCarley, R.W. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

the the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. Brain Research 451: 397-402, 1988.

- Mitler, M.M., Levine, R. Sleep analysis and a simple technique for selective deprivation of low voltage fast wave sleep in a species of deermouse, P.M. Bairdi. Psychophysiol 7: 112-120, 1970.
- Mitler, M.M., Dement, W.C. Cataplastic-like behavior in cats after microinjections of carbachol in pontine reticular formation. Brain Res. 68: 335-343, 1974.
- Michel, F., Klein, M., Valatx, J.J., Jouvet, M. Etude polygraphique du sommeil chez le rat. Compt. Rend. Soc. Biol. 55: 2389-2392, 1961.
- Mo N., Dun, N.J. Vasoactive intestinal polypeptide facilitates muscarinic transmission in mammalian sympathetic ganglia. Neurosci. Lett. 52: 19-21, 1984.
- Monnier, M., Koller, T.H. and Graber, S. Humoral influences of induced sleep and arousal upon electrical brain activity of animals with crossed circulation. Exp. Neurol. 8: 264-277, 1963.
- Moruzzi, G., Mogoun, H.W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. EEG Clin. Neurophysiol. 1: 455-473, 1949.
- Mouret, J.R., Bobillier, P., Jouvet, M. Insomnia following parachlorophenyl alanine in the rat. Eur. J. Pharmacol. 5: 17-22, 1968.
- Nauta, W.J.B. Hypothalamic regulation of sleep in rats: An experimental study. J. Neurophysiol. 9: 285-316, 1946.
- Obál, F., Sary, G., Alfaldi, P., Rubissek, G. and Obál, F.

Vasoactive intestinal polypeptide promotes sleep without effects on brain temperature in rats at night. *Neurosci. Lett.* 64: 236-240, 1986.

- Oswald, I. Human brain protein, drugs and dreams-nature (Lond.) 223: 893-897, 1969.
- Pappenheimer, J.R., Miller, T.B., Goodrich, C.A. Sleep promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep deprived goats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 513-517, 1967.
- Pappenheimer, J.R. The Sleep factor. *Sci. Am.* 235: 24-29, 1976.
- Pegram, V., Hammond, D., Bridgers, W. The effects of protein synthesis inhibition on sleep in mice. *Behav. Biol.* 9: 377-382, 1973.
- Petitjean, F., Buda, C., Jenin, M., David, M., Jouvet, M. Effects du chloramphenicol sur le sommeil du chat. Comparaison avec le thiamphenicol l'erythromicine et l'oxitetracycline. *Psychopharmacology* 66: 147-152, 1979.
- Phillis, J.W., Kirkpatrick, J.R., Said, S.I. Vasoactive intestinal polypeptide excitation of central neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56: 337-340, 1978.
- Prospero Garcia, O., Morales, M., Arankowsky Sandoval, G., Drucker Colin, R. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and cerebrospinal fluid (CSF) of sleep deprived cats restores REM sleep in insomniac recipients, *Brain Res.* 385: 169-173, 1986.
- Prospero Garcia, O., Ott, T., Drucker Colin, R. Cerebroventricular infusion of cholecystokinin (CCK-8)

- restores REM sleep in parachlorophenylalanine (PCPA) pretreated cats. *Neurosci. Lett.* 78: 205-210.
- Quattrochi, J.J., Mamelak, A.N., Madison, R.D. Macklis, J.D. and Hobson, J.A. Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorescent microspheres. *Science* 245: 984-986, 1989.
 - Ranson, S.W. Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Arch. Neurol. Psychiat.* 41: 1-23, 1939.
 - Riou, F., Cespuglio, R., Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat. 111 The hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide. *Neuropeptides* 2: 255-264, 1982.
 - Rojas-Ramírez, J.A., Aguilar-Jiménez, E., Posadas-Andrews, A., Bernal-Pedraza, J., Drucker-Colín, R.R. The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep-wake cycle of rats. *Psychopharmacol.* 53: 147-150, 1977.
 - Rostene, W.H. Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Progr. Neurobiol.* 22: 103- 129, 1984.
 - Said, S.I. and Mutt, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169: 1217-1218, 1970.
 - Schaad, N.C., Schorderet, M., Magistretti, P.J. Prostaglandins and the synergism between VIP and noradrenaline in the cerebral cortex. *Nature* 6131: 637-640, 1987.
 - Schnedorf, J.G., Ivy, A.C. An examination of the hypnotoxin theory of sleep. *Amer. J. Physiol.* 125: 491-505, 1939.

- Schoenenberger, G.A., Monnier, M. Characterization of a delta-electroencephalogram (-sleep)-inducing peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 1282-1286, 1977.
- Shiromani, P., Armstrong, D.M. and Gillin, J.C. Cholinergic neurons from the dorso lateral pons project to the medial pons: AWGA-HRP and choline acetyltransferase immunohistochemical study. Neurosci. Lett., 95: 19-23, 1988.
- Shiromani, P., Armstrong, D.M., Burkowitz, A., Jeste, D.V. and Gillin, J.C. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive somata in the feline brainstem: implications for REM sleep generation. Sleep 11: 1-16, 1988.
- Siegel, J., Gordon, T.P. Paradoxical sleep deprivation in the cat. Science 148: 978-980, 1965.
- Siegel, J.M. Ponto-Medullary interactions in the generation of REM sleep. En: Brain Mechanisms of Sleep. D.J. McGinty et al (Eds.) Raven Press, New York, USA, 1985.
- Steriade, M., Hobson, J.A. Neuronal activity during the sleep-waking cycle. Progr. Neurobiology 6: 155-376, 1976.
- Serman, M.B. and Clemente, C.D. Forebrain inhibitory mechanisms: Cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. Exp. Neurol. 6: 91-102, 1962.
- Serman, M.B., Knauss, T., Lehman, D. and Clemente, C.D. Circadian sleep and waking pattern in the laboratory cat. EEG Clin. Neurophysiol. 19: 509-517, 1965.
- Stern, W.C., Jalowics, E., Shabshalowitz, H., Morgane, P.J. Effects of growth hormone on sleep-waking patterns in cats. Horm. Behav. 6: 189-196, 1975.

- Szymusiak, R., McGinty, D.J. Sleep suppression following kainic acid-induced lesions of the basal forebrain. *Exp. Neurol.* 94: 598-614, 1986.
- Szymusiak, R., McGinty, D. Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. *Brain Res.* 370: 182-92, 1986.
- Takeuchi, E. Polygraphic study of the wakefulness sleep-cycle of the rat. *Jap. J. Psychol.* 41: 248-252, 1970.
- Velazquez-Moctezuma, J., Gillin, J.Ch., Shiromani, P.J. Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res.* 503: 128-131, 1989.
- Velázquez-Moctezuma, J., Shalauta, M.D., Gillin, J.Ch., Shiromani, P.J. Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicits REM sleep. *Neurosci. Lett.* (en prensa) 1990.
- Vertes, R.P. Selective firing of rat pontine gigantocellular neurons during movements and REM sleep. *Brain Res.* 128: 146-152, 1977.
- Vimont-Vicary, P., Jouvét Mounnier, D., Delorme, F. Effets EEG et comportementaux des privation de sommeil paradoxal chez le chat. *EEG Clin. Neurophysiol.* 20: 439-449, 1966.
- Vivaldi, E., McCarley, R.W., Hobson, A. Evocation of desynchronized sleep signs by chemical microstimulation of the pontine brain stem. In: *The Reticular Formation Revisited.* J.A. Hobson and M.A.B. Brazier (eds.) Raven Press, New York, 1980.
- Vogel, G.W., Minter, K., Woolivene, B. Effects of

- chronically administered antidepressant drugs on animal behavior. *Physiol. Behav.* 36: 659-666, 1986.
- Von Economo, C., Grippe enzyshalitis und enzephalitis lethargica. *Winn Clin. Wochenschr* 32: 393-396, 1919.
 - Von Economo, C. *Die Encephalitis Lethargica, Deutische, Vienna, 1918.*
 - Von Economo, C. Sleep as a problem of localization. *J. Nerv. Ment. Dis.* 71: 249-259, 1930.
 - Wang, Y.Y., Aghajanian G.K. Excitation of locus coeruleus neurons by vasoactive intestinal peptide: evidence for G-protein-mediated inward current. *Brain Res.* 500: 107-118, 1989.
 - Wang, Y.Y., Aghajanian, G.K. Excitation of locus coeruleus neurons by vasoactive intestinal peptide: role of cAMP and protein Kinase A. *J. Neurosci.* 10 (10): 3335-3343, 1990.
 - Wells, H.K. *Ivan Pavlov: hacia una psicología y psiquiatria científicas.* Ed. Cártago México, 1984.
 - Williams, L., Karakan, I. and Hursh, C.J. *EEG of Human sleep: Clinical Implication.* John Wiley and Sons, 1974.