



03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR

PROYECTO DE POSTGRADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

AREA: NEUROCIENCIAS

AUSENCIA DE REBOTE DESPUES DE LA EXTRACCION DE  
LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR) EN GATOS PRIVADOS DE  
SUENO E INCREMENTO DEL POLIPEPTIDO VASOACTIVO  
INTESTINAL (VIP)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA

PRESENTA EL

**B I O L O G O**  
ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. RENE RAUL DRUCKER COLIN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

J993



## **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.

## INDICE

I-. ABREVIATURAS .....	2
II-. RESUMEN .....	5
III-. INTRODUCCION .....	7
A-.) ASPECTOS FENOMENOLOGICOS DEL SUEÑO.....	7
B-.) SUBSTRATO NEUROANATOMICO DEL SUEÑO.....	10
C-.) TEORIA MONOAMINERGICA DEL SUEÑO.....	16
D-.) TEORIA COLINERGICA DEL SUEÑO.....	23
E-.) TEORIA DE LOS FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO.....	29
- FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO EXTRAIDOS DEL PLASMA..	29
- FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO EXTRAIDOS DEL LCR DE	
ANIMALES PS.....	30
- FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO EXTRAIDOS DEL TEJIDO	
CEREBRAL .....	34
- NEUROPROTEINAS Y SUEÑO.....	36
- NEUROPEPTIDOS Y SUEÑO.....	38
- LCR DE ANIMALES PS Y NEUROPEPTIDOS.....	40
- EL POLIPEPTIDO VASOACTIVO INTESTINAL (VIP).....	41
- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	48
IV-. MATERIALES Y METODOS.....	50
V-. RESULTADOS.....	54
VI-. DISCUSION .....	57
VII- CONCLUSIONES .....	67
VIII- REFERENCIAS .....	68

I-.ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TEXTO:

ACh	Acetilcolina
AChE	AcetilColinesterasa
AcVIP	Anticuerpo anti VIP
AP	Area Preóptica
CAT	Colina-Acetil-Transferasa
CAP	Cloranfenicol
CCK-8	Colecistocinina-octapéptido
CCON	Condiciones Control
CGL	Cuerpo Genuculado Lateral
CLIP	Péptido-semejante-a-Corticotropina (Corticotropin-Like Intermediate Lobe Peptide)
Cx	Corteza cerebral
DSIP	Péptido inductor de sueño delta (Delta Sleep Inducing Peptide)
E	Epinefrina
EEG	Electroencefalograma
EEGrafía	Electroencefalografía
EOG	Electrooculograma
EMG	Electromiograma
FTG	Campo Tegmental Gigantocelular (Gigantcellular Tegmental Field)
FR	Formación Reticular
FRM	FR Mesencefálica
FRP	FR Pontina
HC	Hormona del Crecimiento
HA	Hipotálamo Anterior

HP	Hipotálamo Posterior
5-HT	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
5-HTP	5-Hidroxitriptofano
5-HIAA	Acido Indolacético
I. P.	Intraperitoneal
IVT	Intracerebroventricular
KIU	Unidades Internacionales de Kalicreína
LC	Locus Coeruleus
LCP	LC Principal
LCA	LC Alfa
LCS	LC Subcoeruleus
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LCRN	LCR Normal
LCR PS	LCR de animales privados de sueño
MOR	Movimientos Oculares Rápidos
MDP	Muramil Dipéptido
NE	Norepinefrina
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PHI	Péptido Istidina Isoleucina
PGO	Ponto-Geniculo-Occipital
PCPA	Paraclorofenilalanina
PG	Plataforma grande
periLC	Perilocus Coeruleus
PS	Privación de Sueño
RD	Núcleo del Rafe Dorsal
RIA	Radioinmunoensayo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	SN Periférico

SRAA	Sistema Reticular Activador Ascendente
SPS	Sustancia Promotora de Sueño
SOL	Sueño de Ondas Lentas
SOL I	SOL I
SOL II	SOL II
SP	Sueño Pradójico
TM	Tegmento Mesencefálico
TT	Tiempo Total
TTSMOR	TT de Sueño MOR
VIP	Polipéptido Vasoactivo Intestinal (Vasoactive Intestinal Polypeptide)

## I-RESUMEN

La privación de sueño en ratas, gatos y humanos produce durante el período de recuperación un rebote ó aumento en el tiempo total de sueño MOR. Asimismo, la administración de líquido cefalorraquídeo (LCR) de animales privados de sueño a animales normales e insomnes pretratados con paraclorofenilalanina ó propranolol produce un incremento en esta fase de sueño. Recientemente, se ha sugerido al polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) como uno de los principios activos del LCR para la inducción de sueño paradójico. Pese a estas evidencias, se desconocía el efecto de la extracción del LCR sobre los parámetros de sueño del mismo animal donador, así como la relación entre el tiempo de privación y la concentración de sustancias inductoras de sueño presentes en el LCR. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1-.) Determinar el efecto de la extracción de 100 ul de LCR de gatos privados de sueño sobre el rebote de sueño MOR de los mismos animales donadores y 2-.) Cuantificar la concentración del VIP en el LCR de gatos privados de sueño mediante la técnica de Radioinmunoensayo. Para tal efecto, se realizaron 2 experimentos. En el experimento 1, se utilizaron 8 grupos de gatos (n=7), los cuales fueron estudiados bajo las siguientes condiciones: Control, privación de sueño por 24, 48 y 72 horas; y privación de sueño por 24, 48 y 72 horas con extracción de 100 ul de LCR del IV ventrículo. Después de estas maniobras, todos los animales fueron registrados durante 12 horas continuas. En el experimento 2, se utilizaron 7 grupos de gatos (n=10), bajo las siguientes condiciones: Control, privación de sueño por 24, 48 y 72 horas, y controles de privación de sueño

con plataforma grande, durante 24, 48 y 72 horas. Después de los respectivos periodos de privación de sueño ó situaciones control, a todos los animales se les extrajo LCR (200-400 ul) del IV ventrículo, el cual fue analizado mediante radioinmunoensayo para el VIP. Los resultados mostraron que la privación de sueño indujo un incremento significativo en la cantidad de sueño paradójico posterior al tiempo de privación y dicho efecto fue abolido por la extracción de 100 ul de LCR. Asimismo se demostró que la privación de sueño produjo un incremento significativo en la concentración de VIP en el LCR. Tal efecto no dependió del estres producido por el método de privación de sueño, ya que la concentración de VIP de los animales colocados en plataformas grandes no mostro diferencias significativas en relación al grupo control. Estos resultados apoyan la teoría de que durante la vigilia prolongada se acumulan sustancias con propiedades inductoras de sueño y que al disminuirlas mediante la extracción de LCR se inhíbe el rebote de sueño MOR. Asimismo, se demuestra que una de estas sustancias es el VIP, el cuál al acumularse en el LCR durante la privación de sueño probablemente participa en la homeostasis de sueño y en el rebote de sueño MOR, a partir de una interacción hormonal, de neurotransmisores y de segundos mensajeros que inciden sobre diferentes grupos neuronales sensibles para aumentar el sueño MOR.



## II-INTRODUCCION

### A-.) ASPECTOS FENOMENOLOGICOS DEL SUEÑO

El sueño, representa una de las actividades biológicas, ampliamente difundida a lo largo de la escala filogenética animal, que ocupa un espacio temporal y presenta una ritmicidad determinada. A pesar de la importancia de este proceso, el cuál ha sido estudiado de manera sistemática por más de 30 años, aún continúa representando un enigma biológico.

En un principio, el estudio del sueño únicamente se limitó a evaluaciones conductuales, por lo que los resultados eran poco claros. Es hasta el desarrollo del electroencefalograma (EEG) cuando el estudio del sueño fue más completo. Mediante la EEGrafía se pudo determinar que los estados de vigilia y sueño se acompañan de cambios activos en la corteza cerebral. Posteriormente, Aserinsky y Kleitman (1953), describieron una fase de sueño, la cual se acompaña de movimientos oculares, a la cual llamaron por esta razón sueño de movimientos oculares rápidos ó sueño MOR, a esta fase también se le ha dado el nombre de sueño paradójico (SP), debido a que durante esta etapa se produce una desincronización del EEG, semejante a la de la vigilia (Jouvet, 1969). Actualmente, para analizar el ciclo sueño-vigilia se necesita al menos del registro de los siguientes parámetros eléctricos: EEG ó actividad cortical, MORs ó electro-oculograma (EOG) y tono muscular ó electromiograma (EMG). Asimismo, pueden registrarse otras variables, como son la frecuencia respiratoria y cardíaca, así como actividades de regiones específicas del cerebro, tales como las ondas ponto-

geniculo-occipital (PGOs), las cuales reciben este nombre por que pueden registrarse en el puente, en el núcleo geniculado lateral y en la corteza occipital.

El ciclo sueño-vigilia del humano consiste de varias etapas las cuales son: Vigilia, SOL I, II, III y IV, y sueño MOR; y son caracterizadas de la siguiente forma:

1-.) VIGILIA: El EEG presenta frecuencias mezcladas de un ritmo alfa y beta (actividad de bajo voltaje). Generalmente, el tono muscular esta elevado y hay presencia de MORs.

2-.) SUEÑO DE ONDAS LENTAS (SOL): Esta dividido en 4 estadios, SOL: I, II, III y IV.

a-.) SOL I: El EEG presenta actividad de bajo voltaje de 50 a 75 uv, y una frecuencia mayor de 5 a 7 Hz, aparecen ocasionalmente las llamadas ondas del vertex, con una amplitud mayor de 200 uv.

b-.) SOL II: Se presentan los husos de sueño y los complejos K. Los primeros, aparecen con una frecuencia entre 12-14 Hz, con una duración mínima de 5 seg y formados por 6-7 ondas. Los segundos, representan ondas con un complejo negativo seguido por uno positivo con una duración mayor de 5 seg.

c-.) SOL III y IV o Sueño Delta: Cada una de estas fases varía de acuerdo a su duración en la época de registro. Cuando existe por lo menos un 20%, pero no mas de un 50% de actividad lenta de 2 Hz y con una amplitud promedio de 75 uv, se identifica el SOL III. Mientras que para determinar la fase de SOL IV, necesita haber un mínimo del 50% de dicha actividad. A lo largo de estas fases de sueño, el tono muscular y los MOR decrecen paulatinamente.

d-.) SUEÑO MOR: El EEG presenta actividad de bajo voltaje, parecido al de la vigilia, con la presencia de MOR y atonía muscular. El 90% de la ensoñaciones ocurren en esta fase (Rechstafen y Kales, 1968).

Las fases de sueño I, II, III, IV y sueño MOR se suceden unas a otras en forma cíclica durante una noche de sueño. Cada ciclo se inicia con el SOL I y se continúa con las siguientes fases, la sucesión dura aproximadamente 90 min en el hombre. En una noche puede haber de 4 a 6 ciclos (Hartmann, 1968).

Por otra parte, en la investigación básica del sueño, el gato ha sido uno de los animales más utilizado. Las señales registradas son las mismas que en el humano, pero adicionalmente se registran las ondas ponto-geniculo-occipital (PGOs). Las fases del ciclo sueño-vigilia del gato se describen de la siguiente forma (Fig I): La vigilia cursa con una actividad cortical rápida (14-40 Hz) y de bajo voltaje, el EMG de los músculos posturales esta muy activado y el CGL exhibe potenciales que coinciden con los movimientos oculares, por lo que se denominan potenciales relacionados a movimientos oculares.

Conforme la actividad del EEG se hace mas lenta se instala el SOL con la aparición de los llamados husos de sueño, que presentan una frecuencia de 5-6 Hz y representan el SOL I. Después al disminuir su frecuencia (1-3 Hz) y aumentar su amplitud, aparece el SOL II. Durante estos estados la actividad del tono muscular disminuye.

El sueño MOR ó SP, cursa con desincronización cortical, movimientos oculares, atonía muscular y aparición de las ondas

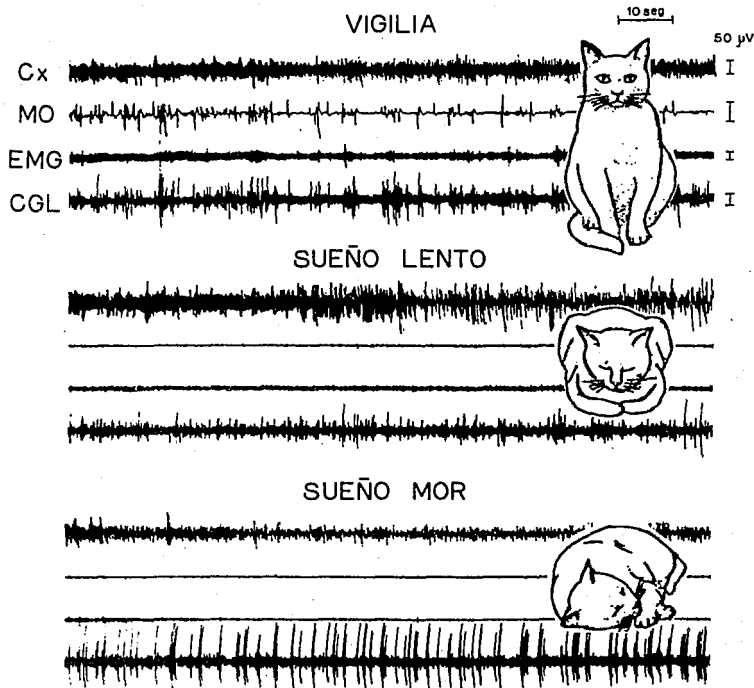


Fig. 1. Registro poligráfico del ciclo vigilia-sueño del gato. Como puede observarse la actividad cortical (Cx) durante la vigilia es similar a la que se presenta en el sueño MOR. Obsérvese también, la pérdida de tono muscular (EMG) y la presencia de las ondas PGOs registradas en el CGL, característicos de esta fase de sueño.

PGOs (Ursin y Sterman, 1981). En estos animales, el ciclo sueño-vigilia es polifásico, a lo largo de las 24 horas del día están durmiendo y despertando. Además, la duración de cada ciclo es aproximadamente de 27 minutos, menor a la del hombre (Delorme y col, 1964)

En resumen, la descripción fenomenológica del sueño con base en estos parámetros, ha sido utilizada como herramienta para diversos estudios y mediante los cuales se han propuesto diferentes teorías para tratar de explicar los mecanismos que subyacen el sueño. En la siguiente sección revisaremos brevemente la participación de los substratos cerebrales en la modulación del sueño.

#### B-.) SUBSTRATO NEUROANATOMICO DEL SUEÑO.

El enfoque neuroanatómico del sueño ha sido uno de los más antiguos y continúa utilizándose con gran frecuencia, debido a que describe la relación de las diversas regiones cerebrales y su conexión con los procesos del sueño.

Los estudios iniciales, fueron realizados por Von Economo (1930) en pacientes que morían a causa de la encefalitis letárgica, y los cuales se caracterizaban por un insomnio marcado durante la enfermedad, presentando lesiones en el hipotálamo anterior (HA). Mientras que pacientes que mostraban hipersomnia mostraban lesiones en el hipotálamo posterior (HP). Posteriormente, Ranson, en 1931, confirma una parte de dichos hallazgos. El realizó lesiones en el HA de monos y produjo insomnio. Sin embargo, lesiones en el HP no producían ningún efecto. No obstante, Nauta en 1946, demuestra que lesiones en el

HA de ratas producen insomnio y que lesiones a nivel del mesencéfalo y del HP producen sueño. Estos resultados sugirieron la existencia de dos centros neuroanatómicos responsables de la generación del sueño y la vigilia: el HP como centro de la vigilia el cuál inhibe activamente el centro del sueño localizado en el HA.

Hess en 1944, reportó que la estimulación eléctrica de la masa intermedia del tálamo en el gato produce un animal conductualmente dormido. Posteriormente, Monnier y col, en 1963, demostraron que la estimulación eléctrica de los núcleos intralaminares del tálamo, inducen sincronización del EEG a lo que el denominó "sueño ortodoxo". Estos trabajos evidenciaron una participación importante del tálamo en la generación de sueño. Sin embargo, Anderson en 1968, demostró que lesiones en el tálamo no producían insomnio por lo que determinó que esta estructura cerebral sólo estaría participando en la modulación del sueño.

Trabajos posteriores han demostrado que existen otras regiones cerebrales relacionadas con la modulación del ciclo sueño-vigilia. De esta forma, Bremer en 1935 (en Bremer 1974) realizó sus estudios en dos preparaciones hechas en el gato, mediante secciones finas a diferentes niveles del cerebro: Por una parte realizó, el cerebro aislado, separando la región anterior del cerebro del tallo cerebral, al seccionar el cerebro a nivel intercolicular, y mediante registro EEGráfico observó que existía una sincronización permanente, lo que el interpretó como un animal constantemente dormido. Mientras que en la otra preparación, Encéfalo aislado; que consistió en seccionar a nivel

más caudal entre médula oblongada y espinal, observó que no se modificaba el ciclo sueño-vigilia del gato. Por lo que concluyó que el sueño es el producto de la llegada insuficiente de estímulos sensoriales capaces de despertar al animal y que la vigilia es el caso contrario, la cantidad de estímulos que se reciben son importante para mantener despierto al animal. Con estos resultados, Bremer sugirió que el sueño es un estado pasivo que depende de la disminución de la actividad sensorial. Sin embargo, Moruzzi y Magoun, en 1949, interpretaron estos resultados con otro enfoque. Ellos consideraron la existencia de una estructura intermedia entre ambas secciones responsable de generar dicho efecto. Con esta idea, realizaron, en la preparación aguda del Encéfalo aislado, estimulaciones eléctricas de la formación reticular bulbar, del tegmento mesencefálico y pontino, así como del tálamo y del subtálamo. Encontrando que la estimulación de la Formación Reticular (FR) produjo una sincronización del EEG, por lo que sugirió la posibilidad de que esta estructura tuviera influencia hacia la corteza cerebral, mediante un sistema denominado: Sistema Reticular Activador Ascendente (SRAA), que a través de proyecciones ascendentes, ejercen una influencia activadora tónica en estructuras subcorticales y corticales, para aumentar y mantener un estado de vigilia. Mientras que para que el sueño se presente tiene que disminuir la actividad de la FR. La existencia de este sistema fue demostrado mediante lesiones de la FR las cuáles produjeron una disminución inmediata y crónica de la activación cortical tónica (Lindsley y col, 1950; en Jones, 1990). Asimismo, se

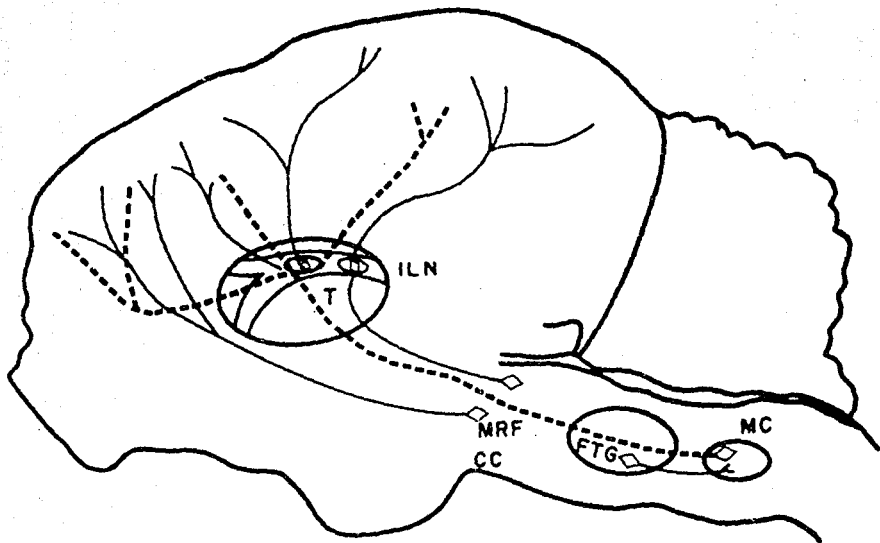


FIG.2

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS EN LA GENERACIÓN DEL EEG. COMO SE MUESTRA EN EL ESQUEMA LA FORMACIÓN RETICULAR MESENFALICA (MRF) Y EL NÚCLEO MAGNOCELULARIS (MC) MODULAN LA INFORMACIÓN HACIA LA CORTEZA CEREBRAL A TRAVÉS DE VÍAS QUE PASAN POR LOS NÚCLEOS INTRALAMINARES (ILN) DEL TÁLAMO (T) O MEDIANTE VÍAS DIRECTAS. CC = CRUZ CEREBRI Y FTG= CAMPO TEGMENTAL GIGANTOCELULAR. (TOMADA DE DRUCKER-COLÍN Y PROSPERO-GARCÍA, 1989).



demostró que la influencia activadora de la FR después de la estimulación eléctrica, sobre la corteza cerebral fue transmitida a partir de una vía con dos relevos: una vía dorsal hacia el tálamo y una vía ventral al subtálamo, a hipotálamo y Area Preóptica (AP) (Starzl y col, 1951). Dentro del sistema dorsal, el "núcleo tálamico no-especifico" ejerce una influencia activadora difusa sobre la corteza cerebral, como la que es producida por la estimulación del núcleo tálamico intralaminar y ventromedial. Sin embargo, esta influencia no es necesaria para la activación cortical, ya que la estimulación de la FR puede aumentar la activación cortical, en la ausencia del tálamo. Por lo que, el sistema extratálamico ventral es el particularmente importante para el mantenimiento de la activación cortical.

En 1960, Shute y Lewis, establecieron que un considerable número de células dentro del tegmento ponto-mesencefálico eran colinérgicas, ya que contenían acetilcolinesterasa (AChE), la enzima degradativa para ACh. Asimismo, fibras ascendentes fueron teñidas con AChE, de la FR a lo largo de la vía dorsal del hipotálamo. En el AP, estas fibras ascendentes se tiñeron para AChE y alcanzaron otra población celular hacia la corteza cerebral. Con base en estos resultados Shute y Lewis postularon que las neuronas colinérgicas representan el SRAA y que el enlace 4 colinocolinérgico en el cerebro anterior basal representa el relevo extratálamico hacia la corteza cerebral del SRAA.

Asimismo, se ha observado que estimulaciones eléctricas a bajas y altas frecuencias del hipotálamo anterior de gatos produce sincronización del EEG (Serman y Clemente, 1962a,b.). Estos resultados son confirmados poco después por Hernández-Peón

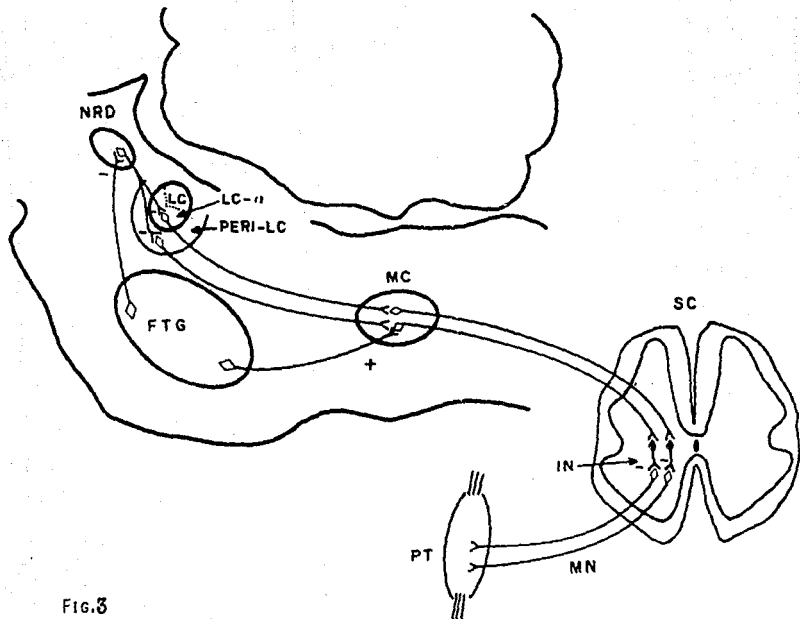


FIG.3

ILUSTRACIÓN QUE REPRESENTA LA MODULACIÓN DEL TONO MUSCULAR. EL COMPLEJO DEL LOCUS COERULEUS (LC) MANDA PROYECCIONES HACIA EL NÚCLEO MAGNOCELULARIS Y DE ALLÍ LLEGAN A LAS INTERNEURONAS (IN) DE LA MÉDULA ESPINAL (SC) LAS CUALES PRODUCEN UNA INHIBICIÓN DE LAS MOTONEURONAS (MN) Y EN CONSECUENCIA SE ABATE EL TONO MUSCULAR.

NRD = NÚCLEO DEL RAPHE DORSALIS

FTG = CAMPO TEGMENTAL GIGANTOCELULAR

(TOMADA DE DRUCKER-COLIN Y PROSPERO-GARCIA, 1989).

y Chavéz-Ibarra, 1963, lo cuales realizaron estimulaciones eléctricas ó farmacológicas del cerebro anterior basal ó Area Preóptica (AP), encontrando que la estimulación del AP con microcristales de ACh induce somnolencia y sueño en el gato, mientras que lesiones ó administraciones de atropina, inducen insomnio y suprime el efecto inductor de sueño de la Ach (Velluti y Hernández-Peón, 1963). A partir de estos resultados, Hernández-Peón propuso una vía hipnógena localizada dentro del cerebro anterior medial, la cual esta integrada por dos componentes, el primero es un componente descendente que se origina dentro del sistema límbico y se une a nivel pontino con un componente ascendente, originado desde la sustancia gris de la médula espinal. A su vez el sistema de vigilia tiene correspondencia con el SRAA

En cuanto, a los substratos responsables de la generación de sueño MOR, se ha evidenciado que se localizan dentro del romboencéfalo, ya que el diencefalo y telencefalo no exhiben ningún patrón de actividad característico de esta fase cuando son separados del tallo cerebral. Los signos de sueño MOR ó espigas PGOs en asociación con la atonía muscular fueron evidentes en el romboencéfalo y periferia. Separaciones mayores mostraron que el puente fue la región más importante para esta fase, ya que transectos através del mesencefalo caudal, no impiden la aparición periódica de este estado. Mientras que transectos através de la médula rostral eliminan la atonía muscular, pero no impiden la aparición periódica de la actividad fásica, como son las espigas PGO y los MORs. Los resultados de estos estudios

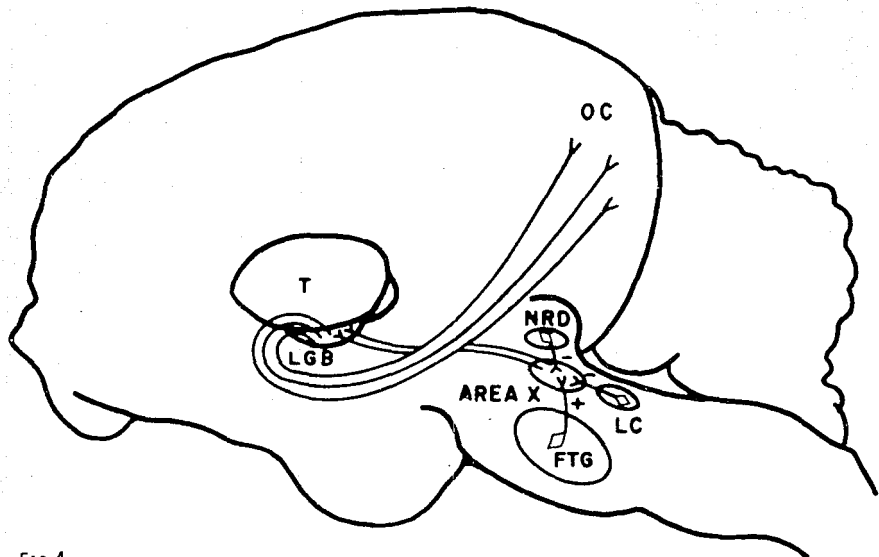


FIG.4

ESQUEMA QUE MUESTRA LA PARTICIPACIÓN DE LAS DIVERSAS ESTRUCTURAS PARA LA GENERACIÓN DE LAS ONDAS PONTO-GENÍCULO-OCCIPITAL (PGOs). LA ESTRUCTURA GENERADORA DE ESTAS ONDAS ES EL ÁREA X, LA CUAL ESTÁ MODULADA DE FORMA INHIBITORIA POR EL LOCUS COERULEUS (LC) Y EL NÚCLEO DEL RAPHE DORSAL (NRD) MIENTRAS QUE EL CAMPO TEGMENTAL GIGANTOCELULAR (FTG) LA ESTIMULA. EL ÁREA ENVÍA PROYECCIONES HACIA LA CX OCCIPITAL A TRAVÉS DEL CUERPO GENICULADO LATERAL (LGB) DEL TÁLAMO (T). (TOMADA DE DRUCKER-COLÍN Y PROSPÉRO-GARCÍA, 1989).

indicaron la importancia del tegmento pontino en la generación de la activación fásica y tónica, así como de los procesos inhibitorios del sueño MOR (Jouvet, 1962). Posteriormente, se demostró que lesiones eléctricas extensas del tegmento pontino produjeron una disminución total del estado de sueño MOR, incluyendo espigas PGO, MORs y atonía muscular (Jones, 1979).

En 1972, Jouvet, propuso que las neuronas del LC, localizadas dentro del tegmento pontino dorsolateral, están involucradas en la generación de sueño MOR, ya que lesiones electrolíticas en este núcleo impiden la aparición de sueño MOR, interrumpiendo la atonía muscular, y lesiones extensas de las neuronas noradrenérgicas, pueden eliminar este estado incluyendo las espigas PGO.

En resumen, los resultados anteriormente descritos han sido de gran utilidad para establecer las conexiones y los substratos cerebrales relacionados con la generación y el mantenimiento de las fases y de los signos del ciclo sueño-vigilia. Además, de mencionar brevemente la naturaleza química de dichos grupos neuronales, los cuales fueron de naturaleza colinérgica, noradrenérgica, serotoninérgica y gabaérgica, principalmente. Esta relación representa una interacción importante para establecer no solamente los substratos, sino también los mediadores químicos que en conjunto, participan en la modulación del ciclo sueño-vigilia. Con base en estas evidencias, en la siguiente sección revisaremos, la participación de dichos neurotransmisores en la modulación del sueño.

### C-.) TEORIA MONOAMINERGICA DEL SUEÑO.

Jouvet en 1969, a partir de diversas evidencias experimentales, propuso la "teoría monoaminérgica del sueño", cuyos postulados fundamentales son: 1) El SOL se inicia por la liberación de 5-HT de las neuronas del núcleo rafé dorsal (nRD); 2) el sueño MOR se inicia por la liberación de 5-HT de neuronas del núcleo rafé caudal, y 3) la ejecución de la fase MOR depende de las neuronas noradrenérgicas del LC, mismas que se encargan de preservar las diversas manifestaciones de dicha fase. Los postulados de esta teoría están sustentados por los siguientes aportes experimentales:

#### I-SEROTONINA (5-HT) Y SUEÑO.

1-.) La administración de 5-HT en el área postrema de gatos (Koella y col. 1968), o bien de sus precursores inmediatos, tales como el aminoácido L-triptofano (L-TRIP) ó el 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (Jouvet, 1969), inducen SOL suprimiendo el sueño MOR.

2-.) El bloqueo farmacológico de la 5-HT en el gato mediante la paraclorofenilalanina (PCPA), un inhibidor de la enzima triptofano hidroxilasa, que transforma el TRIP en 5-HT, reduce el SOL y el sueño MOR, durante un período de 48-52 horas, produciendo un insomnio casi completo, acompañado de la descarga continua de ondas PGOs durante todo este tiempo (Delorme y col, 1969). De forma similar, gatos pretratados con reserpina, fármaco que disminuye simultáneamente la concentración de NE y 5-HT provoca insomnio durante varias horas (Jouvet, 1969). En ambas situaciones, el insomnio es reducido con una sola administración de 5-HTP ó de 5-HT, respectivamente (Mouret y col, 1967;

**TABLA 1**

Drogas que afectan la transmisión de 5-HT, NE y ACh.

Nombre	Mecanismo de acción
<b>5-HT</b>	
Paraclorofenilalanina (PCPA)	<u>Síntesis</u> Inhibe la hidroxilasa del triptofano.
Reserpina	<u>Almacenamiento</u> Bloquea la incorporación a la vesícula.
<b>CATECOLAMINAS</b>	
alfa-metil-para-tirosina	Inhibe la hidroxilasa y la síntesis.
Disulfiram	Inhibe la hidroxilasa y la síntesis.
Anfetamina	Aumenta la liberación, bloquea la recaptación.
IMAO (Pargilina, iproniazida, etc)	Inhibe la MAO.
Propranolol	Antagonista NE Beta 2.
Fentolamina	Agonista NE Alfa 1 y 2.
Prazocin	Agonista NE Alfa 1 Y 2.
Clonidina	Agonista NE Alfa 2.
Yohimbina	Antagonista NE Alfa 2.
<b>ACh</b>	
Atropina	Antagonista muscarínico.
Escopolamina	Antagonista muscarínico.
Arecolina	Agonista colinérgico.
Carbacol	Agonista colinérgico.
Oxtremorina	Agonista colinérgico.
Fisostigmina	Inhibidor de la Acetilcolinesterasa.
Neostigmina	Inhibidor de la Acetilcolinesterasa.
Hemicolinio-3	Inhibe la síntesis de ACh.
Eserina	Inhibidor de la Acetilcolinesterasa.

Petitjean y col, 1985).

3-.) Lesiones electrolíticas del n.RD, producen una reducción de los niveles serotoninérgicos cerebrales y una reducción del SOL y de sueño MOR. Dicho efecto depende del tamaño de la lesión. De esta forma, lesiones de un 80 a 90% de este núcleo producen un insomnio continuo durante los primeros 3 a 4 días mientras que lesiones menores al 15% no modifican el sueño (Jouvet y Renault, 1966). Asimismo, lesiones rostrales inducen la aparición de sueño MOR directamente después de la vigilia, semejante a estados de narcolepsia (Jouvet, 1969).

A partir de estos resultados, se postuló que los niveles endógenos de 5-HT en el cerebro, eran importantes para la modulación del SOL. Pese a estas evidencias, actualmente la participación de la 5-HT en el sueño no ha sido del todo clara debido a las siguientes limitantes:

1-.) Estudios electrofisiológicos de las neuronas serotoninérgicas del n.RD disminuyen gradualmente su actividad de disparo, en el gato, conforme el animal transita de la vigilia (100% de descarga) al SOL (50%) hasta llegar al sueño MOR (10%) (McGinty y col, 1973; Fornal y col, 1985).

2-.) La administración crónica de PCPA a gatos produce un efecto temporal, ya que el ciclo sueño-vigilia retorna a la normalidad después del 7o. día de administración, a pesar de que la 5-HT permanece disminuida (95% de reducción) desde el 5o. día (Dement y col., 1973).

3-.) Diferentes dosis de PCPA en la rata, reducen la biodisponibilidad de 5-HT; sin embargo, pese a que la 5-HT esta disminuida no se presentan cambios en el ciclo sueño-vigilia



(Rechstaffen y col, 1973).

4-.) El enfriamiento en el n.RD (10 C) produce un incremento en la cantidad de sueño (Cespuglio y col, 1982).

5-.) La liberación de 5-HT y las concentraciones del ácido indolacético (5-HIAA) incrementan durante la vigilia y decrecientan durante el sueño, en el núcleo caudado y corteza (estructuras que reciben terminales nerviosas serotoninérgicas axonales) también incrementan durante la vigilia y decrecientan durante el sueño (Cespuglio y col, 1984).

En resumen, estas evidencias, no apoyan los postulados iniciales de la 5-HT en la modulación del sueño, ya que demuestran que a pesar de que los niveles serotoninérgicos y la actividad de dichas neuronas están disminuidos se presenta el sueño, por lo que esta teoría está casi por completo desechada. No obstante, recientemente, Sallanon y col, (1985), le han dado un nuevo enfoque a dicha teoría proponiendo que la 5-HT participa de manera indirecta en la regulación del sueño, mediante la síntesis, liberación y almacenamiento de algún factor inductor de sueño. Esta sugerencia, surgió a partir de que la administración de 5-HTP intraperitoneal (i.p.) ó intracerebroventricular (i.c.v.) en animales insomnes pretratados con PCPA, presenta una latencia grande para restaurar primero el SOL y después de 60 min el sueño MOR, y dicho efecto presenta una duración de 6-8 horas. Actualmente, el grupo de Jouvét, ha continuado las investigaciones al respecto, y mediante la técnica de voltametría han demostrado que el decremento en la actividad unitaria de las neuronas del n.RD durante el ciclo sueño-vigilia es producida

a través de un proceso auto-inhibitorio. Asimismo, existen dos modalidades de liberación de 5-HT durante el ciclo sueño-vigilia, una ocurre a través de las terminales nerviosas axonales durante la vigilia y una liberación dendrítica durante el sueño. Además, demostraron que la liberación de 5-HT durante la vigilia ocurre en las terminales nerviosas axonales procedentes del hipotálamo y de esta manera, influyen la síntesis de factores hipnógenicos. En forma particular, han demostrado que uno de los factores es el péptido parecido a la corticotropina (CLIP) ya que tiene un efecto inductor de sueño junto con un incremento en los niveles de 5-HIAA del n.RD (Cespuglio y col, 1990; Houdoin y col, 1991).

Por otra parte, Shimatsu y col, (1982; 1983;) apoyan la participación de la 5-HT en la liberación de factores inductores de sueño, al demostrar que la administración regional de 5-HT en el hipotálamo aumenta significativamente la liberación de un péptido con propiedades hipnóticas, el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP). Asimismo, la 5-HT produce el mismo efecto en el núcleo supraquiasmático (NSQ) (Kiss y col, 1984). Adicionalmente, se ha visto, que la 5-HT regula los ritmos circádicos (Eskin y col, 1982) y que su efecto puede evitarse por la administración sistémica de inhibidores de la síntesis de proteínas, como la anisomicina (Takahashi y Turek, 1987). Probablemente, una de estas proteínas es el VIP, ya que se ha visto que este péptido facilita la conversión de 5-HT a melatonina (Kaneko, 1980) con lo que puede estar facilitando la sincronización de los ciclos circádicos.

Por otra parte, en la teoría monoaminérgica de sueño, Jouvet

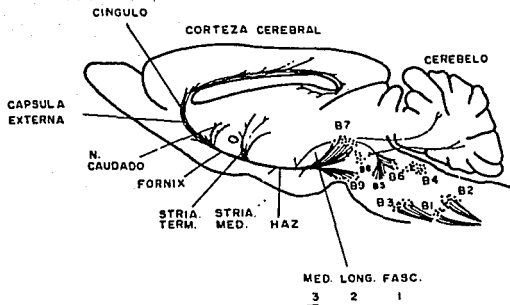
en 1969, también relacionó a la NE y al LC como responsables del mantenimiento de la fase de sueño MOR. Este postulado fue fundamentado por los siguientes experimentos:

## II.- NOREPINEFRINA (NE) Y SUEÑO.

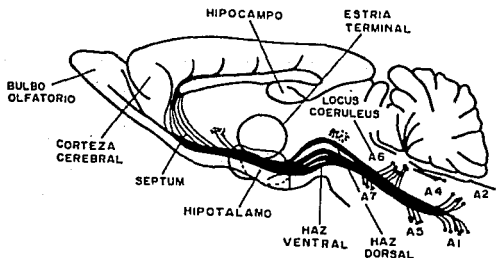
- 1-.) La inyección i.c.v. de Epinefrina (E) produce somnolencia en el gato (Hernández-Peón, 1963).
- 2-.) La administración del alfa-metil-paratirosina (Stein y col, 1979) y del disulfiram, fármacos que bloquean la síntesis de NE, disminuyen en ratas y gatos el tiempo total de sueño MOR (Jouvet y col, 1969).
- 3-.) Lesiones bilaterales electrolíticas del LC, suprimen de manera selectiva el sueño MOR. Asimismo, se interrumpe la atonía muscular característica de la fase de sueño MOR e incluso si las lesiones destruyen la mayoría de las neuronas noradrenérgicas del LC también se eliminan las ondas PGOs (Jouvet y col, 1969).
- 4-.) La privación de sueño (PS) en la rata produce un rebote de sueño MOR posterior a la privación y dicho rebote es asociado con un aumento en la concentración de NE cerebral (Pujol y col, 1969).

En resumen, estos resultados sugirieron que la NE participa en la regulación de sueño MOR. Sin embargo, actualmente también existen datos contradictorios con la posible participación de la NE y E en la regulación del ciclo sueño-vigilia, los cuales son los siguientes:

- 1-.) Se ha demostrado que la pargilina, un inhibidor de la enzima monoamino oxidasa, enzima responsable de la degradación de catecolaminas, produce un aumento de NE y E, en el núcleo LC,



**Fig. 5** Localización de las neuronas serotoninérgicas en el cerebro de la rata. Como puede observarse gran parte de las neuronas que contienen 5-HT se localizan en los núcleos del rafé. Los grupos B1, B2 y B3, corresponden al grupo basal y se localizan ventromedialmente a la médula oblongada y puente. Las conexiones de estos núcleos se establecen con los segmentos cervical y lumbar de la médula espinal. El resto de los núcleos establecen conexiones con segmentos ascendentes (B4 - B9) que se establecen con estructuras del sistema límbico, con el hipotálamo y con el área preóptica (Tomada de Salín-Pascual y Ortega-Soto, 1989).



**Fig. 6** Distribución de las vías noradrenérgicas en el cerebro de la rata. Los cuerpos neuronales que contienen NE están principalmente distribuidos en el puente y médula oblongada la nomenclatura de dichos núcleos va de de A1 - A9 (Tomada de Salín-Pascual y Ortega-Soto, 1989).

pero suprime de manera selectiva el sueño MOR.

2-.) La tasa de disparo de las neuronas noradrenérgicas del LC disminuyen gradualmente conforme el animal transita de la vigilia, al SOL hasta llegar a sueño MOR, donde se encuentran prácticamente silentes (McGinty y col, 1974).

3-.) Microcristales de NE y E administrados en el hipotálamo, inducen un estado de vigilia con desincronización cortical (Hernández-Peón y Chavéz-Ibarra, 1963).

4-.) La depleción farmacológica de las catecolaminas mediante la inhibición de su síntesis por la alfa-metil-paratirosina, produce hipersomnia, la cuál es caracterizada por un incremento en el SOL y en el sueño MOR. Asimismo, la anfetamina, que aumenta la liberación sináptica de catecolaminas, aumenta preferencialmente la vigilia y de manera secundaria suprime el sueño (Jacobs y Jones, 1978).

5-.) Lesiones selectivas de neuronas noradrenérgicas del LC no produce disminución de la fase de sueño MOR (Henly y Morrison, 1974).

En general, a partir de estas evidencias, se ha propuesto que las neuronas noradrenérgicas del LC y las neuronas serotoninérgicas del rafé, juegan un papel inhibitorio más que un papel facilitador, como originalmente se pensaba para la generación de sueño MOR.

En cuanto, a los receptores noradrenérgicos, el grupo de Hilakivi, ha propuesto que participan de manera diferencial durante el sueño MOR. De esta forma, han demostrado que la administración de la prazocina y la fentolamina, agonistas de los

receptores alfa 1 y 2, aumentan el sueño MOR (Hilakivi y col, 1983). A su vez, la clonidina, fármaco agonista de los receptores alfa 2 presinápticos, reduce la cantidad de sueño MOR. Mientras que, el propranolol, antagonista de los receptores beta 2, reduce el SOL y el sueño MOR (Hilakivi y col, 1983).

Estos datos son aparentemente contradictorios con la idea inicial de la participación de la NE en el sueño. Sin embargo, recientemente Siegel y Rogawski (1988) sugieren que una de las principales funciones del sueño MOR es aumentar la sensibilidad de los receptores adrenérgicos. De esta manera, es necesario que los niveles de NE desciendan a la menor concentración posible durante esta fase de sueño. Esta teoría concilia los hallazgos electrofisiológicos (disminución gradual de la actividad de disparo de las neuronas del LC durante el SOL y sueño MOR) y los resultados farmacológicos con bloqueadores de los receptores alfa.

En resumen, a pesar del esfuerzo por conciliar los hallazgos relativos al papel de la NE en el sueño MOR, los resultados no son convincentes y actualmente, se ha descartado casi por completo la posible participación de la NE en la inducción de sueño MOR, aunque se cree que juega un papel permisivo.

Sin embargo, debido a los indicios de la participación de otro neurotransmisor involucrado en la regulación del ciclo sueño-vigilia, surgió la teoría colinérgica del sueño, la cual actualmente permanece vigente.

### C-.TEORIA COLINERGICA

La teoría colinérgica fue inicialmente postulada por Hernández-Peón en 1963. Esta teoría propone que la AcetilColina (ACh) participa en la iniciación del sueño MOR y en el mantenimiento de la activación cortical. Sus fundamentos experimentales son los siguientes:

1-.) La aplicación directa de microcristales de ACh en el AP , en la corteza piriforme y en la porción rostral del cíngulo inducen la aparición de SOL y de sueño MOR, con una latencia corta (Hernández-Peón y col, 1963). Dicho efecto producido en el AP es bloqueado por la administración de atropina, un antagonista colinérgico (Velluti y Hernández-Peón, 1963).

2-.) La administración de atropina sistémica sincroniza el EEG al mismo tiempo que aumenta de dos a tres veces la liberación de ACh cortical (Celesia y Jasper, 1966).

3-. Durante el sueño MOR ocurre la mayor liberación de ACh cortical (Jasper y Tessier, 1971) y del cuerpo estriado (Gadea-Ciria y col, 1973), comparada con la vigilia y el SOL. A su vez, la lesión electrolítica del AP impide que se presente dicho efecto.

4-.) El Hemicolinio-3, un inhibidor de la síntesis de ACh bloquea la desincronización del EEG (Slater, 1968) y disminuye la duración de sueño MOR en el ciclo sueño-vigilia del gato (Domino y Stawisky, 1971). Asimismo, la administración i.v.t del Hemicolinio-3 inhibe el sueño MOR en gatos (Hazra, 1970)

5-.) La administración de atropina sistémica disminuye el sueño MOR, sin afectar el SOL, en el gato pontino (Jouvet y col, 1973).

6-.) La administración de ACh, o eserina un inhibidor de la

acetil colinesterasa en la FRP inducen sueño MOR con una latencia de 20 segundos y una duración aproximada de 3 h. Dicho efecto es potenciado con la administración simultánea de tales compuestos (Baghdoyan y col, 1984).

7-.) La estimulación colinérgica de la FRP con betanecol (Hobson y col, 1983), neostigmina (Baghdoyan y col, 1984) o fisostigmina (Sitaram y col, 1976), aumentan la cantidad de sueño MOR.

8-.) La atropina y la escopolamina retrasan la aparición y reducen la duración de los periodos de sueño MOR en sujetos normales. Adicionalmente, la administración endovenosa de fisostigmina o arecolina, en los primeros periodos de sueño MOR, aumentan el tiempo total de esta fase (Sitaram y Gillin, 1980).

9-.) La neostigmina, un inhibidor de la acetil colinesterasa, produce un aumento en la cantidad de sueño MOR, a partir de un incremento en la frecuencia y de una disminución en la latencia. Dicho efecto es bloqueado por la administración de atropina, mediante una reducción en la frecuencia y un aumento en la latencia de sueño MOR (Baghdoyan y col, 1985)

10-.) La administración de carbacol- un agonista colinérgico- en la FRP, produce un incremento en la cantidad de sueño MOR de manera dosis dependiente (Gnadt y Pegram, 1986).

11-.) Existe un gradiente neuroanatómico de colinocepción en el puente para inducir sueño MOR, de tal manera que el tegmento pontino dorsalis es el más sensible a la estimulación colinérgica para provocar esta fase de sueño (Baghdoyan y col, 1987).

12-.) Recientemente, Datta y col, 1991 demostraron que la



administración del carbacol (4 ug/250 nl) en la región peribraquial del tallo cerebral produjo un aumento en la cantidad de sueño MOR y de SOL con PGOs de 2 a 4 días y hasta una semana después de la administración. Dicho efecto fué asociado con un incremento de las ondas PGOs ipsilateral al sitio de microinyección durante 24 horas. Además, encontraron que también hubo un aumento en la cantidad de PGOs durante el SOL II y las cuales no fueron asociadas con movimientos oculares. Estos resultados indicaron que el aumento de sueño MOR producido por el carbacol pudiera ser causado por una inducción en la síntesis de proteínas de las neuronas colinérgicas mediante un segundo mensajero liberado durante la activación inicial de la membrana y que la aparición de PGOs pudiera producirse a través de un circuito local activado en forma selectiva y disociado del resto de la red generadora de sueño MOR

13-.) La cepa de ratas Flinders, las cuales presentan hipersensibilidad a la ACh, presentan mayor cantidad de sueño MOR, que otras cepas registradas (Shiromani y col, 1988 b).

14-.) Asimismo, se ha demostrado que neuronas y vías neuronales localizadas dentro del tegmento pontino dorsolateral parecen jugar un papel crítico en el sueño MOR, ya que en preparaciones con transectos a través del cerebro medio, de tal forma que impidan las vías de entrada del cerebro anterior al tallo cerebral. La fisostigmina y agonistas muscarínicos inducen inmediatamente un estado de SP, incluyendo también eventos fásicos (espigas PGOs y MORs) y tónicos (inhibición motora), mientras que la atropina produce el efecto contrario. Estas evidencias indican principalmente que el tallo cerebral es el

sitio importante de acción de este neurotransmisor en la generación de este estado.

En resumen, estos resultados claramente apoyan la participación de la ACh en la regulación y mantenimiento de la fase de sueño MOR. Asimismo, los resultados obtenidos por Hernández-Peón en 1963, dieron pauta a proponer su modelo del sistema de sueño, el cual fue integrado por la participación de ACh en diferentes estructuras cerebrales de la siguiente manera:

1-.) Un sistema de sueño, que consta de una porción corticofuga generada en regiones del sistema límbico, y una porción proveniente del tallo cerebral (FTG) y la médula espinal, las cuales, convergen en el AP. 2-.) Un sistema de vigilia cuyo principal contribuyente es el sistema reticular activador ascendente (SRAA). Aunque cabe mencionar que ambos sistemas colinoceptivos de sueño y vigilia, están topográficamente mezclados en el cerebro anterior medial y en el hipotálamo lateral.

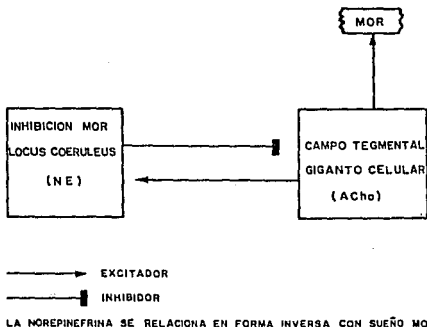
De tal forma que para la generación de sueño, tiene que inhibir activamente el sistema de sueño, vía el AP, al sistema de la vigilia ejerciendo su acción preferentemente sobre el tegmento mesencefálico (TM). Evidencias posteriores apoyan este modelo:

1-.) La estimulación local colinérgica del TM produce despertar (Morgane y cols, 1969).

2-.) La aplicación de microcristales de ACh, a varios niveles de la médula espinal generan sueño (Rojas-Ramírez y Drucker-Colín, 1973).

Estos resultados muestran la existencia, de un componente

HIPOTESIS DEL OCILADOR NEURAL (Hobson, 1975)



**Fig 7.** Modelo denominado de interacción recíproca que integra la teoría monoaminérgica y colinérgica del sueño. El cual relaciona la oscilación de dos poblaciones neuronales. Por un lado, las células localizadas en la FRP responsables de la generación de sueño MOR y por otro, las neuronas del LC y del rafé dorsal de naturaleza aminérgica, las cuáles, decrecen su actividad para permitir la activación de las células pontinas (Tomada de Salin-Pascual y Ortega-Soto, 1989).

ascendente de sueño que sale de los cuernos dorsales de la sustancia gris de la médula espinal, preferentemente a nivel cervical y llegan hasta el tallo cerebral y cerebro anterior generando SOL y SP.

Esta serie de evidencias inicialmente propuestas por Hernández-Peón, sirvieron como modelo para experimentos posteriores. De esta forma, Hobson y McCarley, en 1977, relacionaron la teoría monoaminérgica y colinérgica del sueño para proponer su modelo de interacción recíproca. El cual relaciona la oscilación de dos poblaciones neuronales. Por un lado, las células localizadas en la FRP responsables de la generación de sueño MOR que se sugieren sean colinérgicas y/o colinoceptivas y por otro, las neuronas del LC y del rafe dorsalis de naturaleza aminérgica, las cuales, decrecen su actividad para permitir la activación de las células pontinas. Este modelo sugiere la participación de varios grupos neuronales del tallo cerebral, así como de diversos neurotransmisores que son mediadores en estas áreas, para la generación de sueño MOR. Sin embargo existe la siguiente limitante que no apoya a este modelo:

1-.) Lesiones con ácido kainico del campo tegmental gigantocelular (FTG), no afectan los niveles basales de sueño MOR del gato. Sugiriendo que dicha estructura participa únicamente en la facilitación de sueño MOR, pero no en su generación (Drucker-Colín y Bernal-Pedraza, 1983). Sin embargo, Jones en 1979, demuestra que lesiones del FTG eliminan el sueño MOR.

Evidencias recientes sugieren que el sueño MOR es generado por una amplia distribución neuronal a lo largo del tallo

cerebral, más que por una estructura en particular (Vertes, 1984).

En resumen, la información descrita anteriormente apoya de manera sustancial la teoría colinérgica del sueño de Hernández-Peón. Recientemente, se ha visto que la acción de la ACh no parece depender exclusivamente de su función como neurotransmisor ya que su efecto inductor de sueño puede depender además de su capacidad para estimular otros sistemas, como el hormonal. Sobre este aspecto, se tienen las siguientes evidencias:

1-.) La hormona de crecimiento (HC), es una de las hormonas que se ha involucrado con la generación de sueño MOR (Takahashi, 1968), y su liberación ocurre principalmente durante el sueño delta, el cual ocurre al inicio la primera mitad del ciclo de sueño del humano (Sassin, 1969).

2-.) La administración de fármacos colinérgicos aumentan la liberación de la HC (Leveston y Cryer, 1980).

3-.) La administración de fármacos anticolinérgicos, tales como la metescopolamina (Mendelson y col., 1978); la atropina (Taylor y col., 1985) y la pirenzepina (Peters y col., 1986), reducen la liberación de la HC asociada al sueño delta en humanos.

En resumen, la ACh es el neurotransmisor cuya participación en el control del sueño MOR parece clara. Sin embargo, no es la única sustancia que está involucrada en la modulación de sueño MOR. Existen compuestos de naturaleza proteínica, las denominadas sustancias inductoras de sueño, que participan tanto en la modulación del sueño MOR, como del SOL.

#### D.-TEORIA DE LOS FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO.

Esta teoría surgió a principios de siglo, por Pieron en 1913. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 1.-) La PS a perros durante varios días produjo la acumulación de sustancias inductoras de sueño en el LCR de la cisterna magna, ya que cuando fue administrado a perros que habían dormido ad libitum indujo un estado de somnolencia. Esta evidencia sugirió la existencia de sustancias inductoras de sueño ó hipnotoxinas, la cuales se acumulaban durante la vigilia prolongada y eran las responsables de la aparición de sueño. A pesar de estos resultados, dicha teoría fue retomada de manera formal hasta la década de los 60"s, por diversos grupos de investigadores. A partir de entonces se ha postulado la existencia de sustancias ó factores inductores de naturaleza proteínica para el sueño lento y el sueño MOR, en el plasma, en el LCR, en la orina y en el cerebro.

#### FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO EXTRAIDOS DEL PLASMA

Monnier y col, en 1963, sugirieron la existencia de una sustancia inductora de sueño en el plasma de conejo. Su modelo experimental fue el siguiente: Utilizaron parejas de conejos que tenían circulación cruzada, mediante la anastomosis de las venas yugulares. Al conejo donador, además se le colocó un electrodo en los núcleos intralaminares del tálamo y se le estimuló eléctricamente. Dicha estimulación produjo sincronización del EEG, a lo que Monnier denominó "sueño delta ortodoxo", asimismo observaron que a los pocos minutos después de la estimulación el animal receptor se durmió. Este experimento sugirió, que el cerebro del animal estimulado liberó alguna sustancia

hipnógena, via el torrente circulatorio, la cual llegó al cerebro del animal receptor y produjo sueño. Por lo que, el siguiente objetivo fue entonces aislar el principio activo del plasma y comprobar su efecto en el sueño. Las evidencias experimentales encontradas fueron las siguientes:

1-.) El dializado obtenido de la sangre de un conejo dormido al administrarse por vía endovenosa (Monnier y Hosli, 1964; 1965) ó i.v.t inducía sueño en un conejo despierto (Monnier y Hatt, 1971).

2-.) El principio activo del dializado fue un nonapéptido (GLU-GLY-SER-ALA-ASP-GLY-GLY-ALA-TRP-NH<sub>2</sub>) con un peso molecular de 849 daltones, el cual cuando se administra en el 3er. ventrículo del conejo, induce SOL (Monnier y col, 1972).

Debido al efecto de este factor sobre el sueño delta se le denominó péptido inductor de sueño delta, cuyas siglas en inglés son DSIP (Delta Sleep Inducing Peptide).

3-.) El DSIP se encuentra en el cerebro de rata (Kastin y col, 1988), en el interior de neuronas serotoninérgicas, catecolaminérgicas y productoras de somatostatina (Ernst y Schoenenberger, 1988), así como en el suero (Kastin y col, 1978) y en el LCR de humanos (Kato y col, 1985).

4-.) A pesar de que existen estudios que no apoyan la participación del DSIP en la inducción de sueño (Tobler y Borbély, 1980; Mendelson y col., 1980), actualmente este péptido se utiliza con fines terapéuticos, para tratar de corregir disfunciones del sueño, tales como el insomnio y la narcolepsia sin que los resultados sean aún concluyentes (Schneider -Helmert,

1988).

Posteriormente, además de la existencia del DSIP en el plasma, se evidenció la existencia de otra sustancia inductora de sueño presente en el LCR.

**FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO EXTRAIDOS DEL LCR DE ANIMALES PRIVADOS DE SUEÑO.**

Pappenheimer y col en (1967), retomaron los experimentos de Pieron y propusieron la existencia de una sustancia inductora de sueño presente en el LCR de cabras PS. Su modelo experimental fue el siguiente: La PS estaba integrada por un sistema de alarmas y electrochoques que iniciaban su actividad cuando era detectado el relajamiento de la musculatura del animal. Mediante este sistema las cabras fueron PS por 24, 48 y 72 horas y posteriormente se les extrajo LCR. Después este LCR fue administrado i.p. a diferentes grupos de ratas. Los resultados mostraron que el LCR indujo sueño conforme más prolongado fue el tiempo de privación. Sin embargo, una limitante de este estudio fue que la evaluación de sueño en las ratas solo fue realizada de manera conductual, mediante el ciclo actividad-reposo. Este experimento sugirió que el LCR de animales privados de sueño contenía sustancias cuya principal actividad era la de inducir sueño y las cuales podían ser transferidas de una especie animal a otra. Debido a que esta sustancia o factor inducía sueño, Pappenheimer, le denominó factor S. El siguiente paso fue nuevamente, al igual que el grupo de Monnier, separar el principio activo del LCR y comprobar su efecto en el sueño. Las evidencias experimentales obtenidas fueron las siguientes:



1-.) Mediante cromatografía en Sefadex G-10, se sugirió que el factor S era un oligopéptido de menos de 500 daltones (Krueger, 1985 a).

2-.) El factor S induce sincronización del EEG acompañado de sueño conductual (FencI y col, 1971).

Esta línea de investigación fue continuada por Krueger y su grupo, quienes aportaron las siguientes evidencias:

1-.) El Factor S es un proteoglicano, el muramil dipéptido (MDP) (Krueger y col, 1985a), el cual se ha sugerido, es aportado a la economía del organismo por las bacterias del tracto digestivo.

2-.) El MDP, fue el mas potente de los péptidos muramil, para la inducción de SOL (Krueger y col, 1985 b). Sin embargo, el efecto producido por el MDP en el sueño no fue del todo claro debido a las siguientes limitantes:

a-.) La concentración del MDP fue 10 veces mayor que la concentración utilizada del factor S, para la producción de sueño (Krueger y col, 1985a).

b-.) El MDP aumentó el SOL a expensas de una reducción del sueño MOR, durante las 6 horas siguientes a su administración (Krueger y col, 1985 b).

c-.) Se ha sugerido que el aporte cotidiano del Factor S (MDP) para inducir el sueño cotidiano es suministrado por la flora natural del organismo; por lo que, en sujetos de edad avanzada, cuya flora está disminuida, deberían existir alteraciones del sueño. Esta hipótesis no esta completamente fundamentada, ya que a pesar de que la penicilina destruye la pared bacteriana y aumenta la disponibilidad de péptidos muramil, no aumenta la cantidad de sueño en ratas (Rojas Ramirez y col, 1977); mientras

que en los neonatos, cuya flora natural también es escasa, presentan una mayor cantidad de sueño durante la ontogenia (Roffwarg, 1966).

d-.) El efecto inductor de sueño del MDP es acompañado por un incremento en la temperatura corporal y estimula la respuesta inmune (Krueger y col, 1985). Pese a estas desventajas, estudios de microinyección del MDP en diversas regiones cerebrales, han sugerido que el sitio de acción del MDP está en el AP, hipotálamo y subtálamo (García-Arriaras y Pappenheimer, 1983).

Debido a las limitantes del factor S o MDP para la inducción de sueño y a los efectos producidos sobre la temperatura corporal, actualmente, Krueger y col, (1988), han postulado la teoría inmunológica para la regulación del ciclo sueño-vigilia, en la cual han involucrado a la interleucina-1 y al interferón-alfa 2 como factores inductores del SOL. Sin embargo, dichos factores, también son controversiales en su participación para la regulación del sueño.

Por otra parte, además de los factores inductores de sueño extraídos del plasma y LCR, se ha evidenciado la existencia de otra sustancia inductora de sueño presente en el tejido cerebral.

#### FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO EXTRAÍDOS DEL TEJIDO CEREBRAL

Estudios iniciales realizados por Drucker-Colin y col, en los años 70, hicieron evidente que la transferencia de perfusados extraídos de la FRM de gatos PS a la zona homóloga de gatos sin privación induce sueño.

Con base en estas evidencias, Nagasaky y cols, (1974); continuaron las investigaciones al respecto y reportaron las

siguientes resultados:

1-.) Extractos del tallo cerebral de ratas PS por 24 hrs, después de homogeneizarlos, dializarlos y liofilizarlos, promueve la aparición de SOL y de sueño MOR al inyectarlo i.p. a ratas normales. Debido a estos efectos le nombraron sustancia promotora de sueño (SPS) (Nagasaki y col, 1980).

2-.) La administración de la SPS en el tercer ventrículo induce un aumento de SOL en el periodo de obscuridad durante el primero y segundo día, pero no produce cambios durante los periodos de luz. Mientras, que el sueño MOR aumentó solo durante el periodo de obscuridad del 2o. día (Inoué y col. 1983).

3-.) Asimismo, la administración i.p. de la SPS induce SOL en ratones y también se observa un efecto tardío sobre el sueño MOR (Nagasaki y col. 1980).

4-.) La caracterización bioquímica de la SPS inicialmente hecha por Sefadex G-10 y cromatografía de capa delgada mostró que es una molécula de 500 daltones.

5-.) La SPS produce inhibición de la descarga espontánea del ganglio abdominal del cangrejo de río (acocil) (Nagasaki y col. 1976). Por lo que sugirieron que la SPS es una sustancia de índole proteínica con poderosas propiedades inhibitorias.

6-.) Recientemente, se han encontrado tres principios activos en el homogeneizado del tallo cerebral demostrando que uno de ellos es la Uridina y que es la más potente de los tres para inducir SOL.

De todas las sustancias inductoras de sueño citadas anteriormente, la SPS presenta una ventaja a diferencia del DSIP y del factor S, ya que es el primer factor inductor de sueño que

se obtiene de una región específica del parénquima cerebral, por lo que puede sugerirse su sitio de acción. Sin embargo, al igual que las otras, su efecto es preferencialmente sobre el SOL y casi sin ningún efecto sobre el sueño MOR.

Debido a que han sido propuestas diferentes sustancias para la regulación del ciclo sueño-vigilia, y en la mayoría de los casos el efecto de dichas sustancias más que inducir es facilitar la aparición de sueño, Jouvett en 1982, propuso los siguientes parámetros para identificar un factor inductor de sueño:

- 1.-) Ser una sustancia endógena, 2.-) aumentar durante la PS,
- 3.-) activar los mecanismos del sueño, 4.-) inducir un efecto que dependa estrechamente de la dosis, 5.-) su inactivación debe inducir insomnio, 6.-) su administración exógena debe incrementar el sueño en sujetos insomnes.

Sin embargo, la mayoría de estos parámetros no han sido investigados de manera profunda para dichas sustancias ó factores inductores de sueño, por lo que los resultados descritos anteriormente no son concluyentes y aún más el término de factores inductores de sueño resulta estar mal empleado, debido a que estas sustancias más que inducir, es facilitar la aparición del sueño, por lo que a la mayoría se han denominado factores facilitadores de sueño (Jouvett y col, 1976).

Finalmente, a lo largo, de esta revisión, sobre las diferentes sustancias inductoras de sueño, podemos concluir que a pesar de las evidencias experimentales, se desconoce la cinética y el mecanismo de acción de dichas sustancias. Sobre este punto, creemos que una sustancia de sueño puede actuar de manera

indirecta, sobre uno ó más substratos neuronales, que pueden ser parecidas funcionalmente para aumentar el sueño. Asimismo, es posible que tales redes pudieran actuar a través de un mecanismo de retroalimentación, donde la alteración de eventos conductuales y bioquímicos de estas células asociadas, afecten el sueño per se. Las numerosas sustancias bioquímicas y los tipos celulares involucrados en la regulación del sueño, nos ofrecen un cuadro teórico difícil, para tratar de explicar los mecanismos que subyacen al sueño, en el cuál múltiples variables fisiológicas pueden alterar este evento.

A pesar de estas limitantes, recientemente han sido propuestos los neuropéptidos como posibles factores inductores de sueño.

#### NEUROPROTEINAS Y SUEÑO

La relación de las proteínas y el sueño fué sugerida por Oswald, en 1969. El propuso que el rebote de sueño MOR que se presenta después de la administración crónica de fármacos neuroactivos refleja una fase de reparación neuronal que depende de proteínas cerebrales. Esta hipótesis sugirió que la reparación debería llevarse a cabo a base de proteínas, por lo que propuso que el rebote de sueño MOR debería acompañarse de un aumento en la síntesis de proteínas. Los siguientes estudios colaterales apoyan esta hipótesis:

- 1-.) La secreción de la HC, se libera en mayor cantidad en el humano durante la fase de sueño delta (Takahashi y col, 1968).
- 2-.) La PS delta en humanos disminuye la liberación de la HC (Karacan y col, 1971).
- 3-.) En niños con liberación deficiente de la HC, el sueño delta

no está afectado, pero sí el sueño MOR (Orr y col, 1977).

4-.) La administración de la HC a gatos (Stern y col, 1975), ratas (Drucker-Colin y col, 1975) y humanos (Mendelson y col, 1980) aumenta el sueño MOR sin afectar el SOL y dicho efecto fué dosis-dependiente.

En resumen y con base en estos antecedentes se sugirió que durante el sueño delta, en humanos, se activan mecanismos de los que depende la liberación de la HC, y que esta hormona activa mecanismos de los que depende el sueño MOR. Debido a que la HC es una hormona anabólica, se supuso que el mecanismo por el cual induce sueño MOR, es facilitando la síntesis de proteínas. El siguiente paso fué entonces determinar la participación de las proteínas en el sueño MOR. Sobre este aspecto destacan los trabajos realizados por Drucker-Colin y su grupo, cuyos aportes experimentales fueron los siguientes:

1-.) La administración de cicloheximida- un inhibidor de la síntesis de proteínas- a ratas produjo un rebote de sueño MOR después de la suspensión del fármaco (Stern y col, 1972).

2-.) Durante el ciclo sueño-vigilia del gato existen cambios en los niveles de proteínas de la FRM y el pico máximo de proteínas ocurre durante el sueño MOR (Drucker-Colin y col, 1975).

3-.) La caracterización bioquímica de los perfusados obtenidos de la FRM durante el sueño MOR contenían dos proteínas con un peso molecular de 75,000 y 45,000 daltones exclusivos de esta fase de sueño (Spanis y col, 1976).

4-.) Lesiones bilaterales en el área preóptica (AP), inducen una disminución de sueño, principalmente de sueño MOR y asimismo se

elimina la liberación de dichas proteínas (Drucker-Colin y Gutiérrez, 1976).

5-.) La administración de anticuerpos específicos para las proteínas de la FRM dentro de la zona homóloga de gatos normales, reducen de manera selectiva la cantidad de sueño MOR (Drucker-Colin, y col 1980).

6-.) Inhibidores de la síntesis de proteínas tales como el cloranfenicol (CAP) y la anisomicina, inhiben el sueño MOR sin afectar el SOL (Rojas-Ramírez y col, 1977).

7-.) Asimismo, el CAP también impide el rebote de sueño MOR que se observa después del tratamiento con anfetamina (Drucker-Colin y Benítez, 1977).

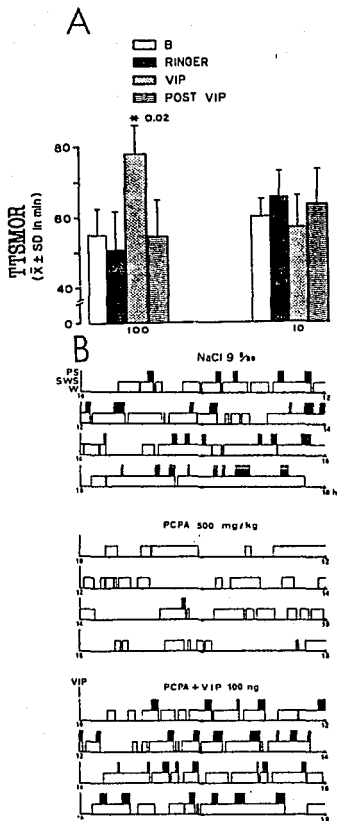
8-.) El rebote de sueño MOR posterior a la privación instrumental de sueño es abolido por la administración de CAP (Espejel, 1980).

A partir de estas evidencias, se postuló que las proteínas cerebrales están asociadas al sueño MOR. Sin embargo, aún se desconoce que proteína o familia de proteínas son las responsables de este evento. No obstante, recientemente, han sido propuestos los neuropéptidos como posibles factores inductores de sueño.

#### NEUROPEPTIDOS Y SUEÑO

En 1982, Riou y col, realizaron una serie de estudios para determinar la participación de algunos neuropéptidos sobre el ciclo sueño-vigilia de la rata. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1-.) La administración de la angiotensina II, renina, sustancia P y de la arginina-vasotocina en ratas normales, disminuyen el



**Fig. 8** En el panel A, se ilustra el efecto de 100 y 10 ng de VIP en el sueño MOR de gatos y en el panel B el efecto de 100 ng de VIP sobre el insomnio inducido por la PCPA en ratas. En ambas situaciones, se observa un incremento en la cantidad de sueño MOR inducido por los 100 ng de VIP (A, Tomada de Drucker-Colin y col, 1984; y B de Riou y col, 1982).



sueño MOR, a expensas de un aumento en el SOL, excepto por la sustancia P que aumenta la vigilia (Riou y col, 1982 a).

2-.) La administración de la neurotensina, met y leu encefalina y de la colecistocinina-octapéptido (CCK-8) no modifican el ciclo sueño-vigilia de ratas normales (Riou y col, 1982 b).

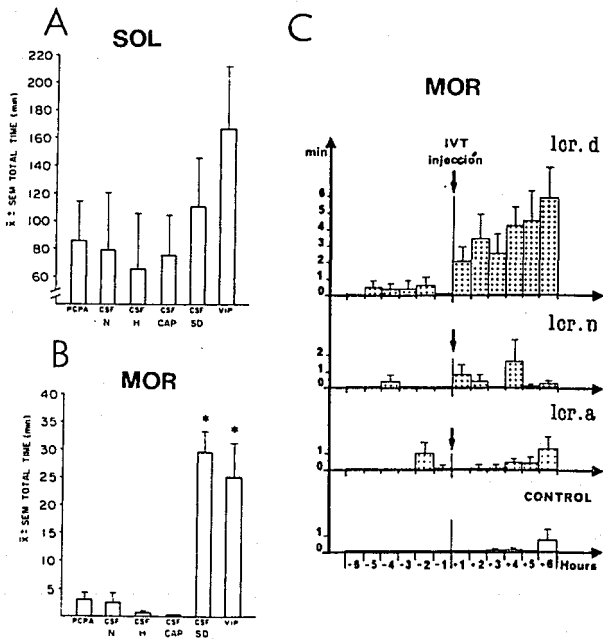
3-.) La administración i.v.t. del polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), aumenta significativamente el sueño MOR sin inducir SOL, en ratas normales e insomnes pretratadas con PCPA (Riou y col, 1982 c).

A partir de estos trabajos, se determinó que el VIP fué el único neuropéptido que incrementó la fase de sueño MOR. Posteriormente, se demostró que el VIP produce el mismo efecto en gatos (Drucker-Colín y col, 1984) y en conejos normales (Obál y col, 1989) y que su efecto inductor de sueño no depende de cambios en la temperatura cerebral (Obál, 1986 a). Además, Kruisbrink y col, 1987; demostraron que la administración constante de VIP (200 ng/ día) en ratas, incrementa la cantidad de sueño MOR de manera significativa durante el período de luz y el de oscuridad. Asimismo, se hizo evidente que el VIP presenta un efecto inductor de sueño MOR más potente que el factor liberador de la HC y que la CCK-8, en ratas normales (Obál Jr, 1986 b).

Poco después, el estudio de los efectos del VIP en el sueño son abordados con otra perspectiva.

#### LCR DE ANIMALES PS Y NEUROPEPTIDOS

Esta línea de investigación se deriva de las observaciones iniciadas por Pieron, el cuál postuló que el LCR de animales PS,



**Fig. 9** Efecto inductor de sueño del LCR de gatos privados de sueño (PS) sobre el insomnio inducido por la PCPA. Como se muestra en el Panel B y C, la administración de LCR de gatos PS incrementa en forma notable la cantidad de sueño MOR, desde las primeras horas, sin efectos importantes sobre el sueño de ondas lentas (SOL), como se muestra en el panel A. Asimismo, el Panel B, ilustra un efecto similar producido por el VIP. (A y B Tomada de Prospero-García y col, 1986; C de Sallanon y col, 1982).

contenía sustancias inductoras de sueño en animales normales. Esta idea fué retomada recientemente con un nuevo enfoque, la posible participación de los neuropéptidos en el efecto inductor del LCR de animales PS. Los trabajos que sustentan esta hipótesis son los siguientes:

- 1-) La administración de LCR de gatos PS por el método del tanque, induce sueño MOR en animales insomnes por la administración de PCPA (Sallanon y col, 1982; Próspero-García y col, 1986).
- 2-) El efecto inductor de sueño MOR del LCR de animales PS, también es observado en ratas insomnes por propranolol y adicionalmente demuestran que el LCR de animales PS por 72 horas es más potente que el de 24 ó 48 horas (Adrien y Dugovic, 1984).
- 3-) La PS en gatos y el tratamiento simultáneo con PCPA, impide el rebote de SOL, pero no el de sueño MOR posterior a la PS (Sallanon y col, 1983). Sin embargo, si estos animales insomnes son adicionalmente tratados con cloranfenicol, la administración del 5-HTP o la 5-HT inducen SOL pero no sueño MOR (Petitjean y col, 1985).
- 4-) El efecto inductor de sueño del LCR de animales PS, es abolido si previamente el LCR PS se calienta a 94-C durante 15 min ó bien si los animales PS son simultáneamente tratados con cloranfenicol (Prospéro-García, y col, 1986).
- 5-) El VIP a dosis de 200 ng y el LCR de gatos PS restituyen el insomnio producido por la PCPA en gatos, incrementando la cantidad de sueño MOR, específicamente la frecuencia (Prospéro-García, 1986).

Estas series de experimentos, apoyaron la idea de que en el

LCR se acumula material hipnógeno durante la PS de posible naturaleza proteínica y sugirió la posibilidad de que ambos factores fueran los mecanismos responsables de la generación de sueño MOR. Posteriormente, Drucker-Colín y col, en 1988 demostraron que la incubación del LCR de gatos PS con anticuerpos anti-VIP inhiben el efecto inductor de sueño del mismo. Estas evidencias sugirieron que el VIP o una molécula inmunológicamente parecida podrían ser el factor inductor de sueño MOR del LCR.

En la siguiente sección revisaremos brevemente algunos aspectos funcionales del VIP.

#### EL POLIPEPTIDO VASOACTIVO INTESTINAL (VIP).

El VIP es un polipéptido de 28 aminoácidos con un peso molecular de 3326. Su secuencia de aminoácidos es la siguiente: HIS-SER-ASP-ALA-VAL-PHE-THR-ASP-ASN-TYR-THR-ARG-LEU-ARG-LYS-GLN-MET-ALA-VAL-LYS-LYS-TYR-LEU-ASN-SER-ILE-LEU-ASN(NH<sub>2</sub>). Inicialmente este péptido fué localizado en el duodeno (Said y Mutt, 1970), pero ahora se conoce que existe en el sistema nervioso central (SNC) (Carlquist y col, 1982) y en el sistema nervioso periférico (SNP) (Larsson y col, 1976). La amplia distribución del VIP es correlacionada con una amplia variedad de actividades biológicas incluyendo vasodilatación sistémica, incremento de la actividad cardíaca, broncodilatación, hiperglicemia, relajación del músculo liso, algunos efectos diferenciales en procesos secretorios del tracto gastrointestinal y en la motilidad gástrica, induce glicogénesis en hígado y en corteza cerebral, potencia la conducta sexual e incrementa la cantidad de sueño MOR en animales

normales e insomnes pre-tratados con PCPA (Gozes y Breneman, 1989; Magistretti, 1990).

El VIP muestra similitudes estructurales con otras hormonas gastrointestinales, tales como la secretina, el glucagon, el péptido inhibitorio gástrico, el péptido histidina isoleucina (PHI) y el factor liberador de la HC, por lo que pertenece a una familia de péptidos, a la cuál le han denominado grupo secretina-glucagon (Mutt, 1988). De todos estos péptidos, se ha demostrado que el VIP muestra el mayor grado de homología en la secuencia de aminoácidos con la helodermina, un péptido con el que comparte 15 residuos de aminoácidos en la misma posición (Magistretti, 1990).

Mediante estudios de inmunoreactividad y de unión específica se ha demostrado que el VIP se localiza en las siguientes estructuras cerebrales, presentando un gradiente de concentración en el cerebro de diferentes mamíferos.

1.-) Las mayores concentraciones de VIP se localizan en la corteza cerebral (Cx) en una población homogénea de interneuronas bipolares, radialmente orientadas y en diferentes estructuras del cerebro anterior basal: el septum, estria medularis, amígdala, núcleo acumbens, hipotálamo, hipocampo, cuerpo estriado y el NSQ (Said y Rosenberg, 1976; Giachetti y col, 1977; Besson y col, 1979; Said and Rosenberg, 1972). De todas estas estructuras, el NSQ es el que presenta las mayores concentraciones de síntesis de VIP en el SNC (Card, y col, 1988).

2.-) Concentraciones moderadas (1 ng/mg de proteína) de VIP han sido localizadas en los núcleos hipotálamicos peri y

paraventriculares (Eiden y col, 1982), en la sustancia gris periacueductal y estructuras ventrales al 4- ventrículo (Obata-Tsuto y col, 1983; Wang y col, 1983; Besson y col, 1979).

3-.) Concentraciones bajas (0.8ng/mg de proteína) están localizadas en el área postrema, RD, LC y el núcleo tegmental dorsal (Sutin y Jacobowitz, 1988).

3-.) El VIP también se localiza en estructuras periventriculares (Besson y col, 1979) y en el LCR de gatos (Wang y col, 1983), ratas (Kaji y col, 1983), perro, mono (Ebeid y col, 1978) y humanos (Ebeid y col, 1979; Fahrenkrug y col, 1977).

Estos resultados señalan que el VIP presenta una distribución regional discreta y que su concentración varía de acuerdo a la estructura cerebral, aunque las mayores concentraciones se localizan en el cerebro anterior. Por otra parte, se ha demostrado que existen variaciones ontogenéticas de la concentración de VIP en el cerebro de la rata. De esta forma se ha visto, que el feto de 16 días de gestación no tiene VIP. Sin embargo, el neonato que lleva horas de nacido ya presenta VIP en diversas áreas del cerebro que incluyen: el hipotálamo, el tallo y la Cx, entre otras. A los 42 días postnatal, la concentración del VIP se estabiliza y se encuentra en las mismas concentraciones en el adulto. Esto no ocurre así en el duodeno, ya que en esta estructura sigue aumentando su concentración aún en el adulto (Emson y col, 1979).

Las concentraciones de VIP en el adulto disminuyen de acuerdo con la edad. De esta manera se ha observado, mediante estudios de inmunocitoquímica, que existe un decremento del 36% de neuronas VIPérgicas en el NS de ratas viejas en relación con

ratas jóvenes. Sin embargo, en las ratas viejas el tamaño promedio de estas neuronas aumenta, lo que sugiere un proceso compensatorio en la disminución del número de dichas neuronas (Chee, y col, 1988). Asimismo, el NS está involucrado en regular los ciclos de luz medioambientales, actuando como un reloj circádico responsable de la orquestación de los ritmos circadianos endógenos (Van den Powley, 1979), lo que sugiere una estrecha relación funcional entre este péptido y dicho substrato neuronal. En este sentido, se ha demostrado que las concentraciones del VIP en el NS dependen de las condiciones de luz-obscuridad, ya que cuando los animales son expuestos a condiciones constantes de luz la concentración de VIP disminuye. Estos resultados sugieren que las neuronas que contienen VIP en el NS están involucradas en mediar la información fótica dentro de este núcleo. Por otra parte, se sabe que la expresión del ácido desoxirribonucleico (RNA) mensajero para VIP (VIP-mRNA) en la rata, disminuye durante el periodo de luz y aumenta durante el periodo oscuro (Gozes y col, 1989). Estos resultados sugieren que la maquinaria de síntesis para VIP ocurre durante el periodo oscuro, fase durante la cuál se presenta el periodo de actividad ó de vigilia en la rata y en consecuencia durante el periodo de luz el VIP sintetizado es utilizado cuando el animal duerme, bajo condiciones normales. Posiblemente, estos resultados sugieren que el NS es una estructura importante para mediar el efecto inductor de sueño del VIP.

La liberación de VIP puede provocarse a través de estímulos despolarizantes en cortes neocorticales de una manera dependiente

de Ca<sup>+</sup>. El K<sup>+</sup> también produce una liberación de VIP y esta liberación es insensible a bloqueadores de canales de Ca<sup>+</sup>, tales como las dihidropiridinas. El VIP también puede ser liberado por la 4-aminopiridina. Dicha liberación es de naturaleza transináptica, dado que es sensible a la tetrodotoxina, aún más este involucra la formación de metabolitos de ácido araquidónico vía lipoxigenasa, dado que este efecto es decrementado por inhibidores de la lipoxigenasa. Estas observaciones sugieren que la 4-aminopiridina provoca la liberación de uno ó más neurotransmisores, el cuál en turno modula la liberación de VIP vía la cascada de ácido araquidónico (Magistretti, 1990).

Por otra parte, estudios in vivo en la neocorteza del gato indican que la liberación de VIP es realizada bajo el control de varios sistemas de neurotransmisores. El GABA y la NA (vía los alfa-2 adrenoceptores) inhiben su liberación, mientras que agonistas colinérgicos y el glutamato estimulan la liberación de VIP (Harty y col, 1986).

En cuanto a la presencia de receptores, se ha demostrado que en el cerebro anterior de la rata, existe una alta densidad de receptores en la neocorteza, en las capas I, II, IV y VI (Staum-Olsen y col, 1982), en el bulbo olfatorio, en el giro dentado, subculiculum, el NS, el supraóptico y en el dorsomedial; mientras que en el hipotálamo existe una moderada densidad (De Souza y col, 1985; Besson, 1988). En el tallo cerebral, Martín y col, en 1989; demostraron que las mayores densidades de receptores se distribuyen preferencialmente en el LC, área postrema y en los órganos subcomisurales y en la capa subependimal de los ventrículos. Estos resultados, evidencian que



la mayor cantidad de receptores para VIP se distribuyen preferencialmente en el diencéfalo y por otra parte sugieren que es muy probable que el VIP participe en la homeostasis del LCR y en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debido a su distribución (Magistretti, 1990).

Asimismo se ha demostrado, que el principal segundo mensajero activado por la ocupación del receptor para VIP en diversas regiones cerebrales es la proteína G mediada por la adenilato ciclasa, lo que produce un incremento en los niveles de AMPc (Quick y col, 1978). La formación de AMPc estimulado por el VIP ha sido mostrado en varias especies y parece estar sujeto a la modulación de otros neurotransmisores corticales. A su vez, el GTP y sus análogos inhiben el pegado al receptor de VIP y potencian la síntesis de AMPc en respuesta al VIP.

Por otra parte, el VIP aparte de tener sus propias neuronas que lo liberan, interacciona y coexiste con diversos neurotransmisores, tales como la ACh, NE y 5-HT, principalmente.

#### **INTERACCION VIP - ACh.**

En el caso de la ACh, se ha mostrado que el VIP coexiste con la ACh ( > 80 % de co-localización) en la CX cerebral de la rata (Peters y Harriman, 1988). Asimismo, el VIP aparentemente facilita la actividad de la ACh para liberar saliva de la glándula submaxilar del gato (Lundberg y col., 1982) ó catecolaminas (Malhotra y col., 1988) de la médula suprarrenal, para despolarizar neuronas del ganglio vesical de gato (Kawatani y col., 1985) y del ganglio mesentérico de cobayo (Mo y Dun, 1984). Aún más, el VIP aumenta la actividad de la CAT,

sugiriendo que facilita la síntesis de ACh, en el hipotálamo y el hipocampo (Luine y col., 1984). El VIP también está presente en estructuras donde se localizan neuronas inmunoreactivas para colina acetil transferasa, tales como el hipocampo, así como en áreas del tallo cerebral que reciben proyecciones del sistema tegmental mesopontino (Woolf and Butcher, 1989). También aumenta la unión de ACh a los receptores muscarínicos (Lundberg y col., 1982) y modula la liberación (Lundberg, 1981) y el recambio (Eva y col., 1985) de ACh. Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que agonistas colinérgicos y el glutamato estimulan la liberación de VIP en la neocorteza del gato (Wang y col, 1986). En forma correspondiente, la ACh facilita la liberación de VIP al LCR de una manera dependiente de la dosis (Kaji y col., 1983). Estos hallazgos sugieren una estrecha relación, entre la ACh y el VIP.

#### **INTERACCION VIP-5-HT.**

Por otra parte, se ha demostrado que el VIP también coexiste con 5-HT en el AS (Héry y col, 1986). El VIP incrementa la liberación y síntesis de 5-HT en el AS, su acción resulta parcialmente de una inhibición en la recaptura de 5-HT. Asimismo, Rostene y col. (1984) demuestran que en cortes de hipocampo el VIP incrementa el número de receptores de 5-HT-1.

#### **INTERACCION VIP - NE.**

Asimismo, se ha evidenciado que el VIP también coexiste con la NE en la CX cerebral de ratas (Magistretti y Schorderet, 1984).

En conclusión podemos sugerir que el sueño está modulado por

un sistema complejo, altamente organizado. Las evidencias anteriormente mencionadas sugieren, que el sueño puede estar facilitado por un sistema hormonal cuya oscilación actividad-inactividad depende de estructuras que regulan los ritmos circádicos. Dicha actividad a su vez también facilitaría la síntesis de neuropéptidos, que actuarían como factores inductores y que permiten que se presente el SOL o sueño MOR. Estos probablemente inciden sobre la actividad de sistemas de neurotransmisores, los que se encargan de incrementar la fase. En particular, creemos que el VIP es un neuropeptido con propiedades inductoras de sueño MOR, y que su mecanismo de acción para la inducción de sueño depende probablemente de su capacidad para estimular cascadas de eventos secundarios y en consecuencia se presente el sueño.

#### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Como hemos mencionado anteriormente, existen trabajos que reportan que posterior a la PS durante la fase de recuperación, ocurre un rebote de sueño en la rata, gato y humano. Asimismo, la administración de LCR de animales PS, induce sueño en animales normales (Pieron 1914; Pappenheimer, 1968); ó bien revierte parcialmente el insomnio farmacológico inducido por la PCPA (Sallanon y col, 1982, Prospéro-García y col, 1986) y el propranolol (Adrien y Dugovic, 1984). Sin embargo, hasta el momento, se desconocía el efecto de la extracción de LCR sobre los parámetros de sueño del mismo animal donador. Por lo que el objetivo del experimento 1 fué, determinar el efecto de la

extracción de LCR de gatos PS por 24, 48 y 72 horas sobre el rebote de sueño MOR.

Por otra parte, el VIP ha sido propuesto como una sustancia inductora de sueño, ya que induce sueño MOR en gatos normales (Drucker-Colín y col, 1984) y en gatos y ratas insomnes por PCPA (Riou y col, 1982, Prospero-García y col, 1986). Recientemente, se ha sugerido que el VIP ó una sustancia parecida al VIP podrían ser uno de los principios activos del LCR de animales PS para la inducción de sueño MOR (Drucker-Colín y col, 1988). Sin embargo, hasta el momento se desconocía si la concentración de este neuropéptido en el LCR dependía del tiempo de privación. Por lo que, en el experimento 2 decidimos determinar la concentración del VIP mediante la técnica de RIA en el LCR de gatos PS por 24, 48 y 72 horas.

#### IV- MATERIALES Y METODOS

##### **EXPERIMENTO 1:**

Se utilizaron gatos de ambos sexos (2.5-3.5 kg), los cuales fueron implantados bajo anestesia con pentobarbital sódico para registros convencionales de sueño, mediante cirugía estereotáxica. En estas condiciones, se colocaron electrodos bipolares en los huesos parietales para registro del EEG y en el canto externo de los ojos para registro de los movimientos oculares (EOG), así como electrodos de alambre insertados en los músculos de la nuca para registro del EMG y de electrodos tripolares colocados en ambos cuerpos geniculados laterales para el registro de las ondas PGOs. Todos los electrodos fueron soldados a un conector y fijados con cemento dental. Adicionalmente, se colocó una cánula de acero inoxidable calibre 21 en el IV ventrículo. Las coordenadas fueron: P 4 mm; L 0 mm, V -2.5 mm. Su colocación fué verificada a través de la extracción de LCR con una microjeringa Hamilton. En este lugar, la cánula fué fijada con cemento dental. Finalmente, se colocó un mandril dentro de la cánula para evitar la salida de LCR y se administró penicilina por vía i.m. para prevenir infecciones, así como solución salina fisiológica para rehidratar al animal. Después de la cirugía, todos los animales se dejaron recuperar durante un período mínimo de una semana. Posteriormente, los animales fueron divididos en 8 grupos (n=7 por grupo) bajo las siguientes condiciones (ver diseño experimental 1): Grupo 1: Animales en condiciones control (CCON) sin ninguna manipulación y sin PS, Grupos 3, 4 y 5 PS por el método del tanque durante 24, 48 y 72

# DISEÑO EXPERIMENTAL 1

## CONTROL



- PS 24 HRS
- PS 48 HRS
- PS 72 HRS

SIN EXT DE LCR

CON EXT DE LCR

PS 24 HRS [ ]

PS 24 HRS [ ]

PS 48 HRS [ ]

PS 48 HRS [ ]

PS 72 HRS [ ]

PS 72 HRS [ ]

[ 8 AM REGISTRO 8 PM ]

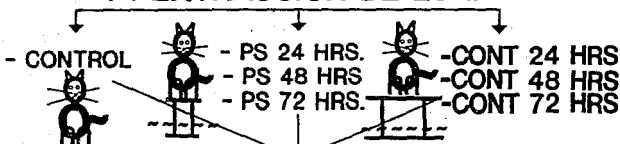
horas, respectivamente, sin extracción de LCR. El método del tanque ó de la isla priva selectivamente de sueño MOR y de SOLII y consiste en colocar al gato sobre un pedestal cuadrado, de 11 cm por lado y 20 cm de alto. El pedestal está colocado dentro de un tanque que tiene un nivel de agua de 5 cm, por lo que cuando el animal pasa del estado de vigilia al de sueño hay pérdida del tono muscular y en consecuencia el animal cae al agua, se reincorpora a la plataforma y de esta manera permanece despierto. Por otra parte, el grupo 2 mantenido en CCON y los grupos 6, 7 y 8 que fueron PS por 24, 48 y 72 horas, después de los respectivos periodos de privación se les extrajeron 100 ul de LCR del IV ventrículo, con un rango de extracción de 20-30 ul x min. El volumen extraído fué reemplazado por LCR artificial (Sallanon y col, 1982), inmediatamente después de la extracción de LCR. Por último, el grupo 9 (n=4) fué mantenido en CCON de PS mediante una plataforma grande de 60 cm por lado x 20 cm de alto dentro del tanque, de tal forma que los animales pudieran dormir pero que estuvieran bajo las mismas condiciones de estres de los animales PS.

Al final de estas manipulaciones los animales fueron registrados poligráficamente durante 12 horas continuas. Los registros de sueño obtenidos, fueron calificados de manera visual basados en los criterios estandarizados (Ursin y Sterman, 1981) y los resultados fueron analizados cuantificando el tiempo total en minutos de la vigilia, SOL I y II y sueño MOR, así como de la frecuencia y la duración promedio de los periodos de sueño MOR.

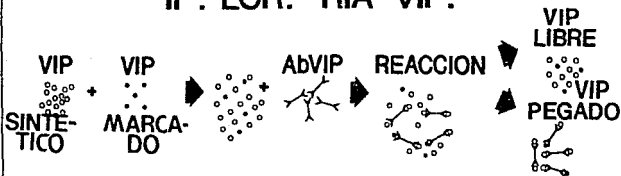
# DISEÑO EXPERIMENTAL

## I-. EXTRACCION DE LCR.

2a



## II-. LCR: RIA-VIP.





## EXPERIMENTO 2:

Para este experimento, se implantaron a los gatos mediante cirugía estereotáxica con una cánula en el IV ventrículo, tal y como se mencionó anteriormente. Después de una semana de recuperación, los animales fueron divididos en 7 grupos (n=10 por grupo) bajo las siguientes condiciones (ver diseño experimental 2): Grupo 1, bajo CCON, grupos 2, 3 y 4 bajo PS por el método del tanque durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente y los grupos 5, 6 y 7 bajo CCON con PG (de 60 cm por lado y 20 cm de alto). Inmediatamente después de la PS ó de las CCON, se les extrajeron de 200-400 ul de LCR por animal, con un rango de extracción de 20-30 ul x min con la ayuda de una microjeringa Hamilton. Posteriormente, estas muestras de LCR fueron procesadas por radioinmunoensayo para determinar las concentraciones de VIP.

## RADIOINMUNOENSAYO PARA VIP:

Las muestras de LCR obtenidas, fueron tratados con Trasilol (un inhibidor de proteasas, de SIGMA) el cual fué adicionado en los viales antes de la recolección de LCR a una concentración de 2,500 KIU/5mL y a una temperatura de 0-5°C, para evitar la degradación de VIP. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -15° C.

El RIA para VIP fué realizado con un estuche comercial de INCSTAR (catálogo # 39125), a una temperatura de 0-5°C (ver diseño experimental 2).

Para la construcción de la curva patrón se utilizaron concentraciones crecientes de VIP de 20, 50, 100, 200 y 468 pg/ml. El volúmen de las muestras problemas fueron de 200 ul y

adicionalmente se les agregó 10 ul de una solución de VIP con una concentración de 20 pg/tubo. A todos los tubos excepto a los del pegado inespecífico, se les agregaron 100 ul de anticuerpo anti-VIP hecho en conejo, seguido de una primera incubación de 24 horas. Posteriormente, se adicionaron 100 ul de VIP marcado con  $^{125}$  y continuó una segunda incubación de 24 horas. Después se les agregó 1 ml de solución salina al 0.85% y 500 ul de un segundo anticuerpo denominado complejo precipitante (GAR-PPT), seguido de una tercera incubación de 2 horas. Inmediatamente después, los tubos fueron centrifugados a 760 x g durante 20 minutos, y al final fueron decantados. Finalmente, se utilizó un contador gamma (Abbott Laboratories) para cuantificar las CPM de cada uno de los tubos durante 5 min. Después, a cada valor calculado se le restó la concentración agregada de VIP durante el ensayo, para conocer la concentración real de cada una de las muestras. Esta variante en la metodología, fué realizada para determinar la concentración de VIP de las muestras problemas, debido a que en los ensayos anteriores la concentración de VIP de las muestras de LCR caían en los límites de sensibilidad de 20 pg de la curva patrón.

Al final, los resultados obtenidos del experimento 1 y 2 fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) para corroborar las significancias y posteriormente se realizó una prueba de Fisher ( $p < 0.01$ ) para determinar que grupos contribuían a la diferencia.

#### IV- RESULTADOS

##### EXPERIMENTO 1

##### A-.) EFECTO DE LA PS SOBRE EL REBOTE DE SUEÑO.

Los resultados mostraron que después de la PS por 24, 48 y 72 horas, durante la fase de recuperación, se produjo un rebote significativo en el tiempo total de sueño MOR (TTSMOR), en relación con el grupo control y los grupos PS con extracción de LCR ( $p < 0.01$ ). Dicho incremento en el TTSMOR fue proporcional al tiempo de privación (ver Fig 1 y Tabla I). Asimismo, el rebote de sueño MOR fue dado a partir de un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en la duración de los periodos de sueño MOR, el cual también fue proporcional al tiempo de privación (ver figura 2)

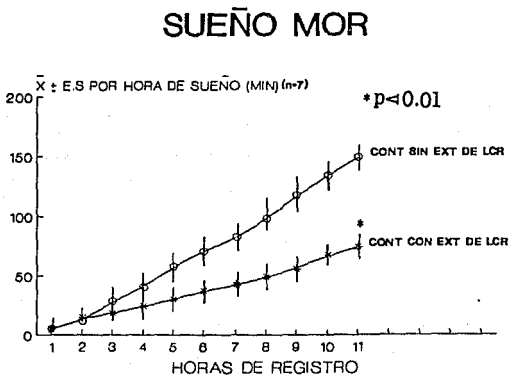
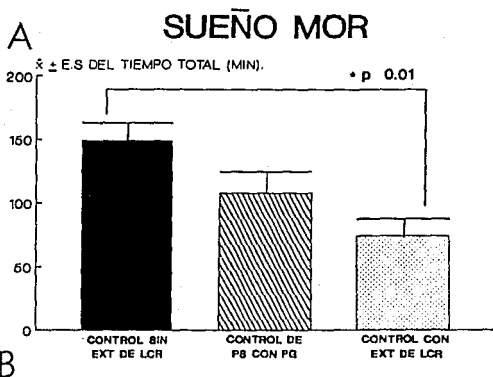
##### B-.) EFECTO DE LA EXTRACCION DE 100 ul DE LCR DESPUES DE LA PRIVACION DE SUEÑO MOR.

El rebote de sueño MOR observado en todos los grupos PS fué significativamente disminuido con la sola extracción de 100 ul de LCR ( $p < 0.01$ , ver fig 1). Aunque de manera más notable en el grupo PS por 24 horas, donde el TTSMOR fué casi igual a los valores controles. Estos cambios fueron observados desde las primeras horas y a lo largo de las 12 horas de registro (ver figura 2). Con respecto a las otras fases de sueño (vigilia, SOL I y II), de los grupos PS más extracción de LCR, no hubo cambios significativos importantes. Sólo dos grupos mostraron diferencias significativas. El grupo PS por 48 horas mostró cambios significativos en las fases de SOL I y II, con los grupos PS por

TABLA I.  $\bar{X} \pm E.S.$  DEL EFECTO DE LA EXTRACCION DE LCR SOBRE EL CICLO SUEÑO VIGILIA DE GATOS PRIVADOS DE SUEÑO (n=7)

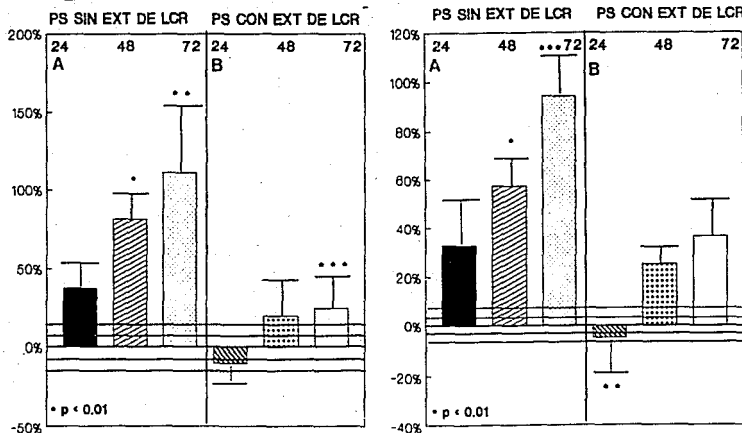
FASES DE SUEÑO GRUPOS	TIEMPO TOTAL DE VIGILIA (min)	TIEMPO TOTAL DE SOL I (min)	TIEMPO TOTAL DE SOL II (min)	TIEMPO TOTAL DE SUEÑO MOR (min)	DURACION DE SUEÑO MOR (min)	FRECUENCIA DE SUEÑO MOR (min)	LATENCIA DE SUEÑO MOR (min)
CONTROL	119.7 $\pm$ 14.2	125.5 $\pm$ 33.8	265.5 $\pm$ 26.4	149.0 $\pm$ 12.6	5.5 $\pm$ 0.6 <sup>+</sup>	28.2 $\pm$ 3.3	53.6 $\pm$ 13.8
CONT + EXT DE LCR	137.6 $\pm$ 26.8	217.2 $\pm$ 31.2	225.0 $\pm$ 25.3	74.0 $\pm$ 14.0 <sup>66</sup>	3.6 $\pm$ 0.4 <sup>++</sup>	20.0 $\pm$ 1.8	60.3 $\pm$ 16.8 <sup>//</sup>
PS X 24 HRS	139.0 $\pm$ 34.8	72.0 $\pm$ 20.6	223.8 $\pm$ 29.3	182.2 $\pm$ 22.6	7.3 $\pm$ 1.0	26.8 $\pm$ 3.8	40.6 $\pm$ 9.4
PS X 24 HRS + EXT DE LCR	159.5 $\pm$ 39.0	136.8 $\pm$ 21.0	227.0 $\pm$ 32.2	134.1 $\pm$ 19.4	5.2 $\pm$ 0.8 <sup>/</sup>	26.4 $\pm$ 2.8	41.3 $\pm$ 9.0
PS X 48 HRS	146.0 $\pm$ 37.2	56.7 $\pm$ 9.3 <sup>**</sup>	172.4 $\pm$ 26.7 <sup>***</sup>	236.3 $\pm$ 30.0 <sup>*</sup>	9.1 $\pm$ 0.7	26.8 $\pm$ 3.8	27.6 $\pm$ 6.8
PS X 48 HRS + EXT DE LCR	107.1 $\pm$ 23.1	75.0 $\pm$ 13.4	299.7 $\pm$ 37.5	178.1 $\pm$ 26.0	7.0 $\pm$ 1.0	25.8 $\pm$ 1.4	42.1 $\pm$ 14.0
PS X 72 HRS	91.5 $\pm$ 21.0	67.7 $\pm$ 18.1	206.2 $\pm$ 27.0	298.4 $\pm$ 16.1 <sup>**</sup>	10.7 $\pm$ 0.8 <sup>+++</sup>	28.1 $\pm$ 1.7	20.5 $\pm$ 4.4
PS X 72 HRS + EXT DE LCR	110.1 $\pm$ 15.5	97.8 $\pm$ 25.3	260.7 $\pm$ 24.5	190.4 $\pm$ 26.5 <sup>***</sup>	7.6 $\pm$ 1.1	26.0 $\pm$ 2.8	29.7 $\pm$ 8.8

- \* p < 0.01 CONT + EXT DE LCR VS TODOS LOS GRUPOS
- \*\* p < 0.01 PS X 48 HRS VS PS X 24 HRS + EXT DE LCR
- \*\*\* p < 0.01 PS X 48 HRS VS PS X 48 HRS + EXT DE LCR
- \* p < 0.01 PS X 48 HRS VS CONTROL, CONT + EXT DE LCR Y PS X 24 HRS + EXT DE LCR
- \*\* p < 0.01 PS X 72 HRS VS TODOS LOS GRUPOS
- \*\*\* p < 0.01 PS X 72 HRS + EXT DE LCR VS CONT + EXT DE LCR
- + p < 0.01 CONTROL VS PS X 48 HRS Y PS X 72 HRS
- ++ p < 0.01 CONT + EXT DE LCR VS TODOS LOS GRUPOS
- +++ p < 0.01 PS X 72 HRS VS TODOS LOS GRUPOS PERO N.S. VS PS X 48 HRS
- / p < 0.01 PS X 24 HRS + EXT DE LCR VS PS X 48 HRS Y PS X 72 HRS
- // p < 0.01 CONT + EXT DE LCR VS PS X 72 HRS.
- 66 p < 0.01 CONT + EXT DE LCR VS TODOS LOS GRUPOS



**Fig 1.** Fig 1A: Efecto de la extracción de LCR en animales controles y control de PS por 24 h mediante plataforma grande. Fig 1B: Analisis acumulativo por hora de sueño MOR de animales controles con y sin extracción de LCR. Como se ilustra la extracción de LCR produce una disminución significativa en el tiempo total de sueño MOR.

# 1 SUEÑO MOR      2 DURACION DE SUEÑO MOR



**Fig 2** Efecto de la PS y de la PS más la extracción de LCR, sobre el rebote de sueño MOR. La gráfica 1 representa el tiempo total y la 2 la duración de los periodos de sueño. En los paneles A se representa el rebote de sueño MOR sin ext de LCR durante 24, 48 y 72 h, y en los paneles B el rebote de sueño con ext de LCR. Las x de los grupos experimentales son presentadas como % de cambio con respecto al grupo control sin ext de LCR. Las líneas horizontales representan el error estandar del grupo control sin ext de LCR. Como se ilustra, la PS produce un rebote de sueño MOR, el cual es proporcional al tiempo de privación e incrementa de manera selectiva la duración. En contraparte la ext de LCR impide el rebote de sueño MOR.

# SUEÑO MOR

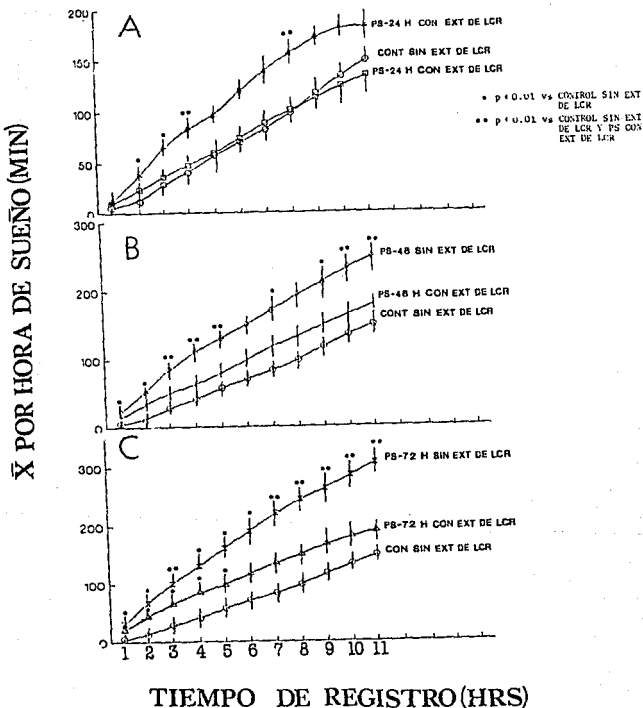


Fig 3. Efecto de la PS y de la PS más la extracción de LCR sobre el rebote de sueño MOR. Cada punto representa el promedio del análisis acumulativo por hora de sueño MOR. En el panel A se representa al grupo control y a los grupos PS por 24 h con y sin extracción de LCR. En los paneles B y C, a los grupos PS por 48 y 72 h con y sin extracción de LCR. Como puede apreciarse, la PS produce un incremento significativo en la cantidad de sueño MOR desde las primeras horas y dicho efecto continúa hasta las 11 horas de registro. Mientras que la extracción de LCR disminuye el rebote también desde las primeras horas y a lo largo del registro. Dicho efecto es más notabice en los grupos PS por 48 y 72 h.

24 y 48 horas con extracción de LCR, respectivamente.

C-.) EFECTO DE LA EXTRACCION DE 100 ul DE LCR EN GATOS CONTROLES.

La extracción de 100 ul de LCR a animales controles, produjo una disminución significativa en el TSMOR con respecto a casi todos los grupos excepto con los grupos PS por 24 más extracción de LCR y control de PS ( $p < 0.01$ ). Dicho efecto fué dado a partir de una disminución en la duración y un aumento en la latencia de sueño MOR (Fig 2), así como de un aumento en la fase de SOLI con respecto a todos los grupos ( $p < 0.01$ ).

D-.) CONTROL DE PS.

Los resultados de los animales colocados en plataformas grandes no mostraron cambios significativos en la fase de sueño MOR en relación con el grupo

En resumen, los resultados de este experimento mostraron que la fase de recuperación posterior a la PS produce un rebote de sueño MOR, a partir de un incremento en la duración de los periodos de esta fase de sueño. En contraparte, la extracción de LCR produjo una disminución del rebote en los grupos privados de sueño el cuál también fué observado en el grupo control.

EXPERIMENTO 2

En este experimento, los resultados mostraron que la concentración de VIP en el LCR de gatos PS por 24, 48 y 72 horas, incrementó de manera significativa ( $p < 0.01$ , ver Tabla II y Fig



TABLA 2.  $\bar{X} \pm$  E.S. DE LA [VIP] pg/ml EN EL LCR DE GATOS PRIVADOS DE SUEÑO (n=10).

CONTROL	29.4 $\pm$ 3.6*
PS X 24 HRS	96.7 $\pm$ 10.4
PS X 48 HRS	84.8 $\pm$ 9.7
PS X 72 HRS	126 $\pm$ 8.4**
PG X 24 HRS	53.5 $\pm$ 20.4
PG X 48 HRS	59.2 $\pm$ 24.8
PG X 72 HRS	56.2 $\pm$ 10.2

\*  $p < 0.01$  CONTROL VS PS 24 HRS, PS 48 HRS y PS 72 HRS

\*\*  $p < 0.01$  PS 72 HRS VS PG 24 HRS, PG 48 HRS Y PG 72 HRS

# RIA-VIP

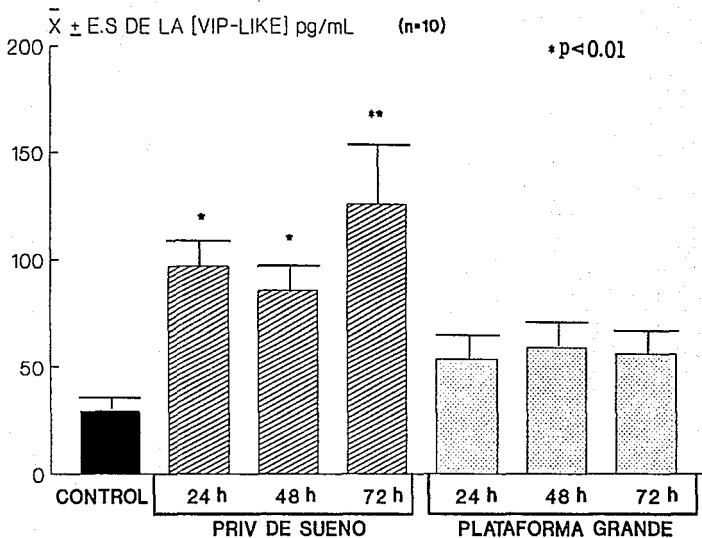


Fig 4. Cambios en la concentración de VIP en el LCR de gatos PS por 24, 48 y 72 horas. Como puede observarse la concentración de este neuropéptido aumenta de manera significativa y casi proporcional al tiempo de privación. Asimismo, se ilustra la concentración de VIP en el LCR de animales en plataformas grandes, donde no hay cambios significativos con respecto al control.

7) en relación al grupo control. Dicho efecto fué casi proporcional al tiempo de privación, sólo que la concentración de VIP en el LCR del grupo PS por 48 horas, disminuyó ligeramente en relación con el grupo PS por 24 horas, aunque no de manera significativa (ver Figura 3 y Tabla II). Asimismo, el grupo PS por 72 horas mostró diferencias significativas con el grupo control y los grupos con PG ( $p < 0.01$ ), como puede observarse en la fig 3.

El incremento en la concentración de VIP en el LCR de los animales PS por 24, 48 y 72 horas, sugerimos que fué producido principalmente por la PS y no por el "stress" producido por el método de privación. Esta aseveración esta fundamentada porque la concentración de VIP en los grupos con PG, fué similar al del grupo control, aunque hubo un ligero incremento, pero dicha diferencia no fué significativa.

En resumen, los resultados de este experimento mostraron que la PS produjo un incremento significativo en la concentración de VIP en el LCR de los animales PS, de manera casi proporcional al tiempo de privación y dicho efecto no dependió del "stress" producido por esta técnica a los animales.

## VI-DISCUSSION

En el experimento 1, los resultados mostraron que durante el periodo de recuperación posterior a la PS se produce un rebote de sueño MOR. Dicho efecto fué dado a partir de un aumento en la duración de los periodos de sueño MOR y proporcional al tiempo de privación. Estas observaciones confirman trabajos anteriores, donde se ha demostrado que después de la PS en el gato se produce un rebote de sueño MOR, a partir de un aumento en la duración de los periodos de esta fase de sueño y el cual también fué proporcional hasta las 72 horas de privación, a tiempos posteriores de PS no hay compensación en la cantidad de sueño MOR (Jouvet y col, 1964; Siegel y Gordon, 1965; Drucker-Colín y Valverde, 1982).

Con respecto, al efecto de la PS selectiva de sueño MOR que se produce mediante el método del tanque, no hubo cambios significativos sobre las demás fases de sueño y tampoco a la vigilia. Aunque cabe mencionar que Sallanon y col (1983), reportaron que el mismo método de PS por 48 horas en gatos produce un rebote de sueño MOR y también de SOL II.

Con base en estos resultados, se sugiere que durante la vigilia forzada ó PS se acumulan sustancias inductoras de sueño MOR en el LCR del animal PS. Posiblemente la concentración de dichas sustancias dependa del tiempo de privación, lo que en consecuencia determinaría la magnitud del rebote de sueño MOR, tal como lo muestran los resultados de este trabajo.

En la segunda parte del experimento 1, los resultados mostraron que la extracción de 100 ul de LCR posterior a la PS

disminuyó el rebote de sueño MOR, a partir también de una reducción en la duración de los periodos de esta fase de sueño. Este efecto también fué observado en el grupo control sin PS. Ambos efectos son difíciles de explicar, sin embargo, se supone que fueron debidos principalmente a que el volúmen extraído disminuyó la concentración de las sustancias humorales de sueño presentes en el LCR, acumuladas desde condiciones control y durante la PS, lo que en consecuencia determinaría la disminución de sueño MOR en condiciones control y durante el rebote de sueño MOR. Asimismo, se cree que este efecto no fué debido a cambios de presión "per se" provocados por la sola extracción de LCR, ya que esta maniobra fué realizada bajo las siguientes condiciones: primero, se utilizó un rango de extracción de LCR de 20-30 ul x min, el cual es similar al rango de producción del LCR en el gato (Segal y Pollay 1977), segundo, el volúmen extraído fue reemplazado con LCR artificial, al mismo rango de extracción (Sallanon y col, 1982) y el cual, se ha demostrado que no altera significativamente la cantidad de sueño en el gato y en la rata (Sallanon y col, 1982; Borbély y Tobler, 1979) y tercero, el volúmen extraído fué de solo 100 ul, lo que representa la décima parte del volúmen total de LCR en el cerebro del gato (Sallanon y col, 1983). Como se mencionó anteriormente, el efecto producido por la extracción de un volúmen tan pequeño de LCR sobre el rebote de sueño MOR es difícil de explicar, sin embargo, cabe mencionar que en el caso contrario sucedió casi lo mismo, la administración de 100 ul de LCR de gatos PS por 24 horas, al 4-ventrículo de gatos insomnes pre-tratados con PCPA incrementa la cantidad de sueño MOR de manera significativa (Prospéro-García y

col, 1986). Lo mismo ocurrió con volúmenes mayores de 250 ul (Sallanon y col, 1983). Asimismo, este efecto también fué observado en ratas: la administración de 20 ul de LCR de ratas PS por 24 horas a ratas insomnes con propranolol, indujó sueño MOR y dicho efecto fué potenciado con LCR de ratas PS por 48 y 72 horas (Adrien y Dugovic, 1984). Asimismo, diversos trabajos farmacológicos, han demostrado que la administración de diversos fármacos a concentraciones bajas, producen un incremento notable en la cantidad de sueño MOR, tal es el caso del carbacol (4 ug/0.25 ul) ó del VIP (100 ng) (Baghdoyan y col, 1984; Drucker-Colin y col, 1984).

Finalmente, creemos que este efecto producido sobre el rebote de sueño MOR, también fué influenciado de manera importante por estructuras cerebrales localizadas en el tallo cerebral, ventrales al 4- ventriculo, las cuales han sido propuestas como generadoras de los mecanismos del sueño MOR (Hobson y col, 1974).

En conclusión, creemos que el LCR de gatos PS contiene sustancias inductoras de sueño MOR y que al quitarlas mediante la extracción de LCR disminuye la concentración de dichas sustancias y en consecuencia el rebote de sueño MOR posterior a la PS.

Pese a los resultados obtenidos, uno de los problemas de interpretación causado por la técnica del florero invertido es determinar si los cambios observados son consecuencia directa de la disminución de sueño ó de algún otro parámetro (Vogel, 1975; Borbély y Tobler, 1989). La principal desventaja de este método es el estres producido a los animales durante la privación, lo

que origina cambios metabólicos importantes que pueden afectar la cantidad de sueño posterior. No obstante, los efectos del estrés, se pueden controlar mediante el uso de plataformas grandes ó controles, las cuales permiten relajamiento muscular del animal y en consecuencia se presenta el sueño, pero bajo las mismas condiciones que los PS (Drucker-Colín y Valverde, 1982).

Con base en las evidencias anteriormente mencionadas, se supuso que las posibles sustancias inductoras de sueño tenían que alcanzar niveles determinados durante la vigilia prolongada para entonces disparar el rebote de sueño MOR y el cual posiblemente sería proporcional a los niveles de dichas sustancias presentes en el LCR. El siguiente paso fué entonces cuantificar la concentración de las sustancias inductoras de sueño presentes en el LCR de los animales PS. Sin embargo, debido a que el número de dichas sustancias ha aumentado en los últimos años y las cuales no han sido estudiadas de manera profunda (Borbély y Tobler, 1989), decidimos cuantificar solamente a un neuropéptido, el VIP, por las siguientes razones: primero, de todos los neuropéptidos estudiados en la regulación del ciclo sueño-vigilia, solamente el VIP incrementó la cantidad de sueño MOR de manera significativa (Riou y col, 1982 a,b y c). Además, se ha demostrado, que este neuropéptido es capaz de inducir sueño MOR en animales normales (Drucker-Colín y col, 1984; Obál Jr, 1986; Kruisbrink y col, 1987; Obál, Jr y col, 1989) y en ratas y gatos pretratados con PCPA (Riou y col, 1982c; Sallanon y col, 1982; Prospéro-García y col, 1986). Segundo, el bloqueo del VIP, mediante el uso de un antagonista, produce disminución de la fase de sueño MOR (Mirmiran y col, 1989; Riou y

col, 1982c). Tercero el VIP ó una molécula parecida al VIP, ha sido sugerido como uno de los principios activos del LCR para la inducción del sueño MOR en gatos insomnes por PCPA (Drucker-Colin y col, 1988; Drucker-Colin y col, 1990; Prospéro-García y col, 1990) y cuarto, el VIP se localiza en el LCR (Wang y col, 1983) y sus sitios de pegado son abundantes en la capa subependimal a nivel de todos los ventrículos, el área postrema y los órganos subcomisurales y subfornicales, lo que indica un posible papel del VIP en la homeostasis del LCR (Martin y col, 1989).

El siguiente experimento que decidimos realizar fué entonces, determinar por RIA la [VIP] en el LCR de animales PS. Los resultados del experimento 2 mostraron que la PS produjo un incremento significativo en la [VIP] en el LCR de gatos PS por 24, 48 y 72 horas de manera casi proporcional al tiempo de privación, aunque la [VIP] en el LCR de gatos PS por 48 horas disminuyó ligeramente en relación a la [VIP] del LCR de gatos PS por 24 horas. Este efecto es difícil de explicar, debido a que los resultados del experimento 1 mostraron que el rebote de sueño posterior a la PS fué proporcional al tiempo de privación. Asimismo, dicho efecto fué independiente del efecto de "stress" producido por el método del florero invertido, ya que la [VIP] en el LCR de animales colocados en PG por 24, 48 y 72 horas, no mostró diferencias significativas en relación a los grupos PS y la [VIP] en estos grupos presento casi valores normales. Estos resultados, muestran de manera clara que el incremento del VIP en el LCR de animales PS, es debido preferencialmente al efecto



de la PS y no al efecto producido por el "stress". Sin embargo, dicho efecto no ha sido descartado de forma completa, recientemente Rampin y col (1991), demostraron que la restricción de movimiento a ratas, provoca un aumento en la cantidad de sueño MOR posterior al periodo de privación, por lo que concluyeron que el rebote de sueño MOR esta determinado parcialmente por un componente de "stress". Con base en estos resultados, se sugirió que durante la PS se acumula el VIP ó una molécula parecida al VIP en el LCR y que posiblemente este neuropéptido participa en el rebote de sueño MOR.

Trabajos adicionales han demostrado que existen variaciones circádicas del VIP en diferentes estructuras cerebrales de la rata. Morin y col, en 1991, demostraron que este péptido muestra dos picos máximos de concentración en el tallo cerebral (sustancia gris periacueductal y LC), uno para el periodo oscuro y otro para el de luz. Mientras que en el cerebro anterior, solo el NS, presentó uno, durante el periodo oscuro. Estos resultados sugieren que las estructuras anteriormente mencionadas son importantes para la homeostasis de sueño inducido por el VIP, y que el NS, estaría participando además en la ritmicidad del ciclo sueño-vigilia. Aunque, mediante técnicas de biología molecular se ha demostrado que durante el periodo oscuro en el NS, se detectan los mayores niveles de RNAm para VIP en comparación con el periodo de luz (Albers y col, 1989). Estos resultados, sugieren que durante el periodo oscuro se prepara la maquinaria bioquímica para que el sueño se presente durante el periodo de luz, que corresponde con el periodo de sueño de la rata.

Posteriormente, Morin y col, en 1992 demostraron que la

concentración de VIP ó de una molécula parecida al VIP en el cerebro de la rata disminuye después de la PS por 24 y 48 horas en la corteza y la glándula pituitaria, sin cambios en el NS, hipotálamo, AP, sustancia gris periacueductal, LC, RD y la médula dorsomedial. Asimismo, demostraron que el rebote de 5 horas de sueño posterior a la PS no produjo cambios significativos en la [VIP]. Este trabajo sugirió que el VIP no esta involucrado en la homeostasis de la PS. Sin embargo, el aumento en la [VIP] que se observó en este estudio pudiera deberse a dos factores principalmente: primero, en este trabajo nosotros utilizamos al gato y ellos a la rata, aunque se ha demostrado que en la rata el VIP incrementa la cantidad de sueño MOR (Riou y col, 1982c), la diferencia de especie puede modificar la concentración de este péptido y segundo, la [VIP] fué medido en el LCR, el cuál puede considerarse como un sitio de acumulación de diversos neuropéptidos y de varias regiones cerebrales.

Además, se ha visto que el VIP administrado de manera constante al ventrículo lateral incrementa la cantidad de SOL y MOR durante el periodo de luz, de forma mayor que cuando únicamente se realizan inyecciones únicas, pero este cambio no afecta la amplitud del ritmo circádico (Kruisbrink y col, 1987). Estos resultados, apoyan la participación del VIP como un factor endógeno e hipnógeno, el cual probablemente tiene que alcanzar un nivel determinado durante la vigilia prolongada para entonces incrementar los niveles de excitabilidad neuronal y disparar el sueño MOR.

Sin embargo, el mecanismo de acción para la producción de

sueño MOR, por parte del VIP vía el LCR no ha sido completamente estudiado. Como mencionamos brevemente en la introducción el VIP coexiste con Ach y otros neurotransmisores en diversas regiones del SNC. Asimismo, se ha demostrado que agonistas colinérgicos, tal como el carbacol administrado en puente incrementa de manera notable la cantidad de sueño MOR. Con base en estas evidencias, se supuso que la administración simultánea de VIP y carbacol en FTG pudieran tener un efecto potenciador sobre el sueño MOR. Sin embargo, los resultados mostraron que el VIP tuvo un efecto mucho menor en esta preparación en relación con los grupos que recibieron carbacol ó VIP solo (Drucker-Colin y col, 1988). Además de que el efecto del carbacol difiere del producido por el VIP, ya que este agonista colinérgico es incapaz de aumentar la cantidad de sueño MOR en animales pretratados con PCPA (Drucker-Colin y Próspero-García, 1989). Estos resultados señalaron un efecto antagonista entre el fármaco colinérgico y el VIP. Estudios *in vitro* apoyan parcialmente estos resultados, ya que la administración de carbacol en el páncreas de cobayo induce disminución en el número de los receptores de alta afinidad para VIP, através de la interacción directa del carbacol con los receptores colinérgicos, sin interactuar directamente con los receptores para VIP (Murakami y col, 1989). Con base en estos resultados, posiblemente el efecto antagonista del carbacol sobre el VIP en el ciclo sueño-vigilia del gato, pudiera deberse a eso. El siguiente paso, fué entonces probar un antagonista colinérgico, atropina y observar el efecto del VIP en gatos insomnes con PCPA. Lo que observamos fué, que la sólo administración de atropina incrementó el sueño MOR, efecto que

fué significativamente aumentado por el VIP. En resumen, estos resultados mostraron que en el gato con 5-HT disminuida, la estimulación colinérgica no indujó sueño MOR y los efectos del VIP también fueron reducidos. Por otra parte, el bloqueo de la actividad colinérgica, mediante la atropina indujó sueño MOR y la adición de VIP aumentó dicho efecto. Estos resultados sugirieron una fuerte relación altamente compleja entre VIP-ACh-5-HT para la producción de sueño MOR. Finalmente, se supuso que el VIP tuviera efecto sobre otre sistema de neurotransmisor, la NE. Para comprobar esta hipótesis, se administró clonidina en gatos insomnes y además VIP. Los resultados mostraron que el VIP no tuvo efecto en esta preparación (Jiménez-Anguiano, 1989, Drucker-Colín y col, 1990, Prospéro-García y col, 1991). Estos hallazgos sugieren que el VIP induce sueño MOR en los gatos insomnes por PCPA activando a los sistemas noradrenérgicos e inactivando a los colinérgicos. Dicha condición supondría una interacción entre sistemas péptidérgicos y de neurotransmisores para que el sueño MOR se presente.

Estudios adicionales, han demostrado que existe una interacción del VIP con el sistema colinérgico, demostrando que el tratamiento crónico con atropina durante 14 días produjo una reducción significativa en la concentración de VIP de Cx, RD, LC, médula ventrolateral y dorsomedial, sin producir ningún cambio en estructuras tales como el hipotálamo y el NS (Petit y col, 1992). Estas evidencias apoyan en parte los resultados anteriores y además demuestran que existe un control muscarinico en la [VIP], dada principalmente en estructuras caudales del tallo

cerebral.

Por otra parte, Obál Jr. y col, 1989, han sugerido que uno de los posibles mecanismos de acción del VIP para la producción de sueño MOR puede estar mediada vía la liberación de prolactina. Esta hipótesis esta basada en que la administración subcutánea de prolactina produce un incremento en la cantidad de sueño MOR y además dicho esta asociado con un aumento en la latencia de los periodos de esta fase de sueño. De esta forma, proponen que la administración i.c.v. de VIP, más que la administración sistémica de prolactina es el que desencadena la liberación de concentraciones altas de prolactina endógena probablemente vía los vasos portales que alcanzan el CSF ó algún sitio de acción hipotálamica. Esta hipótesis fué parcialmente confirmada posteriormente, demostrando que la administración de VIP además de producir un incremento en la cantidad de sueño MOR y en la concentración de prolactina en plasma. Ambos incrementos, son inhibidos por la administración de anticuerpos contra prolactina, el efecto inductor de sueño del VIP y la liberación de prolactina. Estos resultados sugieren que la prolactina estimula la aparición de sueño MOR, además puede mediar la actividad promotora de sueño del VIP (Obál Jr y col, 1992).

Pese a estos resultados, desconocíamos el sitio de acción del VIP debido a que en los estudios anteriormente citados, la administracion de este péptido fué ventricular. El siguiente paso fué entonces administrar este péptido en estructuras cerebrales específicas. Por lo que administramos VIP en el FTG de gatos normales y pretratados con PCPA. Los resultados mostraron que el VIP no produjo cambios significativos en la cantidad de sueño MOR

en ambos grupos, lo que sugirió que esta región no era el sitio de acción del VIP ó que requiere la activación simultanea de otras regiones cerebrales para la inducción de sueño (Jiménez-Anguiano y col, 1989). Sin embargo, una limitante de este trabajo, fué que no realizamos una curva dosis-respuesta del VIP, por lo que estos resultados aún no son concluyentes. En cuanto a regiones anteriores del cerebro del gato y utilizando otro modelo de insomnio, Pacheco-Cano y col, 1990; demostraron que el VIP incrementó la cantidad de sueño MOR en animales con lesiones bilaterales del AP. Estos resultados sugirieron que dicha estructura no esta involucrada con los mecanismos de acción del VIP para la producción de sueño. A pesar de estas evidencias, los resultados aún no son concluyentes sobre el sitio de acción del VIP. Faltan estudios que muestren la participación de diferentes estructuras cerebrales en la modulación de sueño MOR, producida por el VIP.

Por último, cabe mencionar que a partir de los resultados obtenidos en el experimento 2, se cumple el segundo parámetro propuesto por Jouvet en 1982, para clasificar a una sustancia inductora de sueño (anteriormente mencionado en la introducción, y el cual postula que dicha sustancia debe aumentar durante la PS). Como los resultados lo muestran la [VIP] incrementa en el LCR durante la PS.

#### CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- 1-. La PS durante el periodo de recuperación produce un rebote de

sueño MOR y la extracción de LCR disminuye dicho efecto. Probablemente, el rebote de MOR esta mediado en parte, por la acumulación de sustancias inductoras de sueño en el LCR, ya que al extraer el LCR, disminuye la concentración y en consecuencia el rebote.

2-. La PS produce un incremento en la [VIP] el cual es dependiente del tiempo de privación y este efecto no depende del estres producido por el método de privación del florero invertido.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

1. Adrien, J., and Dugovic, C. Presence of paradoxical sleep (PS) factor in the cerebrospinal fluid of PS-deprived rats. Europ.J.Pharmacology. 100: 223-226, 1984.
2. Albers, H. E., Ninanimati, N., Stopa, E., and Ferris, C. F. Ligth selectivity alters vasoactive intestinal peptide and peptide histidine isoleucine immunoreactivity within the rat suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 437: 189-192, 1987.
3. Anand, P., Gibson, S. J., McGregor, G. P., Blank, M. A., Chatel, M. A., Bacarese-Hamilton, A. J., Polak, J. M., and Bloom, S. R. A VIP-containing system concentrated in the lumbosacral region of humanspinal cord. Nature. 305: 143-145, 1983.
4. Aserinsky, E., and Kleitman, M. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. Science 11: 273-274., 1953.
5. Baghdoyan, H. A., McCarley, R. W., and Hobson, J. A. Cholinergic manipulation of brainstem reticular system: effects on desynchronized sleep generation. En: A. Wauquier, J. M. Monti, J. M. Gaillard and M. Radulovacki (Eds.), Sleep: neurotransmitters and neuromodulators. Raven Press, New York, 1985. pp. 15-28.
6. Baghdoyan, H. A., Rodrigo-Angulo, M. L., McCarley, R. W., and 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.
7. Baghdoyan, H. A., Rodrigo-Angulo, M. L., McCarley, R. W., and Hobson, J. A. A neuroanatomical gradient in pontine tegmentum for the cholineceptive induction of desynchronized sleep signs. Brain Res. 414: 245-261, 1987.



8. Besson, J. Distribution and pharmacology of vasoactive intestinal peptide receptors in the brain and pituitary. En: S. I. Said and V. Mutt (Eds.), Vasoactive intestinal peptide and related peptides. Ann.N.Y.Acad.Sci.,N.Y, 1988. pp. 204-219.
9. Besson, J., Rotsztein, W., Laburthe, M., Epelbaum, J., Beaudet, A., Kordon, C., and 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.
10. Borbely, A., and Tobler, I. Cerebroventricular infusion in the rat: depression of motor activity and paradoxical sleep. Neurosc.Letters. 12: 75-80,1979.
11. Borbely, A., and Tobler, I. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. Physiol.Reviews. 69: 605-669,1989.
12. Bremer, F. Historical development on ideas on sleep. En: O. Petre-Quadens and J. D. Schlag (Eds.), Basic sleep mechanisms. Academic Press, New York and Londres, 1974. pp. 3-12.
13. Card, J. P., Fitzpatrick-McElligott, S., Gozes, I., and Baldino, F. J. r. Localization of vasopressin-vasoactive intestinal polypeptide- peptide histidine isoleucine and somatostatin mRNA in rat-supra- chiasmatic nucleus. Cell.Tissue.Res. 252: 307-315,1988.
14. Carlquist, M., Jornvall, H., Tatemoto, K., and Mutt, V. A porcine brain polypeptide is identical to the vasoactive intestinal polypeptide. Gastroenterology. 83: 245-249,1982.
15. Celesia, G. G., and Jasper, H. H. Acetylcholine released from cerebral cortex in relation to state of activation. Neurolog. 16: 1053-1063,1966.
16. Cespuoglio, R., Chastrette, N., Prevantel, H., and Jouvet, M. Functional relationship for sleep induction. Endogenous sleep factors. En: S. Inoue and J. M. Krueger (Eds.), Endogenous sleep factors. SPB Academic Publishing, The

- Netherlands, 1990. pp. 87-98.
17. Cespuglio, R., Gomez, M. E., Faradji, H., and Jouvet, M. Alterations in the sleep-waking cycle induced by cooling of the locus coeruleus area. Electroenceph.Clin.Neurophysiol. 54: 570-578, 1982.
  18. Chee, C. A., Roozendaal, B., Swaab, D. F., Goudsmit, E., and Mirmiran, M. Vasoactive intestinal polypeptide neuron changes in the senile rat suprachiasmatic nucleus. Neurobiol.Aging. 9: 307-312, 1988.
  19. Datta, S., Calvo, J. M., Quattrochi, J. J., and Hobson, A. Long-term enhancement of REM sleep following cholinergic stimulation. NeuroReport 2: 619-622, 1991.
  20. De Souza, E. B., Seifert, H., and Kuhar, M. J. Vasoactive intestinal peptide receptor localization in rat forebrain by autoradiography. Neurosci.Lett. 56: 113-120, 1985.
  21. Delorme, F., Jeanneroid, M., and Jouvet, M. Effects remarquables de la reserpine sur l'activite EEG phasique pontogeniculooccipitale. C.R.Soc.Biol. 159: 900-903, 1965.
  22. Dement, W. C., Henriksen, S., and Ferguson, J. The effect of the chronic administration of paraclorophenylalanine (PCPA) on sleep parameters in the cat. En: J. Barchas and E. Usdin (Eds.), Serotonin and Behavior. Academic Press, New York, 1973. pp. 414-424.
  23. Domino, E. F., and Stawiski, M. Effect of cholinergic antisynthesis agent HC-3 on the awake-sleep cycle of the cat. Psychophysiol. 7: 107-144, 1970.
  24. Drucker-Colin, R., Arankowsky-Sandoval, G., Prospero-Garcia, O., Jimenez-Anguiano, A., and Merchant, H. The regulation of REM sleep: Some considerations on the role of vasoactive intestinal peptide, acetylcholine and sensory modalities. En: M. Mancina and G. Marini (Eds.), The diencephalon and sleep. Raven Press, Ltd, New York, Italia, 1990. pp. 313-330.

25. Drucker-Colin, R., Bernal-Pedraza, J., Fernandez-Cancino, F., and Oksenberg, A. Is vasoactive intestinal polypeptide (VIP) a sleep factor?. Peptides 5: 837-840, 1984.
26. Drucker-Colin, R., and Bernal-Pedraza, J. G. Kainic acid lesions of gigantocellular tegmental field (FTG). neurons does not abolish REM sleep. Brain Res. 272: 387-391, 1983.
27. Drucker-Colin, R., and Gutierrez, M. C. Effects of forebrain lesions of midbrain reticular formation release of protein during the sleep-wake cycle. Exp.Neurol. 52: 339-344, 1976.
28. Drucker-Colin, R., and Prospero-Garcia, O. Microinjection of carbachol into the pontine area is unable to modify insomnia induced by parachlorophenylalanine (PCPA). Brain Res. 462: 163-166, 1988.
29. Drucker-Colin, R., Prospero-Garcia, O., Arankowsky-Sandoval, G., and Perez-Montfort, R. Gastropancreatic peptides and sensory stimuli as REM sleep factors. En: (Ed.), ., 1988.
30. Drucker-Colin, R., Spanis, C. W., Cotman, C. W., and McGaugh, J. L. Changes in protein perfusates of freely moving cats: Relation to behavioral state. Science. 187: 963-965, 1975.
31. Drucker-Colin, R., Spanis, C. W., Hundayi, J., Sassin, J. F., and McGaugh, J. L. Growth hormone effects on sleep and wakefulness in the rat. Neuroendocrinol. 18: 1-8, 1975.
32. Drucker-Colin, R., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gutierrez, M. C., and Dreyfus-Cortes, G. Immunological approach to the study of neurohumoral sleep factors. Effects on REM sleep of antibodies to brain stem proteins. Exp.Neurol. 69: 563-575, 1980.
33. Drucker-Colin, R., and Valverde, R. C. Endocrine and peptide functions in the sleep-waking cycle. En: D. Ganten and D. Pfaff (Eds.), Current topics in Neuroendocrinology. Springer, Heidelberg, N.Y., 1982. pp. 37-81.

34. Drucker-Colin, R. R. Crossed perfusion of sleep inducing brain tissue substance in conscious cats. Brain Res. 56: 123-134, 1973.
35. Drucker-Colin, R. R., and Benitez, F. REM sleep rebound during withdrawal from chronic amphetamine administration is blocked by chloramphenicol. Neurosci.Lett. 6: 267-271, 1977.
36. Drucker-Colin, R. R., Rojas-Ramirez, J. A., Vera-Trueba, J., Monroy-Ayala, G., and Hernandez-Peon, R. Effect of crossed-perfusion of the midbrain reticular formation upon sleep. Brain Res. 23: 269-273, 1970.
37. Ebeid, A. M., Attia, R. R., Sundaram, P., and Fischer, J. Release of vasoactive intestinal peptide in the central nervous system in man. Amer.J. Surg. 137: 123-127, 1979.
38. Ebeid, A. M., Smith, A. R., Scourrov, J., Murray, P., and Fisher, J. E. Increased immunoreactive VIP in the cerebrospinal fluid (CSF) of dogs and monkeys in hepatic failure. J.Sur.Res. : 538-541, 1978.
39. Eiden, L. E., Nilaver, G., and Palkovits, M. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat brain stem nuclei. Brain Res. 231: 472-477, 1982.
40. Emson, P. C., Gilbert, E. T., Loren, J., Fahrenkrug, J., Sundler, E., and Schaffalitzky, O. B. Development of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) containing neurons in the rat brain. Brain Res. 177: 437-444, 1979.
41. Ernst, A., and Schoenenberger, G. A. DSIP: Basic findings in human beings. In: S. Inoue and Schneider-Helmert (Eds.), Sleep Peptides. Basic and clinical approaches. Japan Sci.Soc.Press/Springer-Ver, Tokyo-Berlin, 1988. pp. 131-173.
42. Eskin, A., Corrent, G., Lin, C., and McAdoo, D. J. Mechanism for shifting the phase of a circadian rhythm by serotonin involvement of cAMP. Proc.Natl. Acad.Sci.(U.S.A.). 79: 660-664, 1982.

43. Eskin, A., Jeung, S. J., and Klass, M. R. Requirement for protein synthesis in the regulation of a circadian rhythm by serotonin. Proc.Natl.Acad.Sci. 81: 7637-7641,1984.
44. Eva, C., Meek, J. L., and Costa, E. Vasoactive intestinal peptide which coexist with acetylcholine decreases acetylcholine turnover in mouse salivary glands. J.Pharmac.Exp.Theor. 232: 267-269,1981.
45. Fahrenkrug, J., Schaffalitzky, B., and Fahrenkrug, A. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebrospinal. Brain Res. 14: 179-188,1977.
46. Fencel, V., Koski, G., and Pappenheimer, J. R. Factors in cerebrospinal fluid from goats that affect sleep and activity in rats. J.Physiol.(London). 216: 565-589,1971.
47. Fornal, C., Averbach, S., and Jacobs, B. Activity of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus in freely moving cats. Exp.Neurol. 88: 590-608,1985.
48. Gadea-Ciria, M., Stadler, H., Lloyd, K., and Bartholini, G. Acetylcholine release within the cat striatum during the sleep wakefulness cycle. Nature 243: 518-519,1973.
49. Garcia-Arriaras, J. E., and Pappenheimer, J. R. Site of action of sleep-inducing muramyl peptide isolated from human urine: microinjection studies in rabbit brain. J.Neurophysiol. 49: 528-533,1983.
50. Giachetti, A., Said, S. I., Reynolds, R. C., and Koniges, F. C. Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA). 74: 3424-3428,1977.
51. Gnadt, J. W., and Pegram, G. V. Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. Brain Res 384: 29-91,1986.
52. Gozes, I., and Breneman, D. E. VIP: Molecular and neurobiological function. Molecular Neurobiol. 3: 201-236,1989.
53. Hartman, E. The 90 minute sleep dream. Arch.Gen.Psychiat. 18: 280-286,1968.

54. Hazra, J. Effect of hemicholinium-3 on slow wave and paradoxical sleep of cat. Eur.J.Pharmacol. 11: 395-397,1970.
55. Hernandez-Peon, R. Central neuro-humoral transmission in sleep and wakefulness. En: K. Akert, C. Bally and J. P. Shade (Eds.), Progress in brain research. Elsevier,Amsterdam,1965. pp. 96-117.
56. Hernandez-Peon, R.,and Chavez-Ibarra, G. Sleep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain. Electroencepha.Clin.Neurophysiol. 24: 188-198,1963.
57. Hilakivi, I. The role of beta- and alpha adrenoceptors in the regulation of the stages of sleep-waking cycle in the cat. Brain Res. 277: 109-118,1983.
58. Hobson, J. A., Goldberg, M., Vivaldi, E.,and Riew, D. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjection of the muscarinic agonist bethanechol. Brain Res. 275: 127-136,1983.
59. Hobson, J. A.,and McCarley, R. W. The brain as a dream state generator: the activation-synthesis hypothesis of the dream process. Am.J.Psychiat. 134: 1335-1348,1977.
60. Hobson, J. A., McCarley, R. W., Pivik, T.,and Freedman, R. Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. J.Neurophysiol. 37: 497-511,1974.
61. Houdouin, F., Cespuglio, R., Charib, A.,and Jouvet, M. Detection of the release of 5-hydroxyindole compounds in the hypothalamus and the n.raphe dorsalis throughout the sleep-waking cycle and during stressful situations in the rat: a polygraphic and voltammetric approach. Exp Brain Res. 85: 153-162, 1991.
62. Inoue, S., Honda, K.,and Komoda, Y. A possible mechanism by which the sleep-promoting substance induces slow wave sleep but suppresses paradoxical sleep in the rat. En: W. P. Koella (Ed.), Sleep 82.,Karger, Basel,1983. pp. 112-114.

63. Inoue, S., and Schneider-Helmert, D. Sleep peptides basic and clinical approaches., Japan Sci.Soc.Press/Springer-Ver,Tokyo-Berlin,1988.
64. Inoue, T., Kato, Y., Koshiyama, H., Yanaihara, N., and Imura, H. Galanin stimulates the release of vasoactive intestinal polypeptide from perfused hypothalamic fragments in vitro and from periventricular structures into the cerebrospinal fluid in vivo in the rat. Neurosci.Lett. 85: 95-100,1988.
65. Jacobs, B. L., and Jones, B. E. The role of central monoamine and acetylcholine systems in sleep -wakefulness states: mediation or modulation ?. En: L. L. Butcher (Ed.), Monoaminergic-cholinergic interactions in the brain. Academic Press,New York,1978. pp. 271-290.
66. Jasper, H. H., and Tessier, J. Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. Science 177: 601-602,1971.
67. Jimenez-Anguiano, A. Efecto del VIP sobre el insomnio producido por varios farmacos en gatos. En: (Ed.), Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM, Facultad de Ciencias,1989. p. 120.
68. Jimenez-Anguiano, A., Prospero-García, O., and Drucker-Colin, R. El VIP en el campo tegmental gigantocelular (FTG) no modifica el sueño MOR de gatos normales y pretratados con PCPA. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Oaxtepec, Mor. Septiembre 3-7. ,1988.
69. Jones, B. E. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. Neuroscience. 3: 637-656,1991.
70. Jones, E. B. Elimination of paradoxical sleep by lesion of the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. Neurosci. Lett. 13: 285-293,1979.
71. Jouvet, D., Vimont, P., Delorme, F., and Jouvet, M. Etude de la privation selective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. C.R.Soc.Biol. 158: 756-759,1964.
72. Jouvet, M. Recherches sur les structures nerveuses et les mecanismes responsables des diferentes phases du sommeil physiologique. Archs.Ital.

Biol. 100: 125-206,1962.

73. Jouvet, M. Biogenic amines and the states of sleep. Science 163: 32-41, 1969.
74. Jouvet, M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep. Ergebn. Physiol. 64: 166-307,1972.
75. Jouvet, M. Hypnogenic indolamine-dependent factors and paradoxical sleep rebound. En: W. P. Koella (Ed.), Sleep'82. Karger, Basel,1983. pp. 2-18.
76. Kaji, H., Chihara, K., Minamitani, N., Kodama, H., Yanaihara, N., and 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.
77. Kaneko, T., Cheng, P. Y., Oka, H., Oda, T., Yanaihara, N., and Yanaihara, C. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates adenylate cyclase and serotonin N-acetyl-transferase activities in rat pineal in vitro. Bioned. Res. 1: 84-87,1980.
78. Karacan, I., Rosebloom, A. L., Williams, R. L., Finley, W. W., and Hurich, C. J. Slow wave sleep deprivation in relation to plasma growth hormone concentration. Physicians' Drug Manual. 2: 104-107,1971.
79. Kastin, A. J., Castellous, P. F., Banks, W. A., and Coy, D. H. Radioimmunoassay of DSIP-like material in human blood: possible protein binding. Pharmacol.Biochem.Behav. 3: 691-695,1978.
80. Kato, N., Nagasaki, S., Takahashi, Y., Namuro, I., and Saito, Y. DSIP-like material in rat brain, human cerebrospinal fluid and plasma as determined by enzyme immunoassay. En: S. Inoue and A. A. Borbely (Eds.), Endogenous sleep substance and sleep regulation. Japan Sci.Soc.Press.,Tokio,1985. pp. 141-153.
81. Kawatani, M., Rutigliano, M., and De groat, W. Selective facilitatory effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on muscarinic firing in vesical ganglia of the cat. Brain Res. 336: 223-224,1985.



82. Kiss, J., Leranth, C. s., and Halasz, B. Serotonergic endings on VIP-neurons in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopin immunocytochemistry. Neurosci. Lett. 44: 119-124,1984.
83. Koella, P. W., Feldstein, A., and Czicman, F. S. The effect of parachlorophenylalanine on the sleep of cats. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 25: 481-490,1968.
84. Korner, A. Growth hormone control of biosynthesis of protein and ribonucleic acid. Recent Prog.Horm.Res. 21: 205-238,1965.
85. Koshiyama, H., Kato, Y., Inoue, T., Murakami, Y., Ishikawa, Y., Yanaiharu, N., and Imura, H. Central galanin stimulates pituitary prolactin secretion in rats: possible involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide. Neurosci.Lett. 75: 49-54,1987.
86. Krueger, J. M. Endogenous sleep factors. En: A. Wauquier and y. cols (Eds.), Sleep: Neurotransmitters and neuromodulators. Raven Press, New York, 1985a. pp. 319-331.
87. Krueger, J. M., Obal, F. J. r., Johansen, L., Opp, M. R., Toth, A. L., and Cady, B. A. Endogenous sleep factors: Relationships to physiological variables. En: (Ed.), Sleep and respiration. Wiley-Liss, Inc., 1990. pp. 1-8.
88. Krueger, J. M., Pappenheimer, J. R., and Karnovsky, M. L. The composition of sleep-promoting factor isolated from human urine. J.Biol.Chem. 257: 1664-1669,1982.
89. Krueger, J. M., Thot, L. A., Cady, A. B., Johansen, L., and Obal, F. J. r. Inmodulation and sleep. En: S. Inoue and Schneider-Helmort (Eds.), Sleep peptides: Basic and clinical approaches. Japan Sci.Soc.Press/Springer-Ver, Tokio-Berlin,1988. pp. 95-130.

90. Krueger, J. M., Walter, J., and Levin, C. Factor S and related somnogens: an immune theory for slow-wave sleep. En: D. J. McGinty (Ed.), Brain mechanisms of sleep. Raven Press, New York, 1985b. pp. 253-276.
91. Kruisbrink, J., Mirmiran, M., Van der Woude, T. P., and Boer, G. J. Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or VIP on circadian sleep-wake rhythm in the rat. Brain Res. 419: 76-87, 1987.
92. Larsson, L. I., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky, O., Sundler, F., and Hakanson, R. Localization of VIP to central and peripheral neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 73: 3197-3200, 1976.
93. Leveston, S. A., and Cryer, P. E. Endogenous cholinergic modulation of growth hormone secretion in normal and acromegalic humans. Metabolism. 29: 703-706, 1980.
94. Loren, I., Emson, P. C., Fahrenkrug, J., Bjorklund, A., Alumets, J., Hakanson, R., and Sundler, F. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. Neuroscience. 4: 1953-1976, 1979.
95. Luine, V. N., Rostene, W., Rhodes, J., and McEwen, B. S. Activation of choline acetyltransferase by vasoactive intestinal peptide. J. Neurochem. 42: 1131-1134, 1984.
96. Lundberg, J. M. Evidence for coexistence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine in neurons of cat exocrine glands. Acta. Physiol. Scan. 115: 525-528, 1982.
97. Lundberg, J. M., Anggard, A., Fahrenkrug, J., Lundgren, C., and Holinstedt, B. Co-release of VIP and acetylcholine in relation to blood flow and salivary secretion in cat submandibular salivary gland. Acta Physiol. Scan. 115: 525-528, 1982.
98. Lundberg, J. M., Hokfelt, T., Schultzberg, M., Uvnas-Wallensten, K., Khler, C., and Said, S. I. Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence from

- combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. Neuroscience 4: 1539-1559, 1979.
99. Maggistretti, P. F., Morrison, J. H., Shoemaker, W. J., Sapin, V., and Bloom, F. E. Vasoactive intestinal polypeptide induces glucogenolysis in mouse cortical slices: A possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 78: 6535-6539, 1981.
100. Maggistretti, P. J., and Schorderet, M. VIP and noradrenaline act synergistically to increase cyclic AMP in cerebral cortex. Nature 308: 280-282, 1984.
101. Magistretti, P. J. VIP neurons in the cerebral cortex. TIPS. 11: 250-254, 1990.
102. Makela, J. P., and Hilakivi, I. T. Evidence for the involvement of alpha-2 adrenoceptors in the sedation but not REM sleep inhibition by clonidine in the rat. Medical Biol. 64: 355-360, 1986.
103. Malhotra, R. K., Wakade, T. D., and Wakado, A. R. Vasoactive intestinal polypeptide and muscarinic mobilize intracellular Ca<sup>++</sup> through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. J.Biol.Chemistry. 263: 2123-2126, 1988.
104. Martin, J. L., Dietl, M. M., Hof, P. R., Palacios, J. M., and Magistretti, P. J. Autoradiographic mapping of [mono[125]iodo-Tyr] vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat brain. Neuroscience. 23: 539-565, 1987.
105. McGinty, D., and Symusiak, R. Neuronal unit activity patterns in behaving animals: brainstem and limbic system. Ann.Rev.Psychol. 39: 135-168, 1988.
106. McGinty, D. J., Harper, C. M., and Fairbanks, M. K. 5-HT-containing neurons: unit activity in behaving cats. En: J. Barchas and E. Usdin (Eds.), Serotonin and behavior. Academic Press, New York, 1973. pp. 267-279.
107. Mendelson, W. B., Gillin, J. C., and Wyatt, R. J. Studies with the delta sleep-inducing peptide in the rat. Sleep Res. 9: 55, 1980.

108. Mendelson, W. B., Sitaran, N., Wyatt, R. J., Gillin, J. C., and Jacobs, C. S. Methoscopolamine inhibition of sleep related GH secretion: evidence for a cholinergic secretory mechanism. J.Clin.Investigation. 61: 1683-1690, 1978.
109. Mendelson, W. B., Slater, S., Gold, P., and Gillin, J. C. The effect of growth hormone administration on human sleep. Biol Psychiatry 15: 613-618, 1980.
110. Mirmiran, M., Kruisbrink, J., Bos, N.P.A., Van der Werf, D., and Boer, G. J. Decrease of rapid-eye-movement sleep in the lighth by intraventricular application of a VIP-antagonist in the rat. Brain Res. 458: 192-194, 1988.
111. Mo, N., and Dun, N. J. Vasoactive intestinal polypeptide facilitates muscarinic transmission in mammalian symphathetic ganglia. Neurosci.Lett. 52: 19-23, 1984.
112. Monnier, M., Hatt, A. M., Cueni, L. B., and Schoenenberger, G. A. Humoral transmission of sleep. VI. Purification and assessment of a hypnogenic fraction of "sleep dialyzate" (Factor Delta). Pflugers Arch. 331: 257-265, 1972.
113. Monnier, M., Koller, T., and Graber, S. Humoral influences of induced sleep and arousal upon electrical brain activity of animals whit crossed circulation. Exp.Neurol. 8: 264-277, 1963.
114. Morin, A., Denoroy, L., and Jouvet, M. Daily variations in concentration of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in discrete brain areas of the rat. Brain Res. 538: 136-140, 1991.
115. Morin, J. A., Denoroy, L., and Jouvet, M. Effect of paradoxical sleep deprivation on vasoactive intestinal peptide-like.Immunoreactivity in discrete brain areas and anterior pituitaria of the rat. Brain Res.Boll. 28: 665-661, 1992.
116. Moruzzi, G., and Magoun, H. W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. Electroenceph.Clin.Neurophysiol. 1: 455-473, 1949.

117. Mouret, J., Froment, J. L., Bobillier, P., and Jouvét, M. Etude neuropharmacologique et biochimique des insomnies provoquées par la PCPA. J. Physiol. (Paris). 59: 463, 1967.
118. Murakami, M., Vinayek, R., Jensen, R. T., and Gardner, J. D. Carbachol-induced down-regulation of high-affinity receptors for vasoactive intestinal peptide. Am. J. Physiol. 257: 402-408, 1989.
119. Mutt, V. Vasoactive intestinal polypeptide and related peptides: isolation and chemistry. En: S. I. Said and V. Mutt (Eds.), Vasoactive intestinal peptide and related peptides. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1988. pp. 1-20.
120. Nagasaki, H., Iriki, M., and Uchizono, K. Inhibitory effect of the brain extract of sleep-deprived rats (BE-SDR) on the spontaneous discharges of cryfish abdominal ganglion. Brain Res. 109: 202-205, 1976.
121. Nagasaky, H., Iriki, M., Inoue, S., and Uchizono, K. The presence of a sleep promoting material in the brain of sleep-deprived rats. Proc. Jpn. Acad. 50: 241-246, 1974.
122. Nagasaky, H., Kitahama, K., Valatx, J. L., and Jouvét, M. Sleep-promoting effect of the sleep-promoting substance (SPS) and delta sleep-inducing peptide (DSIP) in the mouse. Brain Res. 192: 276-280, 1980.
123. Nauta, W. J. H. Hypotalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. J. Neurophysiol. 9: 285-316, 1946.
124. Obal, F., Sory, G., Alfoldi, P., Rubicsek, G., and Obal, F. J. r. Vasoactive intestinal polypeptide promotes sleep without effects on brain temperature in rats at night. Neurosci. Lett. 64: 236-240, 1986a.
125. Obal, F. J. r. Effects of peptides (DSIP, DSIP analogues, VIP, GRF and CCK) ON sleep in the rat. Clin. Neuropharmacol. 9(4): 459-461, 1986.
126. Obal, F. J. r., Opp, M., Cady, B. A., Johannsen, L., and Krueger, J. M. Prolactin, vasoactive intestinal peptide and peptide histidine methionine elicit selective increases in REM sleep in rabbits. Brain Res 490: 292-300,

1989.

127. Obal, F. J. R., Payne, L., Kacsch, B., Alfoldi, P., Opp, M., Kapas, L., and Krueger, J. M. Promotion of REM sleep by prolactin in the male rat. J. of Sleep Res. 11th European congress on Sleep Res. 5-10 July, 1992. Helsinki, Finland. 1,1992.
128. Obata-Tsuto, H. L., Okamura, H., Tsuto, T., Terubayashi, H., Fukui, K., Yanaihara, N., and Iбата, Y. Distribution of the VIP-like immunoreactivity neurons in the cat Central Nervous System. Brain Res. Bull. 10: 653-660,1983.
129. Ohta, H., Kato, Y., Shimatsu, A., Tojo, K., Kabayama, Y., Inoue, T., Yanaihara, N., and Imura, H. Inhibition by antiserum to vasoactive intestinal polypeptide (VIP) of prolactin secretion induced by serotonin in the rat. Eur.J.Pharmacology. 109: 409-412,1985.
130. Orr, W. C., Vogel, G. W., Stahl, M. L., Griffiths, W. J., and Seely, J. R. Sleep patterns in growth hormone deficient children and age-matched controls: Developmental considerations. Neuroendocrinology 24: 347-352,1977.
131. Oswald, I. Human brain proteins, drugs and dreams. Nature 223: 893-897, 1969.
132. Pacheco-Cano, M. T., Garcia-Hernandez, F., Prospero-Garcia, O., and Drucker-Colin, R. Vasoactive intestinal polypeptide induces REM recovery in insomniac forebrain lesioned cats. Sleep 13(4): 297-303,1990.
133. Pappenheimer, J. R., Miller, T. B., and Goodrich, C. A. Sleep promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep deprived goats. Proc.Nat.Acad.Sci. 58: 543-547,1967.
134. Peters, J. R., Evans, P. S., Page, M. D., Hall, J. T., Gibbs, J. T., Dieguez, C., and Scanlon, M. F. Cholinergic muscarinic receptor blockade with pirenzepine abolishes slow wave sleep-related growth hormone release in normal adult males. Clinical.Endocrinol. 25: 213-217,1986.

135. Petit, J. M., Denoroy, L., and Jouvét, M. Effects of chronic atropine administration on regional vasoactive intestinal polypeptide concentrations in rat brain. Eurp.J.Pharmacol. 212: 79-85,1992.
136. Petitjean, F., Buda, C., Janin, M., Sallanon, M., and Jouvét, M. Insomnie par administration de parachlorophénylalanine réversible par injection périphérique on centrale de 5-hydroxytryptophane et de sérotonine. Sleep 8: 56-57,1985.
137. Pieron, H. Le problème physiologique de sommeil, Masson. Paris. :,1913.
138. Prospero, O., Jimenez, A., and Drucker-Colin, R. Factores inductores de sueño. En: G. Buéla-Casal and J. F. Navarro-Humanes (Eds.), Avances en la investigación del sueño. Siglo XXI, España, 1989. pp. 105-126.
139. Prospero-García, O., Morales, M., Arankowsky-Sandoval, G., and 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.
140. Pujol, J. F., Mouret, J., Jouvét, M., and Glowinski, J. Increased turnover of cerebral norepinephrine during rebound of paradoxical sleep in the rat. Science 159: 112,1969.
141. Pujol, J. F., Mouret, M., Jouvét, M., and Glowinski, G. Increased turnover of cerebral norepinephrine during rebound of paradoxical sleep in the rat. Science 159: 220-226,1969.
142. Quik, M., Iversen, L. L., and Bloom, S. R. Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and other peptides on cAMP accumulation in rat brain. Biochem. Pharmacol. 27: 2209-2213,1978.
143. Rampin, C., Cespuglio, R., Chastrette, N., and Jouvét, M. Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. Neurosci.Lett. 126: 113-118,1991.

144. Ranson, S. W. Somnolence caused by hypothalamus lesion in the monkey. Arch Neurol.Psychiat. 41: 1-23,1939.
145. Rechtschaffen, A., Lovell, R. A., Freedman, D. X., Whitehead, W. E., and Aldrich, M. The effect of parachlorophenylalanine on sleep in the rat: some implications for the serotonin-sleep hypotesis. En: J. Barchas and E. Usdin (Eds.), Serotonin and behavior. Academic Press, New York, 1973. pp. 401-418.
146. Rechtschaffen, A., and Kales, A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects., BIS/BRI, UCLA., Los Angeles, CA, 1968.
147. Riou, F., Cespuglio, R., and Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat: I peptides decreasing paradoxical sleep. Neuropeptides 2: 243-254, 1982a.
148. Riou, F., Cespuglio, R., and Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat: II peptides without significant effect on the sleep-waking cycle. Neuropeptides. 2: 255-264, 1982b.
149. Riou, F., Cespuglio, R., and Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat: III the hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide. Neuropeptides. 2: 265-277, 1982c.
150. Roffwarg, H. P., Muzio, J. N., and Dement, W. C. Ontogenetic development of the human sleep dream cycle. Science. 152: 604-619, 1966.
151. Rojas-Ramirez, J. A., Aguilar-Jimenez, E., Posadas-Andrews, A., Bernal-Pedraza, J., and Drucker-Colin, R. The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep-wake cycle of rats. Psychopharmacol. 53: 147-150, 1977.
152. Rojas-Ramirez, J. A., and Drucker-Colin, R. Sleep induced by spinal cord cholinergic stimulation. Intern.J.Neuroscience. 5: 212-221, 1973.
153. Rostene, W. H., Fischette, C. T., Rainbow, T. C., and McEwen, B. S. Modulation by vasoactive intestinal peptide of serotonin receptors in the dorsal hippocampus of the rat brain: an autoradiographic study. Neurosci.



Lett. 37: 143-148,1983.

154. Said, S. I., and Mutt, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. Science 169: 1217-1218,1970.
155. Said, S. I., and Rosenberg, R. N. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. Science 192: 907-908,1976.
156. Salin Pascual, R. J., and Ortega Soto, H. Manual de Psicoquímica: Bases farmacológicas., CEDIS, S.A. de C.V., Mexico, D.F., 1989, p. 230.
157. Sallanon, M., Buda, C., Janin, M., and Jouvet, M. Restoration of paradoxical sleep by cerebrospinal transfer to PCPA pretreated insomniac cats. Brain Res. 251: 137-147,1982.
158. Sallanon, M., Janin, M., Buda, C., and Jouvet, M. Serotonergic mechanisms and sleep rebound. Brain Res. 268: 95-104,1983.
159. Sassin, J. F., Parker, D. C., Mace, J. W., Gottin, R. W., Jhonson, L. C., and Rossman, L. G. Human growth hormone release: relation to slow wave sleep and sleep waking cycles. Science 165: 513-515,1969.
160. Schaad, N. C., Schorderet, M., and Magistretti, P. J. Prostaglandins and the synergism between VIP and noradrenaline in the cerebral cortex. Nature 328: 637-640,1987.
161. Schneider-Helmert, D. DSIP: Clinical application of the programming effect. En: S. Inoue and Schneider-Helmert (Eds.), Sleep peptides: Basic and clinical approaches. Japan Sci.Soc.Press/Springer-Ver, Tokio-Berlin, 1988. pp. 175-198.
162. Schoenenberger, F. A., Cueni, L. B., Monnier, M., and Hatt, A. M. Humoral transmission of sleep. VII Isolation and physicochemical characterization of the "sleep inducing factor delta". Pfluegers Arch. 338: 1-17,1972.
163. Schoenenberger, F. A., and Monnier, M. Characterization of delta-electroencephalogram (sleep) inducing-peptide. Proc.Natl.Acad.Sci. 74: 1282-

- 1286,1977.
164. Segal, M. B., and Pollay, H. The secretion of cerebrospinal fluid. Exp. Eye. Res., Suppl. 127: 321-327,1977.
165. Shimatsu, A., Kato, Y., Katakami, H., Yanaihara, N., and Imura, H. Serotonin stimulates vasoactive intestinal polypeptide from rat hypothalamus in vitro. Brain Res 264: 148-151,1983.
166. Shimatsu, A., Kato, Y., Matsushita, N., Katakami, H., Yanaihara, N., and Imura, H. Stimulation by serotonin of vasoactive intestinal polypeptide release into rat hypophysial portal blood. Endocrinol. 111: 338-340.,1982.
167. Shiromani, P. J., Armstrong, D. M., and Gillin, J. C. Cholinergic neurons from the dorsal-lateral pons project to the medial pons: a WGA-HRP and choline acetyltransferase immunohistochemical study. Neurosci. Lett. 95: 19-23,1988.
168. Shiromani, P. J., Overstreet, D., Levy, D., Goodrich, C., Campbell, S. S., and Gillin, J. C. Increased REM sleep in rats genetically bred for cholinergic hyperactivity. Neuropsychopharmacol. 1: 127-133,1988 b.
169. Shute, C. C. D., and Lewis, P. R. The ascending cholinergic reticular system neocortical, olfactory and subcortical projections. Brain 90: 497-520,1967.
170. Siegel, J., and Gordon, T. P. Paradoxical sleep: deprivation in the cat. Science 148: 978-980,1965.
171. Siegel, J. M., and Rogawski, M. A. A function for REM sleep: regulation of noradrenergic receptor sensitivity. Brain Res. 13: 213-233,1988.
172. Sitaram, N., and Gillin, J. C. Development and use of pharmacological probes of the CNS in man: evidence of cholinergic abnormalities in primary affective illness. Biol. Psychiatry. 15: 925-955,1980.
173. Sitaram, N., Wyatt, R. J., Dawson, S., and Gillin, J. C. REM sleep induction by physostigmine infusion during sleep. Science. 191: 1281-1283,1976.

174. Smith, C. Sleep states and learning: A review of the animal literature. Neurosci. Biobehav. Rev. 9: 157-168, 1985.
175. Spanis, C. W., Gutierrez, M. C., and Drucker-Colin, R. Neurohumoral correlates of sleep: further biochemical and physiological characterization of sleep perfusates. Pharmacol. Biochem. Behav. 7: 345-352, 1971.
176. Starzl, T. E., and Taylor, C. W. Ergeb. Physiol. 64: 1-165, 1972.
177. Staun-Olsen, P., Fahrenkrug, J., Gammeltoft, S., Ottesen, B., and Schousboe, A. Development of binding sites for vasoactive intestinal polypeptide in mouse cerebral cortex and cultured cortical neurons. Int. J. Dev. Neurosci. 3: 609-616, 1985.
178. Stein, D., Jouvet, M., and Pujol, J. F. Effects of alfa-methyl-p-tirosine upon cerebral amine metabolism and sleep states in the cat. Brain Res. 72: 360-365, 1979.
179. Serman, M. B., and Clemente, C. D. Forebrain inhibitory mechanism: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. Exp. Neurol. 6: 103-117, 1962a.
180. Serman, M. B., and Clemente, C. D. Forebrain inhibitory mechanism: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. Exp. Neurol. 6: 91-102, 1962b.
181. Stern, W. C., Jalowiec, E., Shobshalowitz, H., and Morgane, P. J. Effects of growth hormone on sleep-waking patterns in cat. Horm. Behav. 6: 189-196, 1975.
182. Stern, W. C., and Morgane, P. J. Theoretical view of REM sleep function: maintenance of catecholamine systems in the central nervous system. Behav. Biol. 11: 1-32, 1974.
183. Takahashi, J. S., and Turek, F. W. Anisomysin, an inhibitor of protein synthesis, perturbs the phase of mammalian circadian pacemaker. Brain Res 405: 199-203, 1987.

184. Takahashi, Y., Kipnis, D. M., and Danghaday, W. H. Growth hormone secretion during sleep. J.Clin.Invest. 47: 2079-2090,1968.
185. Taylor, B. J., Smith, P. J., and Brook, C. G. D. Inhibition of physiological growth hormone secretion by atropine. Clinical.Endocrinol. 22: 497-501,1985.
186. Ursin, R., and Sterman, M. B. A manual for standard scoring of sleep and waking states in the adult cat., UCLA Pub. Services. Depto., Los Angeles, CA, 1981.
187. Van den Pol, A. N., and Powley, T. A fine-grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of feeding and drinking. Brain Res. 160: 307-326,1979.
188. Velluti, R., and Hernandez-Peon, R. Atropine blockade within a cholinergic hypnogenic circuit. Exp.Neurol. 8: 20-29,1963.
189. Vertes, R. P. Brain stem control of the events of REM sleep. Prog. Neurobiol. 22: 241-288,1984.
190. Vogel, G. W. A review of REM sleep deprivation. Arch.Gen.Psychiatry. 32: 749-761,1975.
191. Von Economo, C. Sleep as a problem of localization. J.Nerv.Ment.Dis. 7: 249-259,1930.
192. Wang, J. W., Yarsh, J. L., and GovL Studies on the basal and evoked release of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide from cat cerebral cortex and periventricular structures. Brain Res. 280: 105-117,1983.
193. Wang, J. Y., Tony, L., Yaksh, G., Hart, J., and Vay, L. W. Neurotransmitter modulation of VIP release from cat cerebral cortex. Am.J.Physiol. 250: 104-111,1986.
194. Woolf, N. J., and Batcher, L. L. Cholinergic systems in the rat brain IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmental. Brain Res. Bull. 23: 519-523,1989.