

58
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

=====

FACULTAD DE CIENCIAS

**MAPEO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL POR MEDIO
DE LA EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN *c-fos* EN EL DIENCEFALO
EN RELACION A LA DURACION DEL SUEÑO DE MOVIMIENTOS
OCULARES RAPIDOS (SMOR)**

TESIS

Que para obtener el Título de

BIOLOGO

Presenta

FABIO ALFREDO GARCIA GARCIA

Director de Tesis: Dr. RENE RAUL DRUCKER COLIN

MEXICO, D.F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CIUDAD UNIVERSITARIA

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante FABIO
ALFREDO GARCIA GARCIA
con número de cuenta 8618901-5 con el título: MAPEO DE LA ACTI-
VIDAD NEURONAL POR MEDIO DE LA EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN c-fos EN EL DIENCEFALO
EN RELACION A LA DURACION DEL SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS (SMOR).

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
BIOLOGO.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

DR. RENE RAUL DRUCKER COLIN

Director de Tesis
DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA

DR. ROBERTO SANCHEZ OLEA

Men IBB IGNACIO CAMACHO ARROYO

Suplente
DR. JESUS MANUEL LEON CAZARES
Suplente

FIRMA

DEDICATORIAS:

DEDICO ESTE TRABAJO A MI MADRE CONSUELO GARCIA VDA. DE GARCIA POR SER UNA MUJER EXCEPCIONAL, POR ENSEÑARME QUE UNO DE LOS VALORES MAS IMPORTANTES DE TODO HOMBRE ES LA DIGNIDAD Y EL TRABAJO JUSTO. PORQUE ERES UNA MUJER FUERTE CAPAZ DE DERRIBAR EL MUNDO, GRACIAS POR TODO LO QUE ME HAZ DADO.

A LA MEMORIA DE MI PADRE JOSE GARCIA ,POR SU FORTALEZA Y SU CONVICCIONES, PORQUE DONDE QUIERA QUE ESTES ESTOY ORGULLOSO DE SER TU HIJO.

AGRADECIMIENTOS:

A MIS HERMANOS, PACO, PEPE, RAFA. CARMEN Y PATY PORQUE TODOS SON TRIUNFADORES A SU MANERA. POR AYUDARME DURANTE MIS CUATRO AÑOS DE FORMACION ACADEMICA.

A ISRAEL PORQUE ERES UN TRIUNFADOR, POR SER LA ULTIMA SEMILLA EN GERMINAR.

A ALETTE POR SER PARTE DE MI.

A JOSE LUIS GONZALES-PALACIOS POR SUS 12 AÑOS DE AMISTAD, POR SER MI MEJOR AMIGO.

A MIS AMIGOS SINCEROS, PATY URIOSTEGUI, GUADALUPE RAMIREZ, NORMA CASTILLO, EDUARDO JIMENEZ Y MARCO ANTONIO GARCIA PORQUE A PESAR DE LA DISTANCIA SIEMPRE ESTAREMOS JUNTOS.

A MIS AMIGOS DE CIENCIAS, DONDE PASE UNA DE LAS ETAPAS MAS INCREIBLES DE MI VIDA A, MARI, VERONICA, BETSABET, PATY, NORMA, MARIELENA, CLAUDIA, LETY, RAUL. VICTOR, LEONEL Y HUGO (BUENA PARTE DE ESTE TRABAJO TE LO DEBO, GARCIAS).

A ELIZABETH MAYEN POR SER ALGUIEN ESPECIAL.

A MIS AMIGOS (EN ETAPA DE BLASTULA) CONSUELO MORGADO Y LUIS BELTRAN.

A HUGO MERCHANT-NANCY POR HABERME ENSEÑADO ALGO DE LO MUCHO QUE SABE, POR TU PARTICULAR FORMA DE VER LA CIENCIA Y LA INVESTIGACION, POR TUS CRITICAS Y COMENTARIOS.

A ANABEL JIMENEZ-ANGUIANO, POR SER MI AMIGA, POR AYUDARME Y DARMER ANIMOS SIEMPRE QUE LO NECESITE, PORQUE CON TUS COMENTARIOS LOGRASTE HACER DE ESTE TRABAJO ALGO DIFERENTE.

**A LA GENTE QUE FORMA Y A FORMADO PARTE DE LA INVESTIGACION EN SUEÑO,
RAFAEL SALIN, JACKI, TOÑO, ADRIAN, NORMA Y CONSTANZA**

**A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO:
LETY, ALICIA, MARCELA, LOLITA, ADRIANA, TERE, MARGARITA FERNANDO,
RUBEN, CHUCHO, FELIX, ADALBERTO Y JOSE LUIS (POR AYUDARME EN LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO, GRACIAS).**

**A EL Dr. RENE RAUL DRUCKER-COLIN POR HABERME DADO LA OPORTUNIDAD DE
FORMAR PARTE DE SU EQUIPO DE TRABAJO, POR SER UN INVESTIGADOR CON
OTRA FORMA DE PENSAR.**

**A EL Dr. LEON-CAZARES, ANTES QUE NADA POR HABER SIDO MI MAESTRO, POR
ENSEÑARME QUE ANTES QUE NADA HAY QUE SER PERSONA, GRACIAS POR SUS
CONSEJOS Y POR BRINDARME SU AYUDA SIEMPRE QUE LA NECESITE.**

A LOS SINODALES DE ESTA TESIS:

**Dr. RENE RAUL DRUCKER-COLIN
Dra. MARIA LUISA FANJUL-PEÑA
Dr. ROBERTO SANCHEZ-OLEA
Dr. JESUS MANUEL LEON-CAZARES
M. en IBB. IGNACIO CAMACHO ARROYO**

EUROSLEEP '94 12th Congress of the European Sleep Research Society, Firenze, May 22-27 1994

TOP OF ABSTRACT

NEURONAL ACTIVITY MAPPING OF THE EXPRESSION OF C-FOS IN THE DIENCEPHALON IN RELATION TO REM SLEEP DURATION. F. García-García, R. Merchant-Nancy, J. Vázquez and R. Drucker-Colín. Instituto de Fisiología Celular and Dept. de Fisiología, Fac. de Medicina, UNAM, México, D.F.

Previous experiments have shown that auditory stimulation (AS) applied during REM sleep (RMS) increases the duration of this phase in a manner similar to that seen after RDM deprivation (SD). It has been suggested that the increment of RMS, by various manipulations is due to changes in the levels of neuronal excitability in a variety of brainstem structures (BS). However, the diencephalon has been suggested as having a regulatory role in the mechanisms of the sleep-wake cycle. Previous studies have shown that lesions of the preoptic area produce insomnia and stimulation induces sleep. On the other hand, lesions of the lateral hypothalamic area produce hypersomnia. In a former study, Fos-immunoreactivity (FI) was observed to be increased in various brainstem nuclei in relation to RMS duration. The objective of the present work was to determine the number of FI cells in various nuclei of the diencephalon in animals with spontaneous RMS periods or RMS increased by AS or SD. Male Wistar rats were implanted for conventional sleep recordings. After one week recuperation and 3 days of habituation, 3 groups were formed. In Control (n=6) and AS (n=6) groups, the rats were maintained awake for 3 hours and the SD (n=6) group was sleep deprived for 48 hours. Subsequently, the 3 groups were recorded until 3 RMS periods were observed. The AS group received a stimulus of 80 db, 20 ms, 1 kHz, every 20 sec during each RMS presented throughout the recording. Thirty minutes after the recording session ended, the animals were perfused and the brains were processed for immunohistochemistry, with antibody pp55 c-fos donated by Tom Curran (Roche Institute). FI cells were quantified by a computerized imaging analyzer. The results showed that only those nuclei shown in Table 1 presented increases in FI under AS and SD conditions. However, structures considered hypogenic, such as the preoptic area, diagonal band of Broca and substantia innominata did not present any significant increase in FI.

	Control	AS	SD
LH	4.66 ± 4.18	11.00 ± 4.18*	16.5 ± 4.3*
DA	9.83 ± 3.2	28.00 ± 4.8 *	16.8 ± 5.8
SCN	19.66 ± 6.02	48.00 ± 6.1 *	28.5 ± 3.2*
BLA	30.33 ± 7.18	62.00 ± 12.3 *	34.6 ± 9.8*

Table 1. This table shows the mean number of FI cells expressed in various structures of the diencephalon between control and AS or SD conditions (* p < 0.05).

These results suggest that the mechanism of RDM maintenance may not be directly related to neuronal activity of the above mentioned diencephalic areas. However, the diencephalon does play an important role in the circadian sleep-wake cycle, wakefulness, as well as thermoregulation, which may explain the levels of Fos expression in areas such as the suprachiasmatic nucleus (SCN), the lateral hypothalamic area (LH), and the dorsolateral hypothalamic nucleus (DA), the basolateral amygdaloid (BLA).
diencephalon, c-fos, REM sleep.

By Author:

FARID, ALFREDO, GARCIA GARCIA

for correspondence: FACULTAD DE MEDICINA, APARTADO POSTAL 70-730, MEXICO, D.F., C.P. 06510, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.....

TEL:

FAX:

**ESTE TRABAJO SE PRESENTO EN EL 12TH
CONGRESS OF THE EUROPEAN SLEEP RESEARCH
SOCIETY, CELEBRADO EN FIRENZE, ITALIA DEL 22 AL
27 DE MAYO DE 1994.**

INDICE

INTRODUCCION	1
ASPECTOS GENERALES DEL CICLO VIGILIA SUEÑO	7
NEUROANATOMIA FUNCIONAL DE CICLO VIGILIA SUEÑO	7
Aspectos generales	7
Desincronización cortical	15
Actividad Theta Hipocampal	15
Atónia muscular	16
Espigas Ponto-Geniculo-Occipitales	16
ESTIMULACION AUDITIVA Y PRIVACION DEL SUEÑO	21
ESTRUCTURAS DIENCEFALICAS Y SU RELACION CON EL CICLO VIGILIA SUEÑO	27
EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN c-fos PARA MAPEO METABOLICO A NIVEL CELULAR	39
OBJETIVO	45
MATERIALES Y METODOS	46
RESULTADOS	49
DISCUSION	59
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA	67

RESUMEN

Se ha demostrado que la estimulación auditiva (EA) aplicada durante el sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR) incrementa la duración de esta fase. Este efecto también se ha observado durante el período de rebote de sueño, posterior a la privación de SMOR (PS). Estudios electrofisiológicos han sugerido que el incremento en el SMOR por ambas manipulaciones es debido a cambios en la excitabilidad neuronal de varias estructuras del tallo cerebral. Adicionalmente se ha demostrado que no solo el tallo cerebral sino también el diencéfalo y en particular algunas núcleos hipotálamicos forman parte del mecanismo de regulación del ciclo vigilia-sueño.

Por otra parte recientes investigaciones han demostrado que la expresión de la proteína Fos es útil en la construcción de mapas de activación post-sináptica relacionado con la activación de cascadas de segundos mensajeros y con resolución celular. Permitiendo con ello explicar procesos fisiológicos a partir del mapeo de las regiones cerebrales que intervienen en dicho fenómeno. En el presente trabajo se cuantificó el número de células inmunoreactivas a Fos en el diencéfalo, en animales que presentaron períodos de SMOR control y en aquellos que mostraron un aumento en la duración de esta fase, ya sea por EA o PS.

Se implantaron ratas macho de la capa Wistar para registros convencionales de sueño. Después de una semana de recuperación y 3 sesiones de habituación se formaron tres grupos. En los primeros 2 (control n=6 y EA n=6), los animales se mantuvieron despiertos durante 3 horas, mientras que en el tercer grupo (PS n=6) los animales se privaron durante 48 horas con el método del tanque. Posteriormente los 3 grupos fueron registrados hasta que se observaron 3 períodos de SMOR. Al grupo de EA se le aplicó un estímulo de 80 dB, 20 milisegundos de duración, 1 kHz, cada 10 seg, durante los tres períodos de SMOR

registrados. Después de 30 minutos de sobrevivencia posteriores al registro, los animales se perfundieron y sus cerebros se procesaron para inmunohistoquímica ABC, con el anticuerpo pp55 c-fos. El número de células que expresaron Fos se cuantifico con ayuda de un analizador computarizado de imágenes.

Los resultados muestran que la EA y la PS incrementan los niveles de expresión de Fos en algunas áreas del diencefalo y en particular en núcleos hipotálamicos que mantienen alguna relación con el ciclo vigilia-sueño. Estos resultados sugieren que la distribución de las células REM-on, no es exclusiva de tallo cerebral sino que se encuentran distribuidas en otras áreas del cerebro. Así mismo, el mantenimiento de la fase de SMOR no depende únicamente de la activación de estos grupos neuronales, sino del reclutamiento de otras neuronas que participan en la regulación de este fenómeno.

ABREVIACIONES

AchE	- Acetilcolinesterasa
Ach	- Acetilcolina
AMPC	- Monofosfato de Adenosina Cíclico
AP	- Area Preóptica
BDB	- Banda Diagonal de Broca
DA	- Núcleo Dorsolateral Hipotalámico
EA	- Estimulación Auditiva
EEG	- Electroencefalograma
EMG	- Electromiograma
EOG	- Electrooculograma
FRM	- Formación Reticular Mesencefálica
FRP	- Formación Reticular Pontina
IF	- Inmunoreactividad para Fos
LC	- Locus Coeruleus
LCa	- Locus Coeruleus alfa
LCR	- Líquido Cefalorraquídeo
LDTg	- Núcleo Laterodorsal Tegmental
LH	- Area Lateral Hipotalámica
MCID	- Analizador Computarizado de Imágenes
Mc	- Núcleo Magnocelular
MgRF	- Núcleo Reticular Magnocelular
nBM	- Núcleo Basal de Meynert
NE	- Noradrenalina
nPV	- Núcleo Paraventricular Hipotalámico
PB	- Núcleo Parabraquial
PCPA	- Paraclorofenilalanina
PGO	- Espigas Ponto-Geniculo-Occipitales
pLC	- Núcleo PeriLocus Coeruleus

PPT	- Núcleo Pedúnculo Pontino
PS	- Privación de sueño MOR
REM-on	- Neurona que presenta actividad tónica durante el SMOR
REM-off	- Neurona que presenta actividad tónica durante la vigilia
RPO	- Núcleo Pontis Oralís
RPC	- Núcleo Pontis Caudalis
SI	- Substancia Innomínata
SL	- Sueño de ondas lentas o sueño lento
SMOR	- Sueño de Movimientos Oculares Rápidos
SO	- Núcleo Supraóptico
SRAA	- Sistema Reticular Activador Ascendente
V	- Vigilia
VIP	- Polipéptido Vasoactivo Intestinal
2DG	- 2-Desoxiglucosa
5-HT	- 5-Hidroxitriptamina o serotonina

INTRODUCCION

El hombre es por naturaleza el único de los animales de la escala filogenética que se ve en la necesidad de preguntarse sobre las cosas que le rodean, el participar en la reproducción y control de los diferentes fenómenos que provocan su interés y de dar una respuesta lógica que permita explicarlos dentro del margen de la realidad. Gracias a ello el hombre a avanzado pasos gigantescos en el fortalecimiento del conocimiento científico.

Hoy en día una de las ramas de la ciencia más importantes en el progreso de la humanidad es la biología, cuyos aportes han permitido formar una base sólida de conocimientos y creatividad que no tiene precedentes. Una parte de la biología es la neurobiología cuyo objeto central de estudio es el sistema nervioso. Como el objetivo es tan amplio se han tenido que sistematizar sus áreas de estudio y formar recursos humanos de investigación especializados, dedicados a resolver y entender un determinado problema. De ahí que se hayan acuñado términos como neurobiología del ciclo vigilia-sueño, cuyo objetivo de interés consiste en explicar, que estructuras cerebrales participan en el mantenimiento y generación del sueño, así como que relación hay con otras variables fisiológicas. Este trabajo forma parte de ese gran número de esfuerzos, que buscan una respuesta con diferentes aproximaciones a dicho fenómeno.

El dormir, es un fenómeno biológico que fue considerado durante mucho tiempo como un estado pasivo y homogéneo, debido a que se perdía una interacción con el medio. Actualmente el sueño se concibe como un estado heterogéneo resultado de la interacción activa de algunas áreas específicas del cerebro. Para poder conceptualizar dicho fenómeno fue necesario un número de investigaciones, entre los que destacan los trabajos de Piéron y sus colaboradores que en 1913 postularon que la inducción del sueño se debía a la acumulación de factores humorales denominados hipnohormonas, que se generaban durante la vigilia y eran las responsables de inducir las diferentes fases del sueño.

Con el desarrollo del primer electroencefalograma en 1929, por Hans Berger (citado en Drucker-Colín, 1990) se abrió un nuevo campo en la investigación del sueño, ya que se permitió establecer una estrecha correlación entre los patrones electroencefalográficos y las diferentes fases del ciclo sueño-vigilia. Gracias a este descubrimiento en 1953 Aserinsky y Kleitman identificaron un período de sueño con un patrón de actividad cortical muy parecido al de la vigilia, sugiriendo con ello que el sueño no era un estado uniforme, sino, que estaba compuesto por patrones de actividad cortical, que variaban conforme el individuo dormía. Esta nueva fase de sueño se denominó sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR) o sueño paradójico término que fue originalmente acuñado por Jouvet y Michael en 1959.

ASPECTOS GENERALES DEL CICLO VIGILIA-SUEÑO

Actualmente los criterios para definir las diferentes fases del ciclo vigilia-sueño, se reconocen por medio de la observación de cambios conductuales y variables polisomnográficas entre las que tenemos: el electroencefalograma (EEG), electrooculograma (EOG), y el electromiograma (EMG). A partir de estas variables se han definido criterios para identificar las diferentes fases del ciclo vigilia-sueño. Estas fases se han estandarizado y de acuerdo con Takeuchi (1970) que baso sus estudios en la rata, que es uno de los mamíferos más utilizados en los estudios del sueño, el ciclo vigilia-sueño se divide en (Figura 1):

1) Vigilia (V). La actividad EEG es rápida, con frecuencias entre los 10 a los 20 Hz y con una amplitud de 30 a 50 μv . El EOG y el EMG presentan una actividad alta y dependen de la conducta del animal.

2) Sueño Lento (SL). Se observan husos de sueño en el EEG, caracterizados por una frecuencia de 10 a 13 Hz, asociados a una actividad lenta de alto voltaje (100 a 200 μv). El tono muscular disminuye pero no desaparece.

3) Sueño MOR (SMOR). Esta fase de sueño se caracteriza por una actividad theta hipocampal marcadamente rítmica, cuya frecuencia varía entre los 6 a 9 Hz. La actividad electroencefalográfica presenta ondas rápidas y de baja amplitud, similar a la actividad cerebral de la vigilia. La actividad muscular se pierde, aunque se presentan mioclonías, que son movimientos fásicos de las extremidades, el EOG presenta una actividad en forma de salvas. Tanto para el sueño lento como para el sueño MOR la rata permanece sobre su vientre, con las cuatro extremidades flexionadas y la cabeza inclinada sobre el tórax.

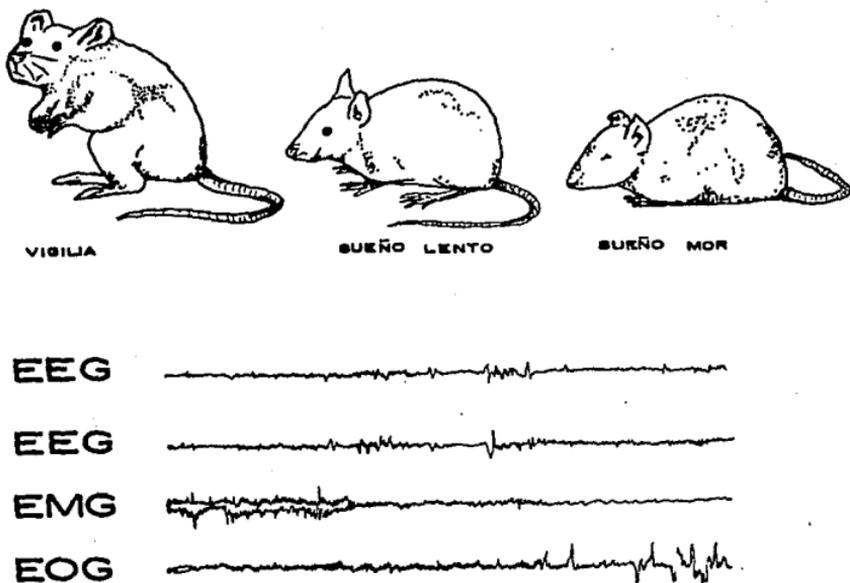


Figura 1. Patrón polisomnográfico de la vigilia, sueño lento y sueño MOR de la rata. observese la desincronización cortical, los movimientos oculares rapidos y la atonía muscular característica de la fase de sueño MOR.

Los fenómenos que ocurren durante el SMOR pueden ser clasificados en tónicos y fásicos (Drucker-Colín y col, 1981). Los tónicos se refieren a características que definen al SMOR, como la actividad EEG y la supresión de la actividad del EMG. Los fásicos son de corta duración e incluyen los movimientos oculares, las mioclonías y las espigas PGO que son potenciales de campo monofásicos que se registran, en el puente, el cuerpo geniculado lateral y la corteza occipital durante la fase de SMOR del gato (Jouvet, 1965).

Durante el ciclo sueño-vigilia, no sólo cambian las variables polisomnográficas, vistas con anterioridad, sino que también hay cambios en otras variables fisiológicas como:

1) Sistema Endocrino. Se ha demostrado que los niveles de secreción de diferentes hormonas sufren ciertas modificaciones durante las diferentes fases del ciclo vigilia-sueño. Por ejemplo la secreción de prolactina aumenta a lo largo de los períodos de sueño lento (Sassin y col, 1972) En cambio la hormona estimulante de la tiroides, así como el cortisol disminuyen en cuanto aparece el sueño lento e inicia el SMOR (Wietzman, 1976). La hormona luteinizante (LH) y la testosterona presentan un ligero aumento en su liberación durante el SMOR, en individuos adultos. En la pubertad la secreción de LH no mantiene su aumento directo, en relación al las fases del sueño (Boyer y col, 1972). Asimismo la secreción de la hormona del crecimiento aumenta en las primeras fases de la noche, cuando inicia el sueño lento y permanece durante las dos primeras horas del ciclo.

2) Termorregulación. Diferentes trabajos han demostrado (Parmeggiani y col, 1984 y Kawamura y Sawyer, 1964) que durante el sueño MOR se pierde la capacidad de regular la temperatura corporal, ya que en ambientes fríos no existe la generación de calor. Sin embargo hay un incremento de la temperatura cerebral durante esta fase (Parmaggiani, 1985). Posteriormente se demostró que durante el

sueño lento, hay una disminución de la temperatura corporal y cerebral, sin que el organismo pierda su capacidad homeostática de regulación (Parmeggiani y col, 1987).

3) **Control Respiratorio.** La frecuencia respiratoria se mantiene constante y presenta ligeros períodos de disminución durante el sueño lento. Hay un incremento de la presión parcial de CO₂ y una baja en la respuesta de ventilación al CO₂, debida a la disminución en la excitabilidad de los centros nerviosos respiratorios (Phillipson y col, 1977). Durante el SMOR la frecuencia respiratoria es irregular, la sensibilidad al CO₂ se pierde, en los eventos fásicos del SMOR.

4) **Frecuencia Cardíaca y Presión Sanguínea.** Ambas variables disminuyen significativamente durante el sueño lento (Jouvet, 1962). Durante el SMOR la frecuencia cardíaca se vuelve muy irregular, la presión arterial sufre una disminución tónica, pero aumenta durante los trenes de movimientos oculares (Gassel y col, 1964).

Por otra parte, desde el punto de vista ontogenético el SMOR presenta ciertas modificaciones en la cantidad y ritmicidad en la que se presenta en los diferentes organismos, por ejemplo los neonatos permanecen mucho más tiempo en esta fase, que los adultos, así tenemos que los niños de 2 a 4 años duermen en fase de SMOR de 25% a 30% y los recién nacidos pasan más del 50%, del sueño total, en esta fase (Dreyfus-Brisac, 1968). También se ha observado que, los niños de más de 5 años y los adolescentes tienen cifras de SMOR semejantes a los de un adulto, que pasa en SMOR el 20% de sueño total. Pero a medida que se avanza en la edad de los individuos el SMOR disminuye llegando a un 15% del sueño total, con un incremento considerable de la vigilia (Kaies y col, 1976). Filogenéticamente, se ha demostrado la presencia de un ciclo vigilia-sueño, en sus dos fases (sueño lento y SMOR) desde las aves hasta los mamíferos, siendo estos últimos en donde se encuentran perfectamente definidas las diferentes fases

(Campbell y Tobler, 1984). Sin embargo la presencia de un ciclo actividad reposo se presenta desde los vertebrados inferiores poiquilotermos. Se sugiere que la presencia de las diferentes fases del ciclo vigilia-sueño en los mamíferos, está en relación con el grado de evolución y desarrollo de las diferentes estructuras cerebrales. Así como el tipo de ambiente en donde se desarrollan las diferentes especies.

NEUROANATOMIA FUNCIONAL DEL CICLO VIGILIA-SUEÑO

El enfoque neuroanatómico es uno de los métodos que ha permitido disectar de mejor manera, cada una de las fases que caracterizan al ciclo vigilia-sueño. A continuación se hará una descripción general de las principales estructuras anatómicas del cerebro, así como de los neurotransmisores, que participan en la regulación y mantenimiento del sueño.

Los primeros estudios sobre los aspectos neuroanatómicos del sueño, postularon desde un principio la idea de zonas o centros de generación de sueño y mantenimiento de la fase de vigilia. Estas ideas se fundamentaron en los trabajos de Von Economo (1930), que estudió diferentes tipos de lesiones en el cerebro de humanos, en contrando que los pacientes con lesiones en el hipotálamo anterior y el área preóptica presentaban insomnio, por otra parte los pacientes con lesiones en el hipotálamo posterior tenían hipersomnia. Años después Ranson en 1939, trabajando con lesiones electrolíticas en el hipotálamo anterior y posterior del cerebro del mono, corroboró estos resultados. Por su parte Nauta en 1946, lesionó el hipotálamo anterior de la rata encontrando nuevamente que se generaba insomnio. Estos trabajos llevaron a la conclusión de la existencia de centros anatómicos especializados en una determinada función. Sin embargo en 1935, Bremer, trabajando con gatos para registro crónico, realizó un experimento con dos tipos de preparaciones, las cuales consistieron en: cerebro aislado y encefálo aislado. En la primera separó el cerebro anterior de la parte caudal, a nivel del surco intercolicuar. En la preparación de encefálo aislado, seccionó a nivel del

bulbo raquídeo y medula espinal. Para el primer caso encontró que la lesión generaba la sincronización cortical permanente en el EEG. En el segundo caso encontró que el ciclo vigilia-sueño no se alteraba. Por lo que concluyó que el sueño se generaba como producto de la falta de información sensorial hacia la corteza y lo consideró como un estado pasivo. Por el contrario la vigilia era producto de la entrada constante de información sensorial, que era lo que mantenía despierto al animal.

Basándose en los trabajos de Bremer, en 1949 Moruzzi y Magoun, trabajando en preparaciones de encefalo aislado, estimularon eléctricamente la formación reticular del tallo cerebral, así como el hipotálamo dorsal y el subtálamo. En contrando que dicha estimulación generaba un estado de sincronización en el EEG, por lo que la formación reticular tenía influencia sobre la corteza cerebral. Estos investigadores postularon la existencia del sistema reticular activador ascendente (SRAA), como el responsable de mantener la vigilia. Esto se corroboró en 1950, con los trabajos de Lindsley y col, (1950) que lesionó las regiones del tegmento oral pontino, la formación reticular mesencefálica, así como el hipotálamo posterior del cerebro del gato, encontrando que la actividad del EEG sincrónica desaparecía, sugiriendo con ello que estas estructuras mantenían una relación específica con los mecanismos de desincronización cortical durante el sueño. En estudios más detallados de estimulación eléctrica de las diferentes vías, demostraron que el SRAA presenta dos vías ascendentes hacia la corteza: una dorsal que va hacia el tálamo y una ventral al subtálamo, hipotálamo y área preóptica (AP). La ruta dorsal esta formada por vías ascendentes colinérgicas, provenientes de la formación reticular ponto-mesencefálica, esto se comprobó con los estudios de marcaje de la acetilcolinesterasa (AChE) (Shute y Lewis, 1967) que es la enzima encargada de la degradación de la acetilcolina (ACh). La vía ventral esta formada por fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas que mandan proyecciones al hipotálamo, subtálamo y cerebro anterior, así como también a la corteza y al hipocampo (Jones, 1989). Por medio de registros de actividad unitaria en neuronas de la

porción tegmental del tallo cerebral de gatos en libre movimiento, se encontró que la ruta dorsal tiene su origen en los núcleos colinérgicos, pedunculo pontino (PPT) y laterodorsal tegmental (LDTg) de la transición pontomesencefálica, ya que la frecuencia de disparo de estas neuronas aumenta durante la desincronización cortical. (El Mansary y col, 1989). Además también con estudios de registro de actividad unitaria de neuronas de la formación reticular mesencefálica (FRM) que proyectan hacia el cerebro anterior, han corroborado estos datos, ya que estas neuronas presentan un intervalo tónico alto de disparo, que se encuentra asociado a la actividad cortical y esta frecuencia de disparo decrece durante la actividad de ondas lentas (Steriade, 1981). Por otra parte los estudios de estimulación eléctrica de alta frecuencia en el tálamo ventromedial, intralaminar y el núcleo medial, generan desincronización cortical. Sin embargo el sistema tálamico parece no generar directamente la desincronización del EEG ya que la ablación del tálamo provoca la pérdida temporal de la actividad cortical, pero no de manera permanente, ya que esta se recupera (Villablanca y col, 1976). Se ha propuesto la existencia de una ruta extratálamica que va hacia la corteza y genera la desincronización cortical, esto se apoya en estudios de estimulación eléctrica en la FRM de gatos con ablación del tálamo en donde se genera la desincronización del EEG. Así mismo se han incluido otras estructuras como el hipotálamo, subtálamo y estructuras diencefálicas, como la sustancia innominata (SI), núcleo basal de Meynert (nBM) y la banda diagonal de Broca (BDB) que tienen proyecciones hacia la corteza y se ha visto que también son responsables de la actividad cortical (Kievit y Kuypers, 1975). Esto se ha probado con estudios de estimulación eléctrica de alta frecuencia en estas estructuras, generando un estado de actividad cortical. En resumen, el sistema encargado de la actividad cortical incluye el hipotálamo, subtálamo y estructuras diencefálicas, que reciben fibras ascendentes de la formación reticular del tallo cerebral y que proyectan hacia la corteza cerebral (Figura 2).

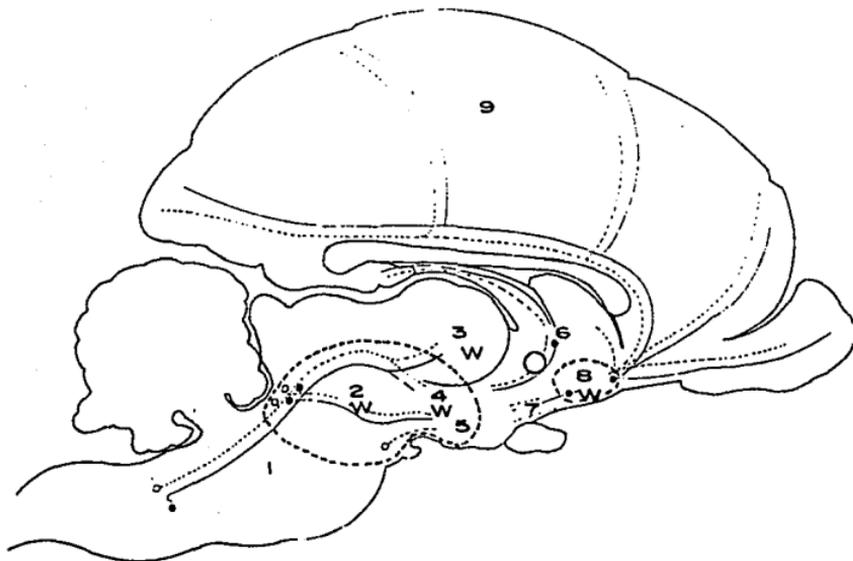


Figura 2. Esquema de un corte sagital de un cerebro de gato (2.5mm lateral a la línea media) que representa los sistemas que participan en la generación y mantenimiento de la vigilia. Se representan dos vías: la vía ventral monoaminérgica del tallo cerebral, y que manda proyecciones activas ascendentes al hipotálamo, subtálamo, y cerebro basal; la vía dorsal representada por la línea discontinua, tiene su origen en los núcleos colinérgicos del puente y del mesencéfalo, los cuales mandan proyecciones aferentes hacia el tálamo que a su vez proyecta a la corteza. Las regiones marcadas con W corresponden a las áreas cuya estimulación genera desincronización cortical y despertar. (tomado de Jones, 1989).

- | | | |
|----------------|-------------------|----------------------------|
| 1. Puente | 5. Hipotálamo | 9. Corteza |
| 2. Mesencéfalo | 6. Septum | O Neuronas Colinérgicas |
| 3. Tálamo | 7. Area preóptica | ● Neuronas Monoaminérgicas |
| 4. Subtálamo | 8. Cerebro basal. | |

Por lo que respecta al sustrato neuroanatómico que participa en la generación del sueño de ondas lentas (SL), se ha postulado que los núcleos del rafe desempeñan un papel decisivo en la instalación de esta fase del ciclo vigilia-sueño, debido a que las lesiones en esta región producen insomnio en gatos (Jouvet, 1972) En estudios de marcaje de estas vías neuronales, se ha observado que mandan proyecciones hacia el SRAA, el hipotálamo y las estructuras límbicas del prosencéfalo. La hipótesis de Jouvet, propone que la activación de los núcleos del rafe, inhibe al SRAA del tallo cerebral, permitiendo al tálamo medial inducir los husos de sueño y las ondas lentas. Así mismo Magnes en 1961 observó que la estimulación eléctrica de la formación reticular bulbar y del núcleo del tracto solitario (TSOL), genera sincronización en el EEG y la aparición de ondas lentas. Stermán y Clemente, (1962) demostraron que la estimulación eléctrica de las estructuras diencefálicas como el área preóptica (AP) y banda diagonal de Broca, inducían somnolencia. La lesión de estas mismas áreas incluyendo a la sustancia innominata, incrementa la fase de vigilia y disminuye significativamente el SL (McGinty y Stermán, 1968). Las recientes investigaciones electrofisiológicas (Steriade, 1992) han demostrado que uno de los factores que regula al SL es la disminución de la actividad de las neuronas de la formación reticular pontina (FRP) y FRM que proyectan al tálamo. Estas vías inducen por un lado, la hiperpolarización de las células del sistema tálamo-cortical y por otro lado, una desinhibición de las neuronas reticulares tálamicas (NRT). Las NRT presentan durante SL una actividad eléctrica rítmica, provocando una activación oscilatoria de todos los núcleos tálamicos y en consecuencia de la corteza cerebral (Figura 3).

Por último se ha observado que durante el SL hay un aumento en el sistema serotoninérgico Jouvet y Moruzzi (1972) por medio de técnicas de histofluorescencia encontraron serotonina en las neuronas del núcleo de rafe, postulando con ello que la serotonina podía participar, como un neurotransmisor que facilita la inducción del SL.

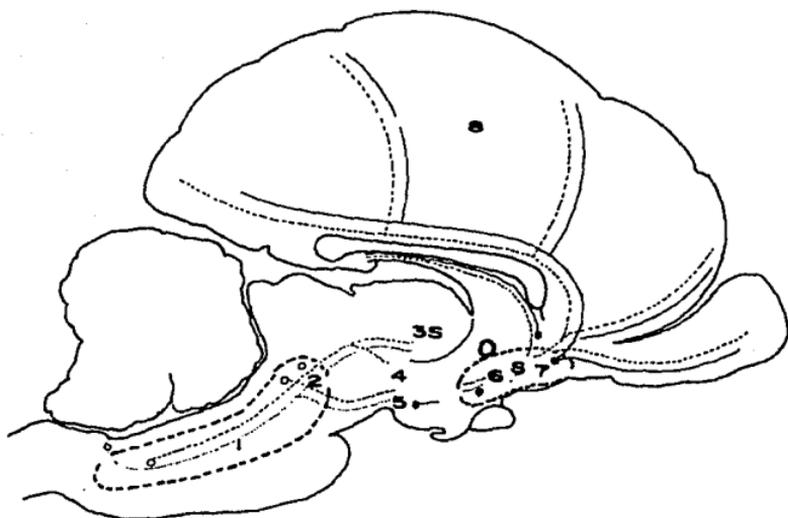


Figura 3. Esquema de un corte sagital de un cerebro de gato (1,00 mm lateral a la línea media) que representa los sistemas neuronales que participan en la generación y mantenimiento del sueño lento. Las líneas discontinuas representan la vía ascendente de los núcleos serotoninérgicos del tallo cerebral, hacia el tálamo, hipotálamo, cerebro anterior y corteza; los núcleos marcados con S indican las regiones en la cual la estimulación eléctrica genera sincronización cortical y sueño. (Tomado de Jones, 1989).

- | | |
|--------------|----------------------|
| 1. puente | 5. Hipotálamo |
| 2. Encéfalo | 6. Area preóptica. |
| 3. Tálamo. | 7. Cerebro anterior. |
| 4. Subtálamo | 8. Corteza |

- Neuronas serotoninérgicas
- Neuronas Gabaérgicas

Dentro de las estructuras encargadas de la generación del SMOR se ha propuesto al tallo cerebral como una de las que intervienen en la generación de esta fase de sueño. Los primeros estudios anatómicos fueron hechos por Jouvett (1962), que realizó transectos a nivel pontomesencefálico en preparaciones crónicas de cerebro de gato. Encontrando que el puente era la zona responsable del disparo para la generación del SMOR, ya que las características tónicas y fásicas que definen esta fase desaparecían. Los estudios posteriores fundamentaron que el campo gigante-celular pontino (Hobson y col. 1974) así como el locus coeruleus (LC) (Jouvett y Moruzzi, 1972) podían ser considerados también otros sitios posibles, para la generación del SMOR. Más adelante Monti (1970), estimuló con pulsos eléctricos la FRP, originando un aumento en la duración del SMOR.

En la actualidad la investigación sobre el centro de generación del SMOR ha dejado de ser prioritaria. Hoy en día se sabe que dicho proceso es más complejo de lo que se pensaba y que no sólo incluye a una estructura en particular, sino más bien a un conjunto de estructuras que se encuentran interaccionando entre sí. Por ello la investigación del ciclo vigilia-sueño ha tomado nuevos enfoques y se han planteado nuevos métodos de estudio. Recientemente se ha demostrado que durante el SMOR existe un aumento en los niveles de actividad neuronal en un gran número de estructuras, no sólo a nivel del puente, sino a todo lo largo del tallo cerebral. Los registros de actividad unitaria han descubierto que existe un grupo de neuronas que se activan al máximo durante el SMOR, estas neuronas se han registrado en la FRP, Locus coeruleus alfa (LCA), perilocus coeruleus (pLC) (Sakai, 1985), en el núcleo parabraquial (PB) (Saito y col, 1977), en el núcleo Magnocelular (Mc) (Chase y col, 1981) y en el PPT y LDTg. Estas neuronas han sido denominadas REM-ON (Hobson y col, 1974) o también PS-on (Sakai, 1986).

Por otro lado se ha demostrado la contraparte de estas neuronas, las denominadas REM-OFF ó PS-off, estas neuronas se distribuyen en los núcleos del sistema de rafe y del LC (Hobson y col. 1974). Sakai (1986) ha propuesto que las neuronas REM-ON son neuronas colinérgicas que descargan de forma tónica y

específicamente durante los períodos de SMOR, en cambio las neuronas REM-OFF son monoaminérgicas (serotonina o noradrenalina) que cesan su disparo durante esta fase de sueño. Se ha postulado que dichas neuronas tienen un papel permisivo en la generación del SMOR. El mecanismo de funcionamiento de estos grupos neuronales no se conoce muy bien, pero se cree que la excitación de las neuronas REM-ON y la inhibición de las REM-OFF, genera la aparición del SMOR.

Por otro lado, hay datos experimentales que sugieren la participación de mecanismos colinérgicos en la instalación del SMOR. La administración de antagonistas colinérgicos como la atropina de forma sistémica en gato disminuye la fase de SMOR, sin afectar el SL (Jouvet y col. 1973). Y por el contrario la administración de agonistas colinérgicos en LCa, pLC induce la aparición de un estado parecido al SMOR. Así mismo se a manejado que algunas sustancias de naturaleza proteica juegan un papel importante en la instalación del SMOR. Esto se probó con los trabajos de Drucker-Colín y Gutiérrez (1976) que utilizando el sistema de cánula "push-pull" para obtener perfusados de la FRM, durante el ciclo vigilia-sueño de gatos, encontraron una relación directa entre la aparición del SMOR y un aumento en la cantidad de proteínas. Así mismo la administración de cloranfencol, anisomicina y penicilina G, que son inhibidores de la síntesis de proteínas, disminuye de forma considerable la duración del SMOR (Rojas-Ramírez y col, 1977).

Por ser la fase de sueño MOR el objeto de estudio de este trabajo, a continuación se describirán de forma breve las diferentes estructuras anatómicas que participan en los distintas variables polisomnográficos que definen al SMOR.

- Desincronización Cortical

La desincronización cortical del EEG es una de las características que diferencian al SMOR del resto de las fases de sueño y esta desincronización parece estar generada por un mecanismo diferente al propuesto por Moruzi y Magoun (1949). Los primeros reportes fueron hechos por Jouvét (1962) que propuso que la formación reticular y específicamente el núcleo pontis caudalis era la región directamente responsable de la desincronización cortical durante el SMOR. Sin embargo, lesiones electrofíticas a lo largo del tallo cerebral, en particular en los núcleos de rafe anterior, LC, subcoeruleus y núcleo reticularis pontis, no alteraba la desincronización cortical. Así mismo las lesiones en el núcleo tegmental ventral y dorsal, así como los núcleos de rafe medial y dorsal, no afectaban tampoco este fenómeno. Jouvét propuso que el núcleo pontis oralis era la única estructura que participaba directamente en la generación de la desincronización en el EEG, debido a que la lesión de dicha área no afectaba el resto de las variables electrofisiológicas durante el SMOR. Estableció que la parte anterior del tallo cerebral generaba este patrón polisomnográfico ya que las lesiones en la parte caudal del puente y el mesencefalo conservaban este patrón. Sin embargo la lesión de los núcleos del tegmento pontino con ácido kaínico no altera la desincronización del sueño MOR (Drucker-Colín y Bernal-Pedraza, 1983). Así mismo se han señalado otras estructuras del cerebro anterior, como la SI y el nBM ya que por medio de registros de actividad unitaria se ha observado un incremento en la frecuencia de disparo semejante al de la vigilia y SMOR (Szymuslak y McGinty, 1989).

- Actividad Theta Hipocampal

La actividad theta hipocampal es un patrón sinusoidal de actividad eléctrica con un intervalo de frecuencia entre los 5 y los 10 Hz. Dicho patrón se presenta de manera continua durante el SMOR y de forma esporádica durante la vigilia (Vertes, 1982). Durante la fase de vigilia el ritmo theta parece estar asociado con movimientos voluntarios en la rata y el perro y en procesos de atención en el gato

y conejo. Green y Arduini (1954, citado en Vertes, 1982) encontraron que la estimulación sensorial o la estimulación directa de la formación reticular del tallo cerebral, generaba un ritmo theta en el hipocampo de conejo. Los estudios recientes han localizado los sitios del tallo cerebral involucrados en la génesis del ritmo theta, considerando a la FRP y el núcleo pontis oralis como las estructuras indicadas para generar dicho parámetro (Jones, 1989).

- Atonía Muscular

Las lesiones en la región pontina caudal abolían el SMOR con atonía, sugiriendo que el sustrato responsable de dicho efecto se localizaba en el puente rostral. Los estudios (Jouvet, 1965) demostraron que el tegmento dorsolateral pontino, especialmente el LC, era la zona de disparo de este fenómeno tónico del SMOR ya que la coagulación bilateral de la parte caudal del LC generaba un SMOR sin atonía, sin alterar el resto de los parámetros que definen esta fase del sueño. Sakai y col. (1979) estableció que el LCa y el peri-LC, así como la parte dorsolateral del núcleo pontis oralis (RPO) y pontis caudalis (RPC), eran las estructuras responsables de generar la atonía. Con base en esto se ha propuesto que las células del peri-LC y la región media del LCa, presentan un efecto excitatorio tónico en las neuronas del núcleo reticular magnocelular (MgRF) que a su vez inhibe las motoneuronas de la médula espinal, durante el SMOR.

- Espigas Ponto-Genículo-Occipitales (PGOs)

Las espigas PGO son potenciales eléctricos fásicos que se registran en el puente, el cuerpo geniculado lateral (CGL) y la corteza occipital. Estas espigas están asociadas al SMOR y hacen su aparición en la transición SL-SMOR (Figura 4) por ello se han utilizado como una de las variables poligráficas que definen esta fase de sueño (Ursin y Serman, 1981). Brooks y Bizzi. (1963) realizaron una descripción de estos potenciales eléctricos de campo, considerando que eran ondas de alta amplitud, 300 μ v, que disparan en forma de ráfagas aproximadamente de 3 a 4 cada 8 segundos. Las neuronas responsables de la

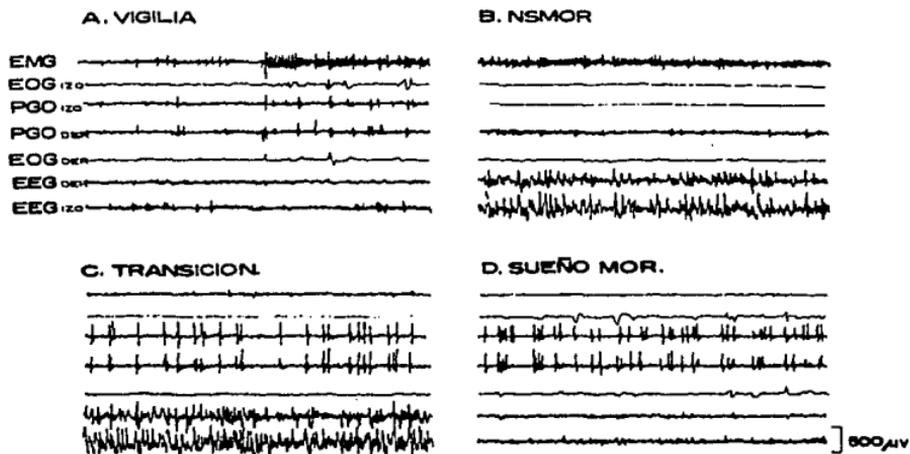
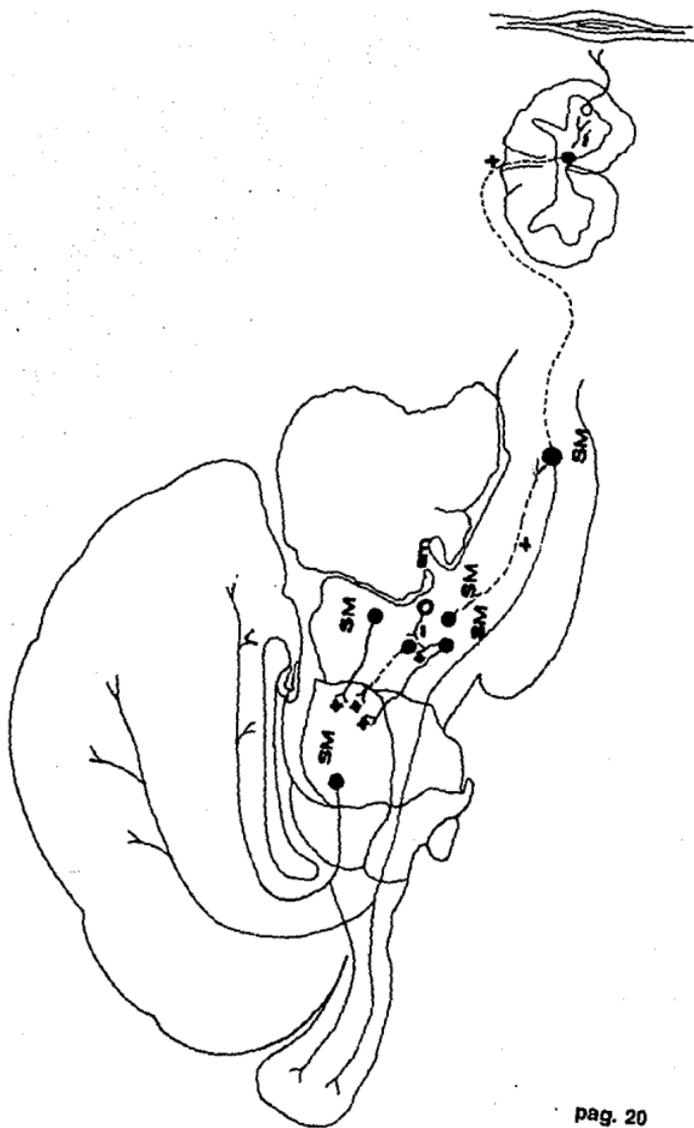


Figura 4. Registro polisomnográfico de gato adulto durante las cuatro fases del ciclo vigilia-sueño. Note la presencia de las espigas PGO, durante la fase de transición y su incremento durante el sueño MOR (Tomado de Calaway y col, 1987).

ocurrencia de las espigas PGO están localizadas en el mesencefalo caudal, el tegmento pontino rostral, la FRM, el braquium conjuntivo y el área X, estas estructuras a su vez mandan fibras ascendentes hacia el CGL y la corteza occipital (Sakai y Jouvet, 1980). Esto se comprobó ya sea por estimulación eléctrica de estas áreas que generaba la aparición de espigas PGO o bien por lesión de estas estructuras que abolían su aparición, por lo que los grupos neuronales encargados de generar las espigas PGO se han denominado células PGO-ON (Sakai y Jouvet, 1980).

En la figura 5 se representan y resumen las principales vías y estructuras que participan en las diferentes variables polisomnográficas que definen al SMOR.

Figura 5. Representación del mecanismo que regula las diferentes variables polisomnográficas del SMOR. Las líneas continuas señalan el mecanismo de desincronización cortical del EEG, en el cual las fibras de la FRM activan (+) al Tálamo y la corteza. Las líneas discontinuas indican el mecanismo de atonía muscular, donde los núcleos pontinos enterodorsales mandan aferentes colinérgicas a la FRM, que a su vez proyecta a las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal. Estas neuronas son glicinérgicas que hiperpolarizan a las somatoneuronas induciendo atonía (-). El mecanismo que regula las espigas PGO está representado por líneas punteadas. La región dorsolateral del puente y la FRP proyectan al cuerpo geniculado lateral. Los puntos marcados con SM son aquellas estructuras que aumentan su actividad eléctrica durante el SMOR. Las estructuras que disminuyen su actividad se señalan con sm (Modificado de Jones, 1989).



ESTIMULACION AUDITIVA Y PRIVACION DE SUEÑO

El sueño es un fenómeno que puede ser modulado básicamente bajo tres condiciones o paradigmas, la estimulación farmacológica, situaciones que inducen el procesamiento de información sensorial, como la estimulación auditiva o somática y la privación de sueño. El primer punto a sido ya tratado con anterioridad, por lo que respecta al procesamiento de información sensorial. Pavlov en 1923 (Jouvet y Moruzzi, 1972) fue el primer investigador en probar el efecto de la estimulación sensorial sobre los mecanismos del sueño, el observó que la estimulación eléctrica de vías somatosensoriales aferentes inducía sueño en perros. Años después, Roltback (1960) demostró que la estimulación eléctrica de baja frecuencia sobre la piel de gatos, era capaz de inducir sincronización cortical asociada con las características conductuales del sueño. Pompelano y Jouvet (1962) demostraron que este tipo de estímulos se propagaba por un grupo II de fibras cutáneas; con registros de actividad unitaria se probó que estas fibras tienen aferentes hacia la médula y la parte caudal del puente. Sin embargo una de las herramientas más utilizadas hoy en día para la manipulación del ciclo vigilia-sueño es la estimulación auditiva. Los estudios con potenciales provocados de la vía auditiva, sugieren que la respuesta al estímulo está asociada a la intensidad de este, dependiendo de la fase del ciclo vigilia-sueño donde se encuentre el organismo, es decir, la respuesta al estímulo durante la vigilia es alta, en SL disminuye y durante el SMOR los potenciales son de poca amplitud (Winters y col, 1967). Sin embargo durante estas fases (SL y SMOR) la información sensorial tiene acceso a la corteza auditiva, ya que se ha visto también por medio de potenciales provocados que se activa durante dicha estimulación (Huttenlocher, 1960). También se ha visto que la aplicación de estímulos vibratorios o de ruido blando en gatos, durante 15 minutos antes de empezar el registro polisomnográfico induce, un incremento en el tiempo total de sueño MOR o de sueño lento respectivamente (Doneshka, 1974).

En nuestro laboratorio se ha seguido esta línea de investigación, de probar el efecto de la estimulación auditiva y somatosensorial en el mecanismo de mantenimiento y regulación del sueño MOR. En 1983 Drucker-Colín y colaboradores encontraron que la aplicación de un estímulo auditivo de 90 dB de intensidad, 20 Hz de frecuencia, aplicado cada 20 segundos durante los periodos de sueño MOR en gato, induce un incremento de un 60% en esta fase del sueño, una disminución en la latencia y un incremento de un 40% de la densidad de espigas PGO (Figura 6). Por lo que estos resultados sugerían que había una relación entre el mecanismo de generación de la actividad PGO y el mecanismo de generación del sueño MOR. Para probar esta hipótesis Arankowsky-Sandoval y col, (1986) aplicó atropina, que como ya se menciona anteriormente disminuye la cantidad de sueño MOR así como la densidad de espigas PGO, y realizó una curva dosis-respuesta en donde encontró que a una dosis de 0.1 mg/Kg generaba una disminución del 29% en el SMOR y un decremento en la densidad de espigas PGO del 30%, a una dosis de 0.3 mg/Kg encontró una disminución del 58% en el SMOR, en cambio la densidad de espigas PGO no cambió. Por lo tanto se probó que el mecanismo de generación del SMOR y de espigas PGO eran independientes.

Se ha visto que la FRP es una estructura que recibe una gran cantidad de vías aferentes de la vía auditiva y somatosensorial, así mismo la estimulación eléctrica y química (Baghdoyan y col, 1984) provoca un incremento en el sueño MOR. Con base en estos antecedentes Arankowsky-Sandoval y col, en (1989) lesionó la FRP con ácido kaínico y encontró que estas lesiones no provocaron ningún cambio en la duración de sueño MOR, pero al aplicar el estímulo auditivo se afectaba la duración, así como la densidad de espigas PGO. Por lo que se sugirió que el efecto de la estimulación pudiera estar mediado por esta estructura.

Por lo que respecta a la privación de sueño, que es mantener a un individuo despierto, por largos periodos de tiempo y ver el efecto esto que tiene sobre el organismo. Es otra de las herramientas más utilizadas para tratar de diseccionar de una mejor forma el o los mecanismos que están regulando el sueño. Durante los últimos años se han desarrollado, varios métodos de privación de sueño, ya sea



Figura 6. Representación del registro polisomnográfico de un gato adulto durante la fase del sueño MOR, observe el incremento de las espigas PGO durante la estimulación auditiva. (tomado de Drucker-Colín y col. 1983a).

de forma parcial o total. Actualmente el método más utilizado, es el denominado método del tanque o florero invertido, desarrollado por Vogel en 1975. Este método consiste en colocar a los animales en una plataforma de 5 cm de diámetro, rodeada por agua, de tal forma que cuando el animal presenta SMOR con la atonía muscular característica, este cae al agua y se despierta. Dicho método es económico y permite privar de sueño varios animales simultáneamente. Sin embargo este método solo reduce en un 10% a un 40% el SMOR e induce estrés en los animales (Rampin y col, 1991). Recientemente, se han desarrollado métodos de privación de sueño menos estresantes, como el propuesto por Van Hulzen y Coenen (1980), que diseñaron una plataforma múltiple, en la que el animal puede desplazarse libremente, evitando con ello el confinamiento permanente y la generación de menos estrés. Otras técnicas desarrolladas son la del Péndulo, en la que los animales se colocan en una plataforma móvil en la que el imbalance induce privación de SMOR (Van Hulzen y Coenen, 1980). Por otra parte la privación de sueño, genera un efecto denominado rebote de sueño, este fenómeno se caracteriza por un acortamiento en la latencia del SMOR, un incremento en el número de movimientos oculares rápidos, así como en la densidad de espigas PGO (Dement, 1969). Así mismo la duración media y la frecuencia de los periodos de SMOR aumenta de forma significativa durante el rebote. También se ha observado que el incremento en el rebote de SMOR es proporcional al tiempo de privación. Por ejemplo un tiempo de privación de 24 horas incrementa entre un 25% a un 30% la cantidad de SMOR. En un tiempo de 72 horas la cantidad de SMOR alcanza un aumento límite del 60%. Por ello aunque aumente el tiempo de privación, el incremento en la frecuencia y duración del SMOR permanece inalterado (Siegel y Gordon, 1965).

Se ha demostrado que la privación de SMOR induce un aumento en los niveles de excitabilidad cerebral, que es lo que genera el incremento en el SMOR durante el rebote. Esto se fundamenta en los trabajos de Cohen (1970), que establecieron que la privación de sueño genera por un lado, una disminución del umbral de disparo necesario para inducir convulsiones por medio de

electrochoques. Además la privación de sueño induce un aumento en la excitabilidad cortical, ya que los estudios con potenciales provocados de la corteza piriforme, han encontrado que los potenciales se incrementan en un 300% después de 72 horas de privación (Satinoff y col, 1971). En estudios de actividad unitaria se observó que la frecuencia de disparo de las neuronas del LC disminuye conforme aumenta el tiempo de privación (Mallick y col, 1989).

Es importante señalar que la privación del SMOR produce una serie de cambios en algunos aspectos de conducta de los organismos, por ejemplo en la ingesta de alimentos, de agua, aumento de la conducta sexual y disminución de la capacidad de aprendizaje (Kovalzon y col, 1984) así como también un aumento de la agresividad (Smith, 1985). En los últimos años se ha manejado la idea, de que en animales privados de sueño, hay la acumulación de ciertas sustancias inductoras o facilitadoras de sueño, que se acumulan en el líquido cefalorraquídeo (LCR) durante el periodo de privación, Pieron llamó a estas sustancias hipnohormonas. Bajo esta línea de investigación, se ha encontrado que la administración de LCR de gatos privados de sueño, en animales insomnes por la administración de PCPA induce SMOR (Prospéro-García y col, 1986). Estos experimentos apoyan la idea de que en el LCR de animales PS, se acumula material hipnogénico de posible naturaleza proteica y que posiblemente sea el mecanismo responsable de generación del SMOR. Dentro de este contexto se han propuesto factores inductores de sueño como el polipéptido vasointestinal (VIP) como uno de los posibles candidatos, investigaciones han demostrado que dicho péptido tiene la capacidad de inducir sueño MOR, la incubación de LCR de gatos PS con anticuerpo anti-VIP inhibe el efecto inductor de sueño de este péptido (Propéro-García y col. 1987). Los estudios recientes por medio de técnicas de radioinmunoensayo para VIP han encontrado que éste se incrementa de forma significativa en gatos privados de sueño por 24 y 48 horas y que dicho efecto no depende del estrés producido por la técnica de privación, ya que los animales colocados en plataformas grandes muestran concentraciones similares al grupo

control, por lo cual se sugiere que el VIP puede acumularse en el líquido cefaloraquídeo durante la vigilia y ser el responsable del rebote de sueño posterior a la privación (Jímenez-Angulano y col. 1993).

ESTRUCTURAS DIENCEFALICAS Y SU RELACION CON EL CICLO VIGILIA-SUEÑO

Dentro del campo del estudio de la neurobiología del sueño, se han señalado, varias estructuras anatómicas del cerebro en particular, áreas del tallo cerebral, ya citados con anterioridad. Asimismo se ha visto que no sólo estas estructuras desempeñan un papel importante, sino que hay otras interconexiones con otras áreas específicas del cerebro que guardan cierta relación en los mecanismos de regulación y mantenimiento del ciclo vigilia-sueño. Tal es el caso de algunas áreas del diencefalo y en particular del hipotálamo.

Von Economo en 1930 fue uno de los primeros en implicar estructuras diencefálicas con aspectos relacionados con el ciclo vigilia-sueño. Von Economo observó que pacientes que morían por encefalitis letárgica, se caracterizaban por que tenían un insomnio marcado durante la enfermedad, producto de las lesiones en el hipotálamo anterior. Mientras que por el contrario los pacientes que mostraban hipersomnia presentaban lesiones en el hipotálamo posterior. Estos resultados fueron corroborados por Ranson en 1939 que lesionó bilateralmente el área lateral hipotálamica posterior de monos, incluyendo algunas regiones subtálamicas, obteniendo un estado de somnolencia permanente en estos animales. Más tarde Nauta en 1946, demuestra que las lesiones en el hipotálamo anterior de rata produce insomnio y que las lesiones a nivel del mesencéfalo y del hipotálamo posterior generan sueño. Con base en la Interpretación de estos resultados, Von Economo sugirió la existencia de un "centro de generación de sueño" en el hipotálamo anterior, propuso que el centro inductor al que llamó "brain sleep" tenía vías de acción inhibitoria sobre el talámo y la corteza cerebral. Nauta por su parte sugería que la acción inhibitoria era sobre el hipotálamo posterior, al cual considero como "centro de la vigilia". Teniendo así dos centros de regulación del ciclo vigilia-sueño.

Estas observaciones permitieron establecer la relevancia potencial que el diencéfalo, tiene en la regulación de los mecanismos de generación del sueño. Estudios posteriores, como la existencia del SRAA y sus vías excitatorias hacia el talámo y corteza, ya descritos con anterioridad, permitieron establecer con mayor claridad, un centro de regulación de la vigilia. Así mismo el número de evidencias anatómicas en favor de las vías inhibitorias sobre el talámo, corteza y medula espinal aumentaron, corroborando con ello, que el diencéfalo mantiene una relación importante con los aspectos ciclo vigilia-sueño (Sterman y Shouse, 1985).

Hoy en día, gracias al descubrimiento de Assirinsky y Kleitman (1955) el sueño se divide básicamente en dos patrones neurofisiológicos, en el sueño MOR y el no-MOR, y los diferentes fenómenos fásicos y tónicos que caracterizan al sueño MOR están mediados exclusivamente por los distintos grupos neuronales que se encuentran distribuidos en el tallo cerebral. Sin embargo estos hechos experimentales descritos anteriormente sugieren, que no sólo el tallo cerebral forma parte importante en los mecanismos de generación y mantenimiento del sueño, sino, que el sueño debe ser considerado como un fenómeno que incluye a un gran número de estructuras, resultado de la interacción multifactorial de una buena parte del cerebro. De ahí el interés de saber que otras estructuras forman parte de este mecanismo de interacción multifactorial.

El hipotálamo está jugando un papel muy importante en la regulación de la ciclicidad del ciclo vigilia-sueño, así como en el disparo o inhibición de ciertos grupos neuronales que mantienen este proceso (Jouvet, 1988). Se ha observado que la estimulación eléctrica, con altas y bajas frecuencias, en el hipotálamo anterior de gatos anestesiados e inmovilizados produce sincronización cortical en el EEG (Sterman y Clemente, 1962). Esto fue apoyado en 1963, con los trabajos de Hernández-Peón y Chávez-Ibarra, que realizaron estimulación eléctrica y manipulación farmacológica en el cerebro anterior, en el área preóptica (AP), de gatos en libre movimiento, encontrando que la manipulación farmacológica con cristales de Ach induce somnolencia y períodos cortos de sueño, con una latencia de 2 a 3 minutos; mientras que la administración de atropina produce insomnio.

Recientemente se ha demostrado que la inyección de ácido iboténico, que es un aminoácido que destruye los cuerpos neuronales y deja intactos los axones, en la parte ventrolateral del hipotálamo anterior, incluyendo el AP y BDB (Sallanon y col. 1986), induce un incremento en el sueño MOR, así como también en el SL. Los registros de actividad unitaria en neuronas del hipotálamo ventral (Vanni-Mercier y col, 1984) demostraron la existencia de dos tipos de grupos neuronales. Un grupo de neuronas que presenta descargas tónicas durante la vigilia y el sueño MOR y otro grupo con actividad únicamente durante la vigilia.

El AP ha sido considerada durante mucho tiempo, como un centro hignogénico. Los estudios de lesiones realizados en gatos, por McGinty y Sterman en 1968 en la base del diencefalo, en área preóptica, incluyendo regiones como el núcleo supraóptico, el núcleo preóptico lateral y el pedúnculo talámico inferior, producen una reducción significativa en el SL y en el SMOR y un incremento en la vigilia, sugiriendo que el diencefalo y en particular el área preóptica, tienen grupos neuronales reguladores, ya que el incremento de la vigilia tan pronunciado que se encontró, es debido a que el SRAA del tallo cerebral, encargado del mantenimiento de la vigilia, libera un inhibidor, hacia las estructuras del cerebro anterior, inhibiendo los grupos neuronales encargados de la generación del sueño. Los registros de actividad unitaria en AP han permitido ampliar más el papel de esta región en el sueño, Findlay (1969) registraron el número de disparos de neuronas del AP del cerebro de conejo, encontrando que de las 144 neuronas registradas, el 39% disminuía su intervalo de disparo durante el SL, el 21% incrementaba su frecuencia de disparo durante esta fase y el 40% restante no presentaba cambios. Así mismo el 78% de las neuronas incrementaban su intervalo de disparo durante el SMOR. Sin embargo estudios posteriores demostraron que las neuronas del AP disminuían su frecuencia de disparo durante el SMOR e incrementaban su actividad de manera espontánea durante el SL (Ogawa y Kawamura, 1988, Noo y Nath, 1990) encontraron que de 86 neuronas del área preóptica, registradas en preparaciones crónicas de gato, el 84% presentaban actividad espontánea durante el SL y SMOR y un 16% durante la vigilia. Además

se observo, que del total de neuronas registradas, 16 presentaban una tendencia a disparar en rafagas de forma espontánea durante el SL (Figura 7). Symusiak y McGinty (1986) reportaron que las neuronas del AP presentaban frecuencias de disparo lentas durante la vigilia, pero que ésta se incrementaba de 1 a 5 segundos, antes de aparecer un período de SL. Estos autores propusieron que dichas neuronas tienen un papel importante en la generación de esta fase de sueño. En el mismo año estos investigadores realizaron estudios de lesiones con ácido kaínico en el cerebro anterior, en particular sobre el AP, BDB y SI, resultando un decremento significativo en el SL y el SMOR, así con un incremento en el tiempo de duración de la vigilia. Dicho fenómeno persistió de 6 a 7 semanas después de la lesión. Por otra parte, Ogawa y Kawamura (1988) por medio de registros de actividad unitaria múltiple, registró varias estructuras del cerebro durante el ciclo vigilia-sueño, estas áreas comprendían el hipotálamo anterior, AP y BDB, así como también la formación reticular pontina y mesencefálica, el núcleo de rafe y el locus coeruleus. Encontrando que la frecuencia de disparo, en particular del AP se incrementaba en la transición entre vigilia y SL, aumentaba durante esta fase, pero disminuía durante el sueño MOR. Este investigador planteó a manera de hipótesis, una posible relación entre el papel hipnógeno del AP, ya postulado por otros investigadores y la formación reticular pontina, como responsables de la generación de las características que definen al SMOR.

Así mismo se ha visto que la concentración del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en la región preóptica hipotálmica cambia su concentración de acuerdo al ciclo ultradiano vigilia-sueño. Esto se probó midiendo la concentración del nucleótido en diferentes condiciones, en horas de oscuridad y horas de luz, encontrando que la concentración del AMPc aumenta de forma considerable durante las horas de oscuridad, además de que el incremento es mayor durante la vigilia y durante el SL disminuye pero no desaparece, esto sugiere que la concentración del AMPc en la región preóptica esta influenciada por factores ultradianos y circadianos que pueden estar relacionados con el proceso de sueño (Perez y col, 1991).

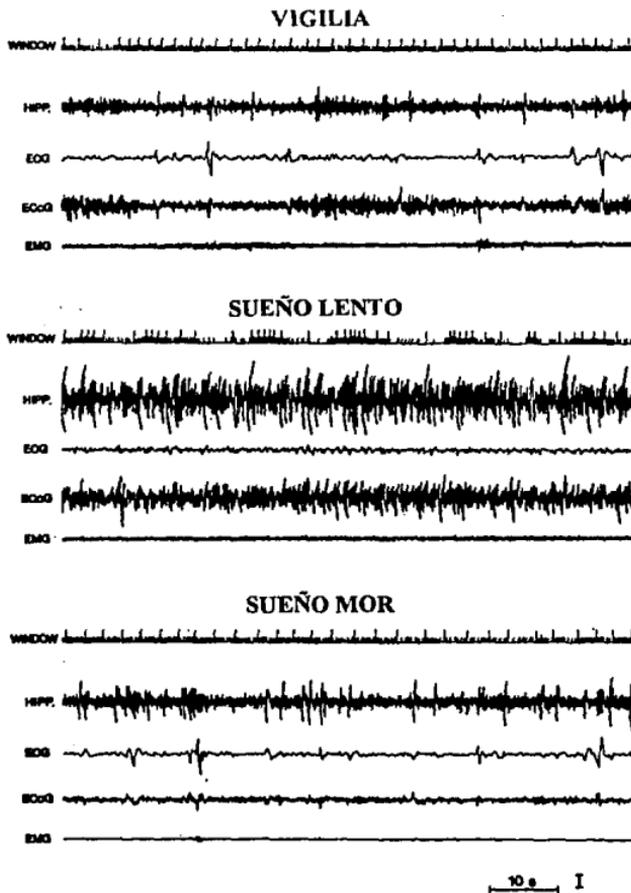


Figura 7. Registro de la actividad unitaria de neuronas del área preóptica, mostrando la actividad máxima durante la fase del sueño lento. La línea superior (Window) indica el registro de los potenciales de acción. HPP Hipocampo; EOG Electrooculograma; ECoG Electrocorticograma Frontal; y EMG Electromiograma. (Tomado de Kaitin 1984).

Así mismo se ha visto que durante la privación de sueño en ratas, hay un incremento en la concentración del AMPc en la corteza cerebral y AP se incrementa durante la recuperación o rebote de sueño (Perez y col, 1991). También se ha encontrado que con la administración de LD-propranolol un bloqueador beta-adrenérgico no selectivo, así como la exposición a temperaturas ambientales bajas se modifica de forma considerable la concentración del AMPc, así como el ciclo vigilia-sueño en ratas (Aminci y col, 1990 y Perez y col, 1991).

Por otra parte algunos estudios por medio de lesiones bilaterales con ácido iboténico en el hipotálamo posterior del gato, han demostrado que hay un incremento significativo en la cantidad de sueño MOR, un día después de la inyección (Sallanon y col, 1986, 1987). Por lo que se sugiere que la inactivación de estos grupos neuronales facilita la activación de las neuronas hipotálamicas anteriores para inducir los patrones característicos del sueño. También se a visto que microinyecciones bilaterales de muscimol, un agonista gabaérgico, en dosis de 0.1 a 1 ug/0.5ul, en el AP, hipotálamo anterior y tegmento mesencefálico tiene como resultado un incremento en el estado de vigilia e insomnio. Por el contrario las microinyecciones de muscimol en la parte medial y anterior del hipotálamo posterior induce patrones electroencefalográficos de sueño o hipersomnia, dicho patron se caracterizo por un incremento en el SL, pero una supresión completa del SMOR. La administración de muscimol en la parte ventrolateral del hipotálamo posterior exhibe, un incremento en el SL y un incremento significativo en el SMOR (Lin y col, 1989). Así mismo se ha visto que el eje hipotálamico-hipofisario juega un papel importante en la regulación del SMOR (Sallanon y col, 1986) ya que se considera la existencia de ciertas sustancias promotoras o inductoras de sueño (Sallanon y col, 1986), que posiblemente sean sintetizadas en algunas estructuras hipotálamicas. Se ha sugerido que las sustancias hipotálamo-hipofisarias como, la hormona estimuladora de la melacotropina-alfa (Chastrette y Cespuglio, 1985), el péptido vasointestinal (VIP) (Propéro-García y col, 1987) y la somatostatina (Danguir, 1986) tienen un papel modulador durante el ciclo vigilia-sueño. Por ello

se han postulado que algunos péptidos facilitan el sueño MOR a nivel del puente, ya sea por vía de fluidos cerebro-espinales, o vía directa extrahipotálmico-hipofisaria. Dentro de este contexto algunas investigaciones han reportado que el núcleo paraventricular del hipotálamo (nPV), así como el núcleo supraóptico (SO) son las mayores fuentes de péptidos hipofisarios, este núcleo manda largas proyecciones hacia el lóbulo posterior de la hipófisis, así como también recibe aferentes de los núcleos rafe dorsalis y locus coeruleus, que son núcleos relacionados con la regulación del sueño (Tribollet y col. 1981). Las lesiones electrofíticas en el nPV tienen como resultado una disminución en la duración del sueño lento y de SMOR, encontrando que dicho decremento está en relación al tamaño de la lesión (Sallanon y col. 1987). Sin embargo, este tipo de lesiones destruyen las fibras ascendentes y descendentes del AP por lo que, la disminución de ambas fases de sueño (SL y SMOR), sea debido más a la lesión de estas vías, que a la destrucción del nPV, sin descartar su función como centro liberador de posibles factores inductores de sueño.

Como ya se menciona con anterioridad, el hipotálamo posterior mantiene una estrecha relación con la fase de vigilia y de acuerdo a los estudios neuroanatómicos recientes se ha demostrado que estructuras del hipotálamo posterior como es el área lateral hipotálmica (LH) mandan proyecciones a la corteza cerebral vía extratálmica (Saper, 1985), y que también recibe aferentes de algunas estructuras que participan en la regulación del sueño como el complejo de locus coeruleus y el núcleo de rafe dorsal (Saper, 1985). Así mismo el hipotálamo posterior recibe proyecciones aferentes colinérgicas de otras estructuras del tallo cerebral, como la formación reticular mesencefálica, el tegmento pontino dorsal y el núcleo reticularis magnocelular. Las evidencias experimentales recientes han encontrado que las neuronas colinérgicas del tegmento pontino dorsal mandan impulsos excitatorios a las neuronas del hipotálamo posterior durante la vigilia y el sueño MOR. Por lo tanto se considera que el hipotálamo posterior tiene un papel importante como vía de relevo en el mecanismo de desincronización cortical.

Por medio de registros de actividad unitaria en el hipotálamo posterior de gatos (Sakai y col. 1990), ha sido posible registrar tres diferentes poblaciones de neuronas que presentan patrones de disparo muy particulares dependiendo de la fase del ciclo vigilia-sueño. Una población llamada "waking-state-specific" que se caracteriza por disparos tónicos lentos durante la vigilia, una reducción del intervalo de disparo durante el inicio del SL y una reducción completa del intervalo de disparo en SL profundo. Esta cesación de disparo fue mantenida a través de los periodos de sueño MOR durante todo el registro y han sido denominadas "PS-off", dichas neuronas incrementan su actividad minutos antes de entrar en una fase de vigilia. Estas neuronas son muy similares a las neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas "PS-off" que participan en el mecanismo permisivo durante el SMOR descritas ya con anterioridad por Sakai y col, 1988. Con los estudios electrofisiológicos mas detallados se pudo discriminar a partir de la población de neuronas "waking-state-specific" dos tipos de neuronas, las tipo I y las tipo II. Las neuronas tónicas tipo I descargan con frecuencias rapidas durante la vigilia y las neuronas tipo II disminuyen su intervalo de disparo durante esta fase y exhiben un incremento significativo en un intervalo de descarga durante el SL en comparación con la vigilia quieta. Estos dos tipos de neuronas presentan potenciales de acción de 1 a 2 msegundos de duración y una velocidad de conducción rápida. La distribución de este tipo de neuronas en el hipotálamo posterior es difusa (Sakai y col. 1990).

Recientemente, los trabajos de Lin y colaboradores (1987) han demostrado por medio de estudios inmunohistoquímicos, la existencia de neuronas histaminérgicas en la parte ventrolateral del hipotálamo posterior de la rata y del gato, sugiriendo con ello que las neuronas histaminérgicas constituyen una vía ascendente hacia la corteza cerebral, hipocampo, AP, caudado putamen, núcleo del rafe dorsal, núcleo del tracto solitario y médula espinal y que participan durante la fase de vigilia, ya que la inyección de alfa-fluorometilhistidina, un inhibidor específico de la histidina descarboxilasa en la región ventrolateral del hipotálamo

posterior, incrementa el SL, así mismo la inyección de SKF-91488 un inhibidor específico de la histamina N-metiltransferasa en la misma estructura incrementa el periodo de duración de la vigilia. Por lo que la inyección local de histamina en la parte ventrolateral del hipotálamo posterior incrementa significativamente la vigilia, este efecto se ve suprimido por el tratamiento con miperamina un agonista del receptor H1 de la histidina. Estos resultados sugieren que el mecanismo post-sináptico de excitación hipotálmica es histaminoceptivo a través de receptores H1 y que desempeñan un papel importante en la regulación del despertar (Lin y col. 1987). Por lo tanto, estos hallazgos experimentales apoyan de forma directa que una de las regiones más importantes del diencefalo en los mecanismos de regulación del ciclo vigilia-sueño es el hipotálamo, ya que la lesión o inhibición específica de determinadas áreas prueban que estos grupos neuronales forman parte directa de un complejo mecanismo encargado de activar o inhibir ya sea de forma directa o indirecta, ciertos grupos neuronales que tienen como función desencadenar los fenómenos que definen las diferentes fases del sueño.

Uno de los aspectos importantes a considerar es que el sueño es un fenómeno circádico, es decir tiene una periodicidad de 24 horas, sin que la información del medio modifique su aparición. La generación de un ritmo circádico se encuentra en la mayoría de las especies de vertebrados superiores, para su generación es necesario una estructura neuronal especializada en la generación y regulación de este ritmo, y es el núcleo supraquiasmático, esta estructura está formada por un pequeño grupo de neuronas que se encuentran colindando medialmente con el tracto infundibular y el tercer ventrículo, ventralmente con el quiasma óptico y dorsalmente con la porción anterior del núcleo paraventricular y el núcleo anterior hipotálmico (Guldner y col. 1985). La heterogeneidad de funciones que tiene dicha estructura, la hacen un centro de interés en la investigación de la neurobiología actual. Dentro de esta multiplicidad de funciones está su papel como regulador en el mecanismo de periodicidad del ciclo vigilia-sueño. Se ha demostrado que lesiones bilaterales de esta estructura

en roedores, genera un desequilibrio en la periodicidad del sueño, este efecto también se presenta en animales privados de sueño por 24 horas por medio de locomoción forzada y con lesión bilateral del núcleo supraquiasmático (Borbély y Tobler, 1985).

Por otro lado se ha visto que el núcleo supraquiasmático recibe proyecciones aferentes de ciertas regiones que participan en los mecanismos de mantenimiento o regulación del sueño, como el área preóptica medial, el área hipotálamica anterior (Guldner, 1976), así mismo recibe proyecciones del tálamo, del núcleo talámico paraventricular (Guldner y Wolff, 1974) y del núcleo geniculado lateral ventral, así como también del cerebro medio, como el núcleo de rafe medio, que manda proyecciones serotoninérgicas (Guldner, 1985), al núcleo del rafe dorsal (Moore, 1988) y el núcleo tegmental dorsal y ventral (Guldner, 1985). Por lo que se refiere a las vías eferentes, estas han sido estudiadas por inmunocitoquímica, para el VIP y vasopresina, así como por autorradiografía y de degeneración de vías, encontrando que manda eferentes al área preóptica, área hipotálamica anterior, al núcleo talámico paraventricular, la BDB y al núcleo del tracto solitario (Guldner, 1985, Card y col. 1981, Kucera y Favrod. 1979). Por lo que se considera que la ruptura en el patrón circádico de sueño ya sea por lesión o por desfaseamiento del periodo luz/obscuridad sea debido a la ruptura entre el complejo mecanismo de interacción de estas estructuras con el núcleo supraquiasmático y su relación entre los estímulos procedentes del medio. Sin embargo, el sueño no sólo está regulado por el factor circádico, también participan factores homeostáticos que mantienen la cuota diaria de sueño, dependiendo de la cantidad de sueño o vigilia durante el ciclo (Borbély y Tobler, 1985). Es decir la cantidad de sueño está en relación directa con la duración de la fase de vigilia, a mayor tiempo de duración de vigilia, se prolonga el tiempo de duración de sueño y viceversa. Además se ha demostrado que el proceso homeostático y circádico son independientes, la lesión del núcleo supraquiasmático genera un desequilibrio en el patrón circádico, como ya se vio con anterioridad, pero no afecta la cuota diaria de sueño, por lo que el

componente homeostático de regulación del sueño es una estructura funcional y morfológicamente diferente al componente circádico (Borbély y col. 1989).

Otro aspecto importante a tratar sobre el papel que tiene el diencefalo en el ciclo vigilia-sueño, es el que concierne a la termoregulación. Varios experimentos han encontrado que la temperatura cortical y subcortical en varias especies de mamíferos, como gatos, conejos, ratas, perros y ovejas, se incrementa durante el sueño MOR (Hayward y Baker, 1969). Para explicar estas irregularidades en el control de la temperatura durante el ciclo vigilia-sueño y en especial durante la fase de sueño MOR, se han postulado algunas hipótesis al respecto, primeramente que el incremento en la temperatura corporal durante esta fase de sueño se debe a un aumento en la tasa metabólica local (Tachinaba, 1969) o bien a que hay un incremento de la temperatura del flujo sanguíneo cerebral que genera a su vez la pérdida de calor por la piel y las mucosas nasales (Hayward y Baker, 1969). Otra hipótesis es que durante el SMOR hay cambios en el flujo sanguíneo cerebral que inducen el incremento de la temperatura cerebral (Tachinaba, 1969). Recientemente se ha demostrado que ciertas áreas hipotálamicas están desempeñando un papel importante en la regulación de la temperatura durante el ciclo vigilia-sueño (Denoyer y col, 1991). Las lesiones hechas con ácido iboténico en el hipotálamo posterior, en particular sobre el área dorsal hipotálamica (DA), área lateral hipotálamica (ALH), área hipotálamica posterior (AHP), núcleo supraóptico (SO), tracto mamilotálamico (TM) y núcleo hipotálamico ventromedial (VMH), tienen como resultado la supresión del incremento de la temperatura cerebral durante el SMOR, lo que se atribuye a la pérdida específica de los cuerpos neuronales de estas áreas del hipotálamo. De acuerdo con estos resultados se postuló que el área dorsal hipotálamica manda proyecciones ventrales al núcleo lateralis paragigantocelular (nLPG) (Hosoya y col, 1989) que origina una vasoconstricción cerebral, responsable del incremento de la temperatura durante el SMOR. Así mismo se ha visto que el AP también desempeña un papel importante, en el aspecto de termoregulación durante el ciclo vigilia-sueño. Las alteraciones en la temperatura local del AP modifican a su vez

las fases de sueño, en los estudios de estimulación térmica del AP se induce sincronización cortical en ratas (Benedek y col, 1976).

Las lesiones del área preóptica afectan tanto las fases de sueño, prolongando el tiempo de duración de la vigilia, así como el mecanismo de regulación de la temperatura (McGinty y Serman, 1968). En los estudios de estimulación adrenérgica en el área preóptica medial (MPA) de ratas se induce hipotermia (Datta y col, 1985). Mientras que la estimulación adrenérgica de esta misma área induce vigilia. Por lo tanto hay una interrelación entre dicha estructura y los cambios de temperatura corporal y las fases del ciclo vigilia-sueño. Estos trabajos se han corroborado con estudios más recientes, en los que la aplicación de bloqueadores adrenérgicos, como la fentolamina y la fenoxibenzamina, inducen hipotermia y sueño (Datta y col, 1988). Se sugiere que la regulación de la temperatura y el mecanismo de regulación del sueño, son procesos independientes, esto se basa en las observaciones obtenidas a partir de las microinyecciones de 5-hidroxitriptamina en AP que inducen hipotermia sin afectar las fases del sueño.

Por otra parte, los trabajos de Feldberg y Myers (1964) sugieren que el mecanismo de regulación de la temperatura corporal durante el sueño, es mantenido por el hipotálamo y dos neurotransmisores, la serotonina (5-HT) y la norepinefrina (NE). Esta hipótesis se basa únicamente en los métodos de administración de dichas drogas, que causan un decremento o aumento en la temperatura, dependiendo del tipo de especie, la dosis y la vía de administración (Clark y Clark, 1980). Sin embargo en gatos tratados con PCPA se ha encontrado un incremento significativo en la temperatura corporal (Li y Satinoff, 1992).

EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN c-fos PARA MAPEO METABOLICO A NIVEL CELULAR

Dentro de la naturaleza, todos los seres vivos tienen la capacidad de responder a los estímulos del medio ambiente, desde el sistema biológico más simple, hasta el organismo más complejo. Este hecho, tan característico está determinado, por la propiedad que tienen todas las células, para dar respuesta a las diferentes señales tanto del medio interno, como externo y mantener de esta manera, el equilibrio que les permite sobrevivir. Este mecanismo de comunicación estímulo-respuesta, está altamente desarrollado en las células nerviosas, ya sea por medio de señales químicas o eléctricas. Estas señales, pueden inducir tres diferentes tipos de respuestas: a corto, mediano y largo plazo. Las respuestas a corto plazo son aquellas que activan canales iónicos y producen cambios eléctricos en la membrana y cuya duración es de milisegundos. Las respuestas a mediano plazo, son aquellas que implican el funcionamiento de segundos mensajeros y duran segundos o minutos y por último, las respuestas a largo plazo están reguladas por mecanismos de transducción acoplados a vías de segundos mensajeros que modifican la transcripción del material genético (Sudol y col. 1993). En los últimos años, se ha comprobado que los segundos mensajeros inducen la expresión temprana de proto-oncogenes como c-fos y c-jun (Herschman y col. 1991) aunque también se ha visto que pueden expresarse por algunos esteroides, que actúan directamente sobre el núcleo de la célula. Sin embargo la expresión de c-fos ha recibido una atención especial por parte de la comunidad de neurobiólogos, debido al interés que se tiene, por entender los mecanismos que participan en la transducción de señales celulares. El proto-oncogen c-fos es la contraparte del oncogen viral v-fos (Curran, 1988) y se expresa en muchos tejidos en respuesta a estimulación con factores de crecimiento y neurotransmisores (Greenberg y col. 1987, Herschman y col, 1991). Este proto-oncogen codifica una fosoproteína nuclear denominada Fos, que esta formada por 380 aminoácidos (Dragunow y Faull, 1989).

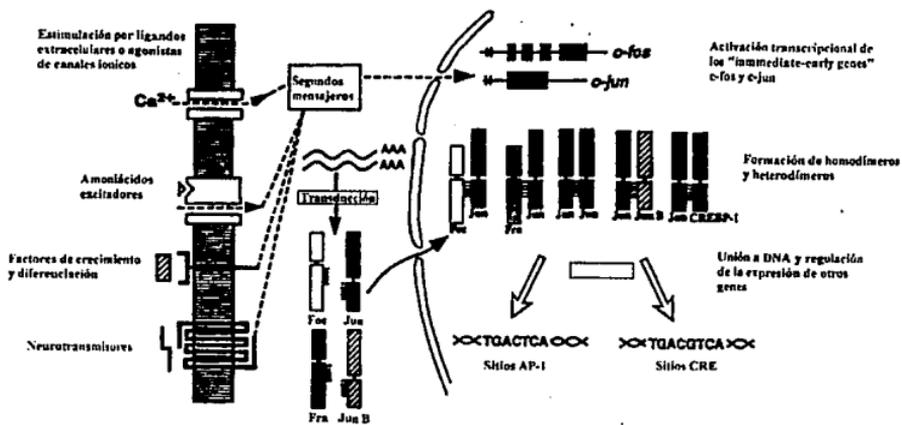
La función del c-fos no se conoce actualmente, pero se sugiere que actúa como "tercer mensajero" en el sistema de transducción de señales, posiblemente la proteína Fos regula la expresión de otros genes y por lo tanto las respuestas neuronales a largo plazo (Sheng y Greenberg, 1990) Figura 8.

La expresión de Fos puede incrementarse por diferentes manipulaciones, ya sean farmacológicas o tratamientos fisiológicos. Por ejemplo, el pentilenoetrazol y el "kindling" inducen una elevación en los niveles de expresión de Fos en la corteza piriforme, amígdala, septum, bulbo olfatorio y las células granulares del hipocampo (Dragunow y Robertson, 1988). El c-fos también se induce por estimulación eléctrica producida por potenciación a largo plazo, en el giro dentado del hipocampo de rata, por estímulos luminosos en el núcleo supraquiasmático durante el desfasamiento del ciclo luz-obscuridad y en el bulbo olfatorio (Dragunow y Faulk, 1990, Mead y col, 1992, Brennan y col, 1992).

Estos estudios demuestran que el proto-oncogen c-fos es un buen marcador de la actividad neuronal, bajo diferentes condiciones, en el sistema nervioso central (Morgan y col, 1987). Permite con ello, ser una buena técnica de mapeo de actividad neuronal relacionada a la activación de cascadas de segundos mensajeros (Sagar y col, 1988). Esta técnica de mapeo metabólico, con ayuda de técnicas de inmunohistoquímica es similar en algunos aspectos a la autoradiografía con 2-desoxiglucosa. Aunque presenta algunas ventajas:

- 1- Tiene resolución celular, por medio del marcaje de los núcleos.
- 2- Permite identificar las células que expresan esta proteína.
- 3- Por medio de dobles Inmuno marcajes, se pueden identificar los neurotransmisores que las neuronas utilizan.

Figura 8. Vías propuestas para la inducción de la transcripción de c-fos y c-jun por ligandos extracelulares. Las proteínas codificadas, Fos y Jun respectivamente, son sintetizadas y translocadas al núcleo donde forman dímeros. Estos dímeros proteicos se unen a secuencias controladoras transcripcionales (AP-1 o CRE) que regulan la transcripción de otros genes (Tomado de Sudol y col, 1993).



Sin embargo como todas las técnicas, presenta algunas desventajas entre las cuales estan:

- 1 - La expresión de c-fos puede elevarse de manera inespecífica por el estrés inducido por las manipulaciones experimentales (Ceccatelli y col, 1989).
- 2 - No todas las neuronas tienen la capacidad de expresar c-fos, aunque hayan sido expuestas a un determinado método de activación.

Sin embargo, esto no ha impedido que se haya utilizado bajo estrictas condiciones experimentales ya que es una técnica que permite explicar procesos fisiológicos a partir del mapeo de las regiones cerebrales que intervienen en algun fenómeno. Ejemplo de ello, es la utilidad de esta técnica para cuantificar la expresión circádica de Fos en el hipocampo y la corteza, así como en el centro de regulación de estos ritmos, el núcleo supraquiasmático, en donde se exponía a Hamsters a diferentes períodos de luz, con desfases en el ciclo de 12 horas luz por 12 de oscuridad, encontrándose que la expresión de Fos se incrementa en aquellos animales con mayor tiempo de exposición y desfase en el período normal del ciclo. Esta misma técnica a permitido hacer mapeos de diferentes regiones del sistema nervioso central y en años recientes sobre aquellas estructuras que participan durante el ciclo vigilia-sueño. Merchant-Nancy y col, en 1992 utilizando esta técnica de mapeo de actividad neuronal, cuantificaron el número de neuronas por estructura que expresa c-fos en el tallo cerebral de animales que presentaron periodos de SMOR espontáneos y en aquellos en los que se prolongó esta fase de sueño, ya sea por EA o PS. Encontrando un aumento en la expresión de Fos, en el grupo de EA en: PPT, núcleo parabraquial, núcleo subcoeruleus, núcleo del tracto solitario, estructuras en las cuales se han descrito neuronas REM-on, así mismo se encontró que los niveles de inmunoreactividad a Fos en estructuras donde se han descrito neuronas REM-off no presentaron cambios en ninguna de las condiciones experimentales entre las que estan el LC, el rafe dorsalis y el rafe medialis, las estructuras que presentaron incremento en

la expresión de Fos durante la PS fueron el rafe pallidus y el LDTg. Sugiriendo con ello que el mantenimiento del SMOR no depende únicamente de la actividad de las neuronas REM-on, sino que también depende del reclutamiento de otras neuronas activas, por lo tanto el aumento de la duración del SMOR es resultado de un incremento en los niveles de excitabilidad neuronal. Shiromani en el mismo año (1992) midió la Inmunoreactividad a Fos en la región dorsolateral pontina asociada con el sueño MOR encontrando que los niveles de expresión de Fos estaban en relación con esta fase del sueño. Otros estudios entre los que se encuentran lo de Pompeiano y col, (1992) que realizaron un mapeo de varias regiones del cerebro, en animales privados de sueño por 24 horas. Aunque no hizo una cuantificación directa del número de neuronas que expresaron Fos por estructura, encontró una relación entre la expresión de Fos, con la privación de sueño. Sobre todo en las regiones relacionadas directamente con la inducción y mantenimiento del sueño lento, como el área preóptica medial (MPA) del hipotálamo, área también participa en la regulación de la temperatura durante esta fase de sueño. Así como también el núcleo del rafe dorsal, el locus coeruleus, pedúnculo pontino, núcleo laterodorsal tegmental y núcleo parabraquial, que participan en la regulación del sueño MOR. Recientemente estudios de manipulación farmacológica del SMOR por medio de carbacol, han encontrado también que la expresión de Fos se incrementa en FRP y medial, el núcleo dorsolateral pontino, varios núcleos de rafe, incluyendo el dorsal, central superior, magnus, pallidus y obscurus. Estructuras del tallo cerebral de las cuales ya se discutió anteriormente y que mantienen una estrecha relación con la fase de SMOR (Yamuy y col, 1993). Por lo tanto este conjunto de datos indican que la expresión de c-fos puede relacionarse con un fenómeno fisiológico en particular. Con base en los antecedentes mencionados y considerando la importancia de la excitabilidad de diversos grupos neuronales que participan en el disparo y mantenimiento del ciclo sueño-vigilia, el presente trabajo tiene como objetivo cuantificar la expresión c-fos en diencéfalo de animales PSMOR y estimulados auditivamente, para tratar de vincular los mecanismos de mantenimiento de SMOR, en esta área del cerebro.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar el número de células Inmunoreactivas a Fos en el diencéfalo, en animales que presentaron periodos de SMOR control y en aquellos que mostraron un aumento en la duración de esta fase, ya sea por EA o PS

MATERIALES Y METODOS

Dieciocho ratas macho (180 a 200 gr) de la cepa Wistar fueron implantadas para registros convencionales de sueño. Bajo anestesia con hidrato de cloral (400 mg/Kg intramuscular) y en condiciones de asepsia, fueron colocados tornillos de acero inoxidable, en los huesos parietales para registrar EEG, así como a 1 mm posterior de bregma y 1 mm lateral, para registrar la actividad teta hipocampal. Para el registro del EMG se insertaron alambres de acero inoxidable recubiertos de teflon en los músculos de la nuca. Los electrodos se soldaron a un conector Winchester modelo SME y se fijaron al cráneo con acrílico dental. Los animales se trataron con antibiótico (1,000,000 U/Kg de Penicilina G) al finalizar la implantación.

Después de una semana de recuperación las ratas fueron habituadas durante tres días al método de privación selectiva de sueño MOR y al sistema de registro polisomnográfico. El método de privación denominado método del florero invertido (Vogel, 1975), consiste en poner a la rata en un pedestal de 5 cm de diametro y 20 cm de alto. Este pedestal está fijado a un tanque de tres galones de capacidad con un nivel de agua de 4 cm, en el cual los animales tienen libre acceso a comida y agua. Por otro lado el sistema de registro consta de una cámara sonoamortiguada y faradizada, que se encuentra conectada a un polígrafo Grass modelo 79 D. En esta cámara hay ventilación e iluminación constante, asimismo la conducta de la rata puede ser observada durante el registro por medio de un sistema de espejos.

Una vez terminada la habituación, los animales se dividieron en tres grupos experimentales. El grupo control C (n=6), el grupo de estimulación auditiva EA (n=6) y el grupo de privación de sueño PS (n=6). La sesión de registro comenzó a las 14:30 hr en todos los grupos y solamente se utilizaron los animales que presentaron vigilia y SL durante un primer intervalo de 30 a 60 minutos, pero que además presentaron tres períodos de sueño MOR a lo largo de un segundo

Intervalo de 30 a 60 minutos. El grupo de estimulación auditiva recibió un estímulo auditivo en forma de un "bip" de 80 dB de intensidad, 20 ms de duración y 1 KHz de frecuencia, que fue aplicado cada 20 segundos, a lo largo de los tres períodos de SMOR registrados. El período de privación fue por 48 horas anteriores al registro. Al finalizar la sesión de registro, todos los animales se mantuvieron despiertos en una cámara sonoamortiguada durante 30 minutos, considerado como tiempo de sobrevivencia. El tiempo de sobrevivencia contempló la capacidad temporal de traducción de Fos en el cerebro, in vivo: pues se ha observado que el número de células Inmunoractivas a Fos (IF) alcanza su máximo 30 minutos después de generar una convulsión con metrazole. Este pico en la IF se mantiene durante 90 minutos, de tal forma que los tres períodos de SMOR registrados pudieron haber tenido una influencia máxima en la expresión de c-fos.

Una vez concluido el tiempo de sobrevivencia, los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron con 300 ml de Buffer de fosfatos + solución salina, pH 7.4, 0.1 M (PBS), seguidos de 200 ml de paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros fueron removidos y colocados en una solución de sacarosa al 30% durante 48 horas. Posteriormente se procesaron para histología y se hicieron cortes sagitales de 40 micrómetros de grosor en un criostato (Scientific Instruments) a una temperatura entre los -13 y -18 C. Los cortes fueron lavados tres veces (10 minutos por lavado) con PBS 0.01 M y 0.1% de triton X-100 Y posteriormente incubados durante 20 minutos en 10% de suero normal de cabra (Vector laboratories). Una segunda incubación se hizo con el anticuerpo anti-fos p55, donado por el Dr. Tom Curran del Roche Institute for Molecular Biology, a una dilución 1/2000 por 72 horas a 4 C. Después de tres lavados de 10 min con PBS, los cortes fueron procesados para la técnica de inmunohistoquímica del complejo avidina-biotina o ABC. Esta técnica consiste en incubar los cortes por 2 horas con un anticuerpo anti IgG de conejo (1/200) en una solución de PBSTG (PBS 0.1 M CON 0.3% de triton y 1% de suero normal de cabra). Después los cortes son lavados por 30 minutos e incubados por dos horas en PBSTG con avidina y biotina a una dilución 1/60. Nuevamente los cortes son

lavados 3 veces e incubados por 5 minutos en 0.1 M de trizma (pH 7.4) con diaminobenzidina. Se agrega entonces peróxido de hidrógeno (0.7%) y se espera a que la reacción específica sea evidente. Al final los cortes son lavados tres veces y colocados en portaobjetos con una capa de gelatina, deshidratados y montados con Permount.

El número de neuronas inmunoreactivas a Fos por estructura fue cuantificado con la ayuda de un analizador digital de imágenes (MCID). Los cortes correspondieron a tres diferentes niveles en el plano antero-posterior y se analizaron de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson, 1985. Es importante señalar que el área de muestreo fue constante gracias a la definición de límites espaciales de muestreo que permite hacer el MCID.

Los datos de los registros polisomnográficos fueron calificados de forma visual. Se calculó el porcentaje de cada fase del ciclo vigilia-sueño y la media de los períodos de SMOR, así como el número promedio de neuronas por estructura que expresaron Fos por animal analizado. Los datos se analizaron por medio de la prueba estadística de ANOVA de una vía, además se aplicó la prueba de Fisher para saber donde se encontraban las diferencias entre cada uno de los grupos.

RESULTADOS

Los resultados se dividen en dos grupos, los de registros polisomnográficos y los de Inmunoreactividad a Fos:

1) Registros Polisomnográficos.

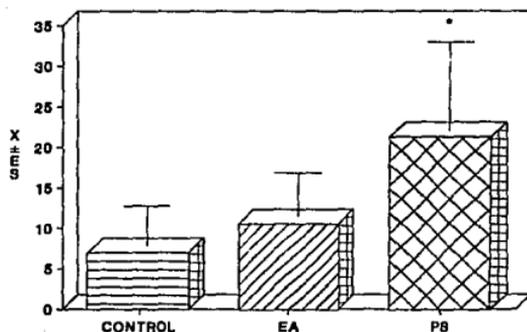
Los resultados, mostraron un aumento en el porcentaje ($F=22.4$ $p<0.05$) y la duración de los periodos de SMOR ($F= 25.2$ $p<0.05$) en los grupos de estimulación auditiva (EA) y privación de sueño (PS) en comparación al grupo control ($p<0.05$). Los grupos de estimulación auditiva y privación de sueño presentaron un incremento aproximado del 60% en la duración media de los periodos de SMOR (Figura 9).

2) Inmunoreactividad a Fos:

Los datos estadísticos obtenidos del promedio de células Inmunoreactivas a Fos en los tres niveles muestreados, se agrupan de la siguiente forma:

a) En los datos obtenidos de Inmunoreactividad a Fos se observó que los grupos experimentales de EA y PS presentaron un incremento significativo en el número de neuronas que expresaron este proto-oncogen. El análisis de varianza mostró que las estructuras que presentaron valores significativos en la Inmunoreactividad a Fos en los grupos de EA y PS son: el área hipotálmica dorsal (DA), el área lateral hipotálmica (LH), el núcleo supraquiasmático (SCH) y el núcleo amigdalino basolateral (BLA). El área hipotálmica dorsal presentó un incremento significativo en el grupo de estimulación auditiva ($F=5.58$ $p< 0.01$) (Figura 10a), el área hipotálmica lateral ($F=7.92$ $p< 0.05$), en el núcleo supraquiasmático ($F=7.70$ $p< 0.005$) y el núcleo amigdalino basolateral ($F=2.85$ $p< 0.05$), presentaron incremento en los grupos de EA y PS (Figura 10a y 10b).

PORCENTAJE DE SMOR



DURACION DE SMOR

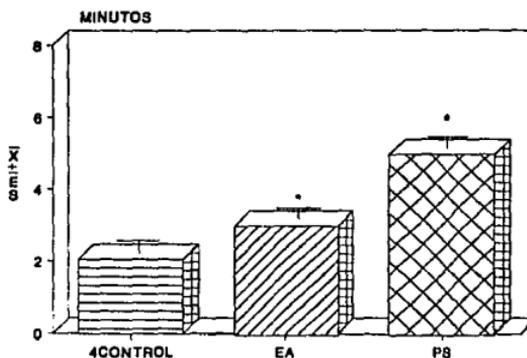
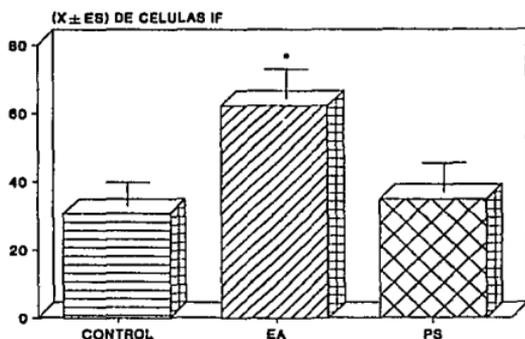


Figura 9. En estas gráficas se muestra los porcentajes y la duración media de los periodos de SMOR. En los diferentes grupos experimentales. En el panel de arriba se muestra el porcentaje, note el incremento en el grupo de privación de sueño (PS). En el panel de abajo se observa un aumento en la duración media para el grupo de EA y PS $(p < 0.05)$

N.DORSOLATERAL HYP



NUCLEO LATERAL HYP.

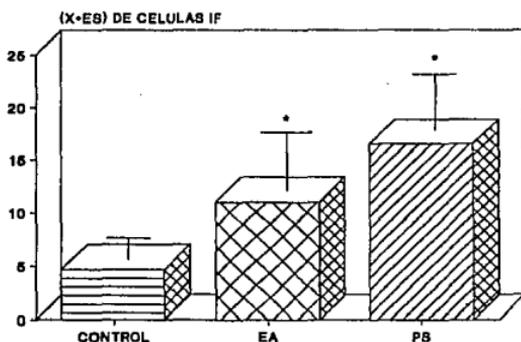
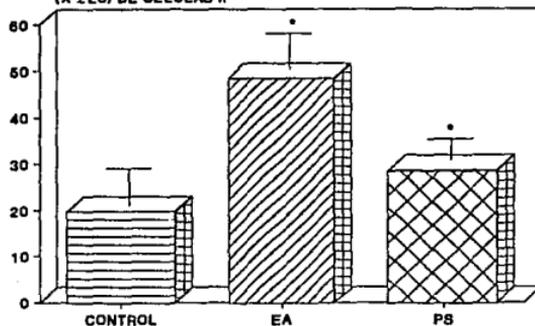


Figura 10a. En esta figura se muestra el promedio del número de neuronas que expresaron Fos en los grupos de EA y PS, en el núcleo Dorsolateral Hipotalámico y Lateral Hipotalámico *($p < 0.05$)

N. SUPRAQUIASMATICO

(X ± ES) DE CELULAS IF



N. AMIGDALINO BASOLATERAL

(X ± ES) DE CELULAS IF

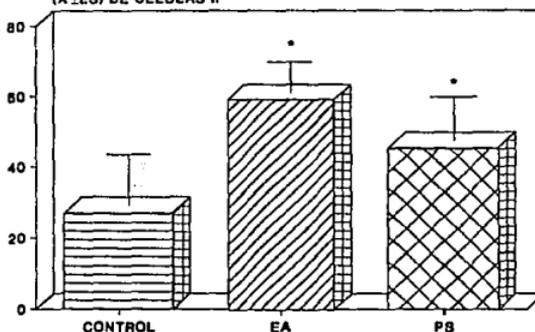


Figura 10b. La grafica representa el número de neuronas inmunoreactivas a Fos (IF) en los grupos de estimulación auditiva (EA) y privación de sueño (PS) en los núcleos supraquiasmático y amigdalino basolateral $(p < 0.05)$

b) Sin embargo hay estructuras que presentaron cierta tendencia, en el aumento de neuronas Inmunoreactivas, por EA o PS, aunque no presentaron diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fisher (F), estas se muestran en la tabla 1.

c) Los diferentes niveles del área preóptica muestreados no presentaron diferencias significativas en ninguna de las condiciones experimentales (Figura 11).

d) Por último se observó que algunas estructuras no expresaron Fos en ninguna de las condiciones experimentales: el núcleo basal de Meynert, el núcleo talámico ventromedial y el globo pálido.

e) En las Figuras 12, 13 y 14, se presentan los diferentes niveles muestreados y la expresión de Fos de forma esquemática de cada uno de las áreas y núcleos analizados.

<i>ESTRUCTURA</i>	<i>VALOR DE PRUEBA DE FISHER (F) *</i>
Area Hipotálamica Anterior	0.75
Campos de Ammon (CA1)	0.98
Area Preóptica Lateral	0.71
Area Preóptica Medial	1.26
Núcleo Preóptico Medial	0.36
Corteza Piriforme	0.70
Corteza Cerebral	0.97
Núcleo Talámico Paraventricular	0.53
Núcleo Talámico Ventromedial	0.53

Tabla 1. Muestra los valores de F ($p < 0.05$) en las estructuras que presentaron cierta tendencia en la expresión de células Inmunoreactivas a Fos en alguna de las condiciones experimentales.

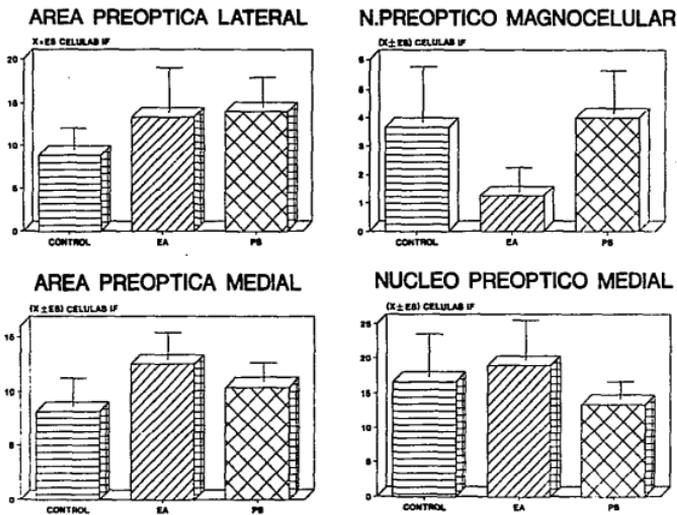
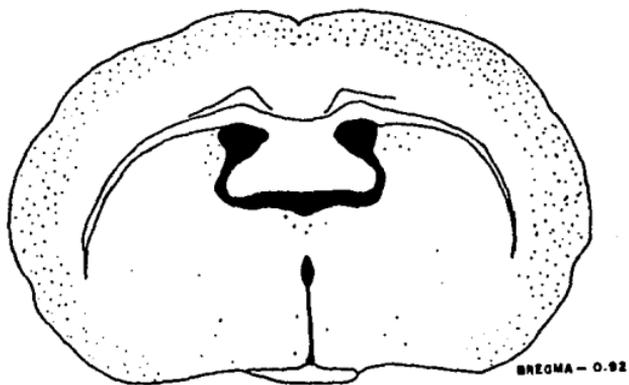


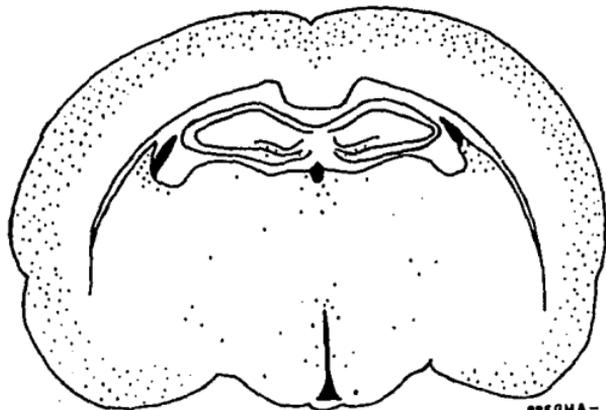
Figura 11. En esta figura muestra los diferentes niveles del área preóptica muestreados, note que no hay diferencias significativas en ninguna de las condiciones experimentales (EA y PS).



BREGMA - 0.92



BREGMA - 1.40



BREGMA - 2.56

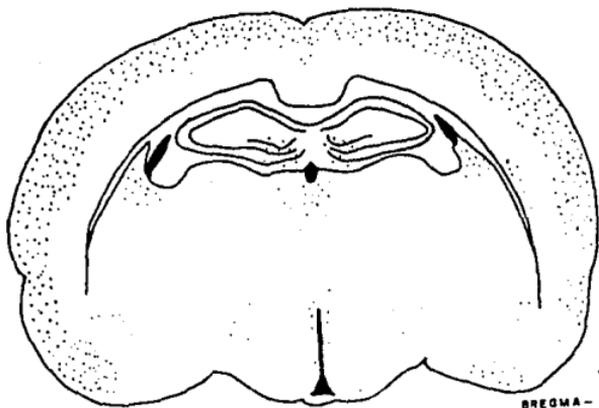
GRUPO CONTROL



BREGMA - 0.92

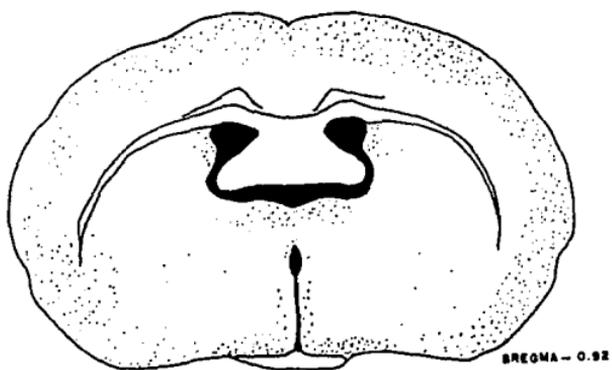


BREGMA - 1.40



BREGMA - 2.58

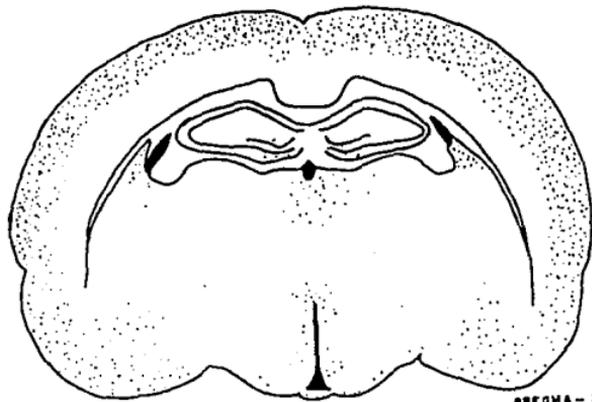
GRUPO DE EA



BREGMA - 0.92



BREGMA - 1.40



BREGMA - 2.36

GRUPO DE PS

pag. 58

DISCUSION

Los resultados del presente estudio sugieren que la estimulación auditiva y la privación del SMOR permiten manipular la duración de esta fase del sueño en la rata, este incremento en la duración ya se había probado con anterioridad, sugiriendo con ello que este fenómeno no es un hecho aislado restringido a una sola especie. Los estudios anteriores han demostrado que también en gatos se presenta un incremento similar, bajo las mismas condiciones de estimulación (Drucker-Colín y col, 1983), este incremento también se ha observado en humanos (Salín-Pascual y col, 1992).

El incremento en la duración de la fase de SMOR por estimulación auditiva fue de un 60%, este incremento ya se había observado con anterioridad en el gato (Drucker-Colín y col, 1983) y recientemente en la rata (Merchant-Nancy y col, 1992). Por lo que respecta a la privación de sueño MOR se encontró que hay disminución en la latencia de aparición de esta fase y un aumento en la frecuencia. Esto sugiere que ambas manipulaciones (EA y PS) producen un efecto sobre el sistema de mantenimiento del SMOR, que incrementa sus niveles de excitabilidad neuronal generando con ello un aumento en esta fase de sueño. Así mismo este tipo de manipulaciones del ciclo vigilia-sueño permiten disectar de forma clara algunos de los aspectos más importantes de la neurobiología del sueño, como es el incremento de la fase de sueño MOR a partir del procesamiento de información sensorial. Por lo tanto el sueño no es un fenómeno aislado y homogéneo, éste depende básicamente de la actividad neuronal de un gran número de estructuras que se encuentran activas y generando flujo de información hacia diferentes áreas del cerebro.

Para el caso del análisis de inmunoreactividad a Fos por estructura, los resultados muestran que la expresión de Fos se relaciona con ciertas poblaciones neuronales que se ha visto que participan en algunas de las fases del ciclo vigilia-

sueño. Estas estructuras son: el área hipotálamica dorsal (DA), el área lateral hipotálamica (LH), el núcleo supraquiasmático (SCH) y el núcleo amigdalino basolateral (nBLA).

Se consideraran primeramente algunos aspectos importantes sobre la cuantificación de Fos en el sistema nervioso. En los trabajos de Yamuy y col, (1993) sobre el mapeo de diferentes regiones de tallo cerebral en relación a la inducción de la fase de SMOR por carbacol, se consideraron dos tipos de poblaciones celulares, una que denominaron células "falso negativas" que corresponden a aquellas células que expresaron Fos pero que no mantienen una relación con el estímulo o el fenómeno fisiológico que se esta midiendo y las células "falso positivas" que son aquellas que expresaron Fos, pero que se activaron indirectamente (transinápticamente). Con base en está tenemos que para las células "falso negativas" existen dos posibilidades de expresión de Fos: uno que corresponde a las células que se pudieran haber activado por el estrés, ya que se ha demostrado que este fenómeno puede inducir la expresión de c-fos en diferentes áreas de sistema nervioso central (Ceccatelli y col, 1989), y el segundo grupo dentro del cual se encuentran las células que se activaron por los métodos quirúrgicos ya que algunos estudios han visto que dicha manipulación induce la expresión de Fos en regiones sensoriales del asta dorsal de la médula y en otras regiones del cerebro (Hunt y col, 1987). En base a esto el diseño experimental de este trabajo contempló estas variables, por ello los diferentes grupos experimentales se mantuvieron bajo las condiciones mínimas de estrés, además de que se dio un periodo de recuperación posterior a la intervención quirúrgica de una semana, considerando que se han propuesto 36 horas como mínimo para que la expresión de Fos por este tipo de manipulación retorne a sus niveles basales (Dragunow y Fauli, 1989). Por lo cual consideramos que las diferentes poblaciones celulares que expresaron Fos en alguna de las condiciones experimentales (EA y PS) en comparación con las condiciones basales (Control), representan los grupos neuronales que mantienen una relación específica con el ciclo vigilia-sueño.

En los antecedentes se discutió acerca de los estudios recientes sobre la expresión de Fos para explicar procesos fisiológicos apartir del mapeo de las regiones cerebrales que participan en dicho fenómeno, los estudios realizados por Merchant-Nancy y col, (1992), Shiromani y col, (1992), Pompelano y col, (1992) y Bruce y col. (1993) y Yamuy y col, (1993) en diferentes regiones cerebrales en relación a la duración del sueño MOR inducida por periodos prolongados de privación de esta fase de sueño o por manipulación farmacológica, ha llevado a proponer que el sueño no es un fenómeno homogéneo que incluye sólo un número determinado de estructuras, sugiriendo con ello que el mantenimiento del SMOR no depende únicamente del incremento de la actividad de las neuronas REM-on propuestas por Sakai y col, (1986), y Hobson y col, (1974), entre los más importantes, sino, que también depende del reclutamiento de otras neuronas activas. Por lo tanto, la duración del SMOR es resultado de un incremento generalizado en los niveles de excitabilidad neuronal. Esto pone de manifiesto, que los resultados obtenidos en este trabajo mantienen este concepto en relación al sueño, y en particular a la fase de movimientos oculares rápidos (MOR).

Las estructuras que presentaron niveles elevados de Inmunoreactividad a Fos por ambas manipulaciones (EA y PS), muestran una relación directa con los mecanismos de mantenimiento o generación del ciclo vigilia-sueño, aunque no específica con el SMOR. Se ha demostrado como ya se mencionó en los antecedentes, que el área dorsal hipotálamica (AD) desempeña un papel importante en la regulación de la temperatura cerebral durante el SMOR. Debido a ello se ha fundamentado una hipótesis que plantea que el AD manda proyecciones ventrales al núcleo lateralis paragigantocelular (nPGL), que es la estructura encargada de iniciar una vaso contricción cerebral y con ello el incremento de la temperatura cerebral durante el SMOR (Hosoya y col. 1989). Además debemos de considerar que actualmente no se conoce si existen vías aferentes o de relevo de la vía auditiva hacia el AD, por lo cual consideramos que la expresión de Fos en esta estructura sea debido a el papel que tiene como responsable de la regulación de la temperatura cerebral durante la fase de SMOR, independientemente de que la

expresión de Fos fue mayor en el grupo de EA, ya que en ambas condiciones experimentales (EA y PS) la duración del SMOR se incrementó y con ello la activación del mecanismo de termoregulación cerebral. La expresión de Fos en el núcleo supraquiasmático se presentó por ambas manipulaciones (EA y PS). Se ha demostrado que dicha estructura es la encargada de regular la actividad circádica del ciclo vigilia-sueño (Tobler y Borbély, 1985). Además de que es una estructura que recibe vías aferentes de un gran número de regiones del cerebro, pero en particular de algunas áreas que participan en el sueño, por lo que respecta a este punto y en relación a la expresión de Fos por EA, se ha visto que dicha estructura recibe vías aferentes del núcleo geniculado ventrolateral (Guldner y col. 1985). Este núcleo es una de las divisiones del cuerpo geniculado medial, que es una vía talámica de relevo de la vía auditiva, por lo tanto se sugiere que la expresión de Fos por EA en esta estructura se deba a la activación de la vía auditiva por el estímulo, así como del núcleo supraquiasmático en forma simultánea. Por lo que se refiere a la privación de sueño, se ha visto que si se priva a un animal por 24 horas, hay una ruptura en el patrón circádico (Borbély y Tobler, 1985). Así mismo la lesión bilateral de este núcleo también, genera un desequilibrio en la periodicidad del sueño. Tomando en cuenta estos aspectos, podemos considerar que los niveles de expresión de Fos tan elevados que se encontraron en los animales privados de sueño, sean debidos a las 48 horas de privación anteriores al registro y al papel tan importante que tiene esta estructura como reguladora de la actividad circádica. Por lo tanto podemos considerar que la ruptura en el patrón circádico del sueño genera un estado de excitabilidad neural que depende de la interacción de estas estructuras con los estímulos procedentes del medio.

En los antecedentes se hizo referencia a que los aspectos de generación y de regulación de sueño pueden ser manipulados de diferentes formas, ya sea a nivel de una sola estructura, por medio de lesión o estimulación farmacológica o eléctrica, o a nivel de un conjunto de estructuras como la estimulación auditiva y la privación del sueño. Referente al punto de lesión de estructuras tenemos que la lesión bilateral del núcleo amigdalino basolateral tiene como resultado una

disminución en el período de sueño y un aumento en la fase de vigilia (Sterman y Shouse, 1985). Así mismo se ha visto que la frecuencia de descarga de las neuronas de este núcleo se incrementa durante el sueño lento (Calvo y Fernández-Guardiola, 1984), aunque no se ha establecido una relación directa con la fase de sueño MOR. Sin embargo se ha observado que la amígdala es una zona de paso en la propagación de la actividad PGO, desde el puente, hasta el cuerpo geniculado lateral del tálamo de forma multisináptica (Calvo y Fernández-Guardiola, 1984). Con base en estos antecedentes y considerando que la actividad PGO también se presenta en las ratas (Callaway y col, 1987) durante el SMOR. Por lo cual consideramos que la expresión de Fos en esta estructura en el grupo de privación de sueño, así como el de estimulación auditiva, es debido al papel que tiene como vía de relevo de las espigas PGO, durante la fase de sueño MOR. Además de que recibe proyecciones del núcleo del tracto solitario, regiones pontinas y locus coeruleus.

Por último, la expresión de Fos en el área lateral hipotálamica, está en relación directa al tiempo de privación al cual estuvieron sujetos los animales. Se ha demostrado que esta estructura participa en el mantenimiento de la fase de vigilia, la lesión de esta área genera hipersomnio (Szymusiak y McGinty, 1986b). Además de que recibe proyecciones de estructuras que participan en el sueño, como el núcleo de rafe dorsal y el complejo de Locus Coeruleus (Sakai y col, 1979) y manda proyecciones a la corteza cerebral vía extratálamica (Saper y col, 1976). Por lo tanto, el haber expuesto a los animales a 48 horas de privación, fue tiempo suficiente para que estos grupos neuronales se activaran y la expresión de Fos fuera evidente. Por lo que se refiere a la expresión de Fos en el grupo de estimulación auditiva, consideramos que posiblemente haya vías colaterales indirectas de interconexión de la vía auditiva con el área lateral hipotálamica. Además que hay que considerar que el hipotálamo como tal, desempeña un papel importante en los aspectos conductuales de los mamíferos. Además en los trabajos de Pompeiano y colaboradores (1992) que privaron de SMOR a ratas durante 24 horas, encontrando un incremento considerable en el número de células

Inmunoreactivas a Fos en algunas áreas hipotálamicas, entre ellas el área lateral hipotálamica, así como también en los estudios de Bruce y colaboradores (1993). Asociando la expresión del proto-oncogen con el periodo prolongado de vigilia inducido por la privación de SMOR.

Por lo tanto este estudio plantea la posibilidad de considerar que la distribución de las células REM-on no es exclusiva de los núcleos del tallo cerebral, teniendo por lo tanto que su distribución es más bien generalizada a lo largo de todo el cerebro. Así mismo, el incremento en la expresión de Fos en los grupos de PS, comprueba que dicha manipulación es capaz de incrementar los niveles de excitabilidad neuronal no sólo a nivel de estructuras del tallo cerebral en donde registros de actividad unitaria han demostrado que la frecuencia de disparo de varios grupos neuronales se incrementa, después de la privación de sueño (Mallick y col. 1989).

Un caso especial que merece mención, es la expresión de Fos en los diferentes niveles del área preóptica que se muestrearon, en los antecedentes se hizo referencia al papel que dicha estructura tiene en los mecanismos de generación del sueño y su participación como estructura hipnógena. Sin embargo la expresión de Fos en los diferentes niveles que se muestrearon no presento diferencias significativas en ninguna de las condiciones experimentales, lo cual sugiere que dicha estructura tiene un papel mas importante en el mantenimiento de la fase de sueño lento, lo cual se apoya con los trabajos de Kaitin (1984), que reportaron un decremento de la frecuencia de disparo de las neuronas del área preóptica durante el sueño MOR y un incremento de forma espontanea de la actividad de este grupo de neuronas durante el sueño lento. Los estudios de Szymusiak y colaboradores (1985, 1986, 1989) y Sterman y Shouse, (1985) de lesiones en área preóptica y los estudios electrofisiológicos, fundamentan el papel que dicha estructura tiene en los mecanismos del sueño. Por lo tanto esto abre nuevas posibilidades de investigación en un futuro sobre el papel a nivel celular de esta estructura en los mecanismos ya sea de generación o mantenimiento del sueño y en particular sobre la fase de sueño MOR.

Por lo que se refiere a la expresión de Fos en el resto de los núcleos mostrados (Ver tabla 1) encontramos que estructuras como la sustancia Innominata y la banda diagonal de Broca no presentan actividad de Fos de forma considerable, aunque la lesión de dichas estructuras, al igual que el área preóptica, tienen como resultado un incremento en la fase de vigilia (Szymusiak y col, 1985, 1986). Por lo tanto se sugiere que posiblemente estas estructuras mantuvieran una relación directa con el área preóptica y que se encarguen en conjunto de la regulación de los grupos neuronales del tallo cerebral para la generación del sueño, así como del mantenimiento de la vigilia. Se ha postulado que el sistema reticular activador ascendente del tallo cerebral, libera un inhibidor, no especificado aún, hacia las estructuras diencefálicas, inhibiendo los grupos neuronales encargados de la generación del sueño, así como también pero de forma indirecta, de el sistema de activación para la generación del SMOR por el tallo cerebral, formando un mecanismo de retroalimentación. Por lo tanto cabe considerar que los bajos niveles de expresión de Fos en estas tres estructuras se deba a que no hay una relación directa y específica con el mantenimiento del SMOR y a que tienen una relación más directa con los mecanismos de aparición y mantenimiento del sueño lento. Lo cual explicaría que la inmunoreactividad a Fos, sea producto de la participación de estas áreas en esta fase del sueño, por lo cual su actividad neuronal se ve disminuida durante el SMOR, aunque no desaparece. Para probar tal hipótesis sería necesario montar otro diseño experimental, analizando las fases del sueño lento y vigilia por separado, esto permitiría dilucidar si realmente dichas estructuras tienen un papel importante en los mecanismos de mantenimiento de algunas de las fases del sueño.

Para tal efecto es necesario realizar múltiples experimentos, que no solo implican en mapeo de la actividad cerebral, esto es solo una herramienta más que permite disectar desde otro punto de vista la complejidad del sueño y en particular la del sueño MOR.

CONCLUSIONES

- **La estimulación auditiva y la privación de sueño son manipulaciones que incrementan la fase de sueño MOR, así como los niveles de excitabilidad neuronal en varias regiones del diencefalo.**

- **El sueño es un fenómeno multifactorial donde intervienen un gran número de estructuras cerebrales y donde los niveles de excitabilidad neuronal son indispensables para el mantenimiento de este fenómeno.**

BIBLIOGRAFIA

- 1-Amicci, R., Fadiga, L., Pérez, E., Zamboni, G. y Parmeggiani, P.L. Relation between cAMP concentration in anterior hypothalamic-preoptic region and the ultradian wake-sleep cycle. J. Aut. Neur. Sys. 30: 5-9, 1990.
- 2-Arankowsky-Sandoval, G., García-Hernández, F., Aguilar-Roblero, R., y Drucker-Colín, R. REM sleep enhancement induced by sensory stimulation is evoked Kainic and lesion of the pontine reticular formation. Brain Res. 494: 396-400, 1989.
- 3-Arankowsky-Sandoval, G., Prospéro-García, O. Aguilar-Roblero, R. y Drucker-Colín, R. Cholinergic reduction of REM sleep duration is reverted by auditory stimulation. Brain Res. 375: 377-380, 1986.
- 4-Asala, S.A., Okano, Y., Honda, K., y Shojiro, I. Effects of medial preoptic area lesions on sleep and wakefulness in unrestrained rats. Brain Res. 587: 234-238, 1992.
- 5-Aserinsky, E. y Kleitman, N. A motility cycle in the sleeping infants as manifested by ocular and gross bodily activity. J. Appl. Physiol. 8: 11-18, 1953.
- 6-Baghdoyan, H., Lydic, C., Callaway, C., y Hobson, A. The Carbacol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose-dependent and antagonized by centrally administered atropine. Neuropsychopharmacol. 2: 67-79, 1989.
- 7-Baghdoyan, H. Rodrigo-Angulo, M., McCarley, R., y Hobson, A. Site specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. Brain Res. 306: 39-52, 1984.

8-Benedek,G., Obál,F., Jr., Szekeres,L. y Obál,F. Cortical synchronization induced by thermal stimulation of the preoptic area in immobilized rats. Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung. 48(1): 65-71, 1976.

9-Borbély, A. y Tobler, I. Homeostatic and circadian principles in sleep regulation in the rat. En: D. McGinty, R. Drucker-Colín, A. Morrison and P. Permegliani (Eds.), Brain Mechanisms of sleep. Raven Press, New York, 1985. pp. 35-44.

10-Borbély, A. Acherman, P., Trachsel, L., y Tobler I. Sleep initiation and sleep intensity: interaction of homeostatic and circadian mechanisms. J. Biol. Rhythms. 4: 149-160, 1989.

11-Boyer, R., Finkenstein, J. Rotfwang, H. Kapen, S. Wietzman, E. y Hellman, L. LH release during puberty. N.Engl.J.Med. 286: 582-586, 1972.

12-Bremer, F. Cerveau isole et physiologie du sommeil. C.R. Soc. Biol. 118: 1235-1241, 1935

13-Brennan, P., Hancock, D., y Keverne E. The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice. Neurosci. 49(2): 277-284, 1992.

14-Brooks, D. y Bizzi, E. Brain stem electrical activity during deep sleep. Arch. Ital. Biol. 101: 648-665, 1963.

15-Callaway, W. Lydic, R. Baghdoyan, H. y Hobson, A. Pontogeniculo-occipital Waves: Spontaneous Visual System Activity During Rapid Eye Movement Sleep. Cell. Mol. Neurobiol 2: 105-138, 1987.

16.-Calvo, J., y Fernandez-Guardiola, A. Phasic activity of the basolateral amygdala, cingulate gyrus and hippocampus during REM sleep in the cat. Sleep, 7: 202-210, 1984.

17-Cambepfl, S.S. y Tobler, I. Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. Neurosci. Biobehav. Rev. 8: 269-300, 1984.

18-Card, J., Brecha, N., Karten, H. y Moore, R. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. J. Neuroscience, 11: 1289-1330, 1982.

19-Ceccatelli, S., Villar, M., Goldstein, M. y Hökfelt, T. Expression c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 9569-9573, 1989.

20-Chase, H., Enomoto, S., Nurakami, T., Nakamura, T. y Talre, M. Intracellular potential of medullary reticular neurons during sleep and wakefulness. Exp. Neurol. 71: 226-233, 1981

21-Chastrette, N. y Cespuglio, R. Influence of pro-melanocortin derived peptides on the sleep-waking-cycle of the rat. Neurosc. Lett. 62: 365-370, 1985.

22-Clark, W. y Clark, Y. Changes in body temperature after administration of adrenergic and serotonergic agents and related drugs including antidepressants. Neurosci. Biobehav. Rev. 4: 281-375, 1980.

23-Coenen, A., y Van Luijckelaar, E. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. Physiol. Behav. 35: 501-504, 1985.

24-Cohen, H., y Dement, W. Sleep changes in threshold to electroconvulsive shocks in rats after deprivation of paradoxical phase. Brain Res. 22: 421-422, 1970.

25-Curran, T. The fos oncogene. En: E. Reddy, A. Salkaika y T. Curran (Eds). The Oncogene Handbook. Elsevier, New York, 1988. pp. 307-325.

26-Dangour, J. Intracerebroventricular infusion of somatostatin selectively increases paradoxical sleep in the rats. Brain Res. 367: 26-30, 1986.

27-Datta, S., Moham, K., Chhina, G. y Singh, B. Tonic activity of medial preoptic norepinephrine mechanism for body temperature maintenance in sleeping and awake rats. Brain Res. Bull. 15: 447-451, 1985.

28-Datta, S., Mohan-Kumar, V., Chhina, S. y Singh, B. Interrelationship of thermal and sleep-wakefulness changes elicited from the medial preoptic Area in rats. Exp. Neurol. 100: 40-50, 1988.

29-Dement, W. The biological role of REM sleep. En: A Kales (Eds), Sleep Physiology and Pathology. Lippincott, Philadelphia, 1969. pp. 245-265.

30-Denoyer, M., Sallanon, M., Buda, C., Delhomme, G., Dittmar, A. y Jouvet, M. The posterior hypothalamus is responsible for the increase of brain temperature during paradoxical sleep. Exp. Brain Res. 84: 326-334, 1991a.

31-Denoyer, M., Sallon, M., Buda, C., Kitahama, K., y Jouvet, M. Neurotoxic lesion of the mesencephalic reticular formation and/or the posterior hypothalamus does not alter waking in the cat. Brain Res. 539: 287-303, 1991b.

32-Doneshka, P. Electrophysiological studies into the changes of the phases of sleep after vibration and noise. Bull. Int. Physiol. 6: 83-88, 1974.

33-Dragunow, M. y Faull, R. MK-801 induces c-fos protein in thalamic and neocortical neurons of rat brain. Neurosci Lett. 111: 39-45, 1990.

34-Dragunow, M. y Robertson, H. Localization and induction of c-fos protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons. Brain Res. 440: 252-260, 1988.

35-Dragunow, M. y Faull, R. The use of c-fos as a marker in neuronal pathway tracing. J. Neurosci. Meth. 29: 261-265, 1989.

36-Drucker-Colín, R. y Gutiérrez, M. del C. Effects of forebrain lesion on release of proteins from the midbrain reticular formation during the sleep-wake cycle. Exp. Neurol. 52: 39-344, 1976.

37-Drucker-Colín, R., Bernal-Pedraza, J., Fernández-Cacino, F. y Morrison A..R. Increasing PGO spike density by auditory stimulation increases the duration and decreases the latency of rapid eye movement (REM) sleep. Brain Res. 278: 308-312, 1983a.

38-Drucker-Colín, R. y Bernal-Pedraza, J. Kainic acid lesions of gigantocellular tegmental field (FTG) neurons do not abolish REM sleep. Brain Res. 272: 387-391, 1983b.

39-Drucker-Colín, R., Arankowsky-Sandoval, G., Prospero-García, O., Jiménez-Angulano, A. and Merchant, N. H. The regulation of sleep: some considerations on the role of vasoactive intestinal peptide, acetylcholine and sensory modalities, En: M. Mancía and Marine (Eds), The Diencephalon and Sleep. Raven Press. New York, 1990, pp. 313-330.

40-Drucker-Colín, R. Neuroproteins, brain excitability and REM sleep. En: *Sleep, Dreams and Memory* (Ed.) Spectrum Publications, pp. 73-94, 1981.

41-Dreyfus-Brisac, C. Sleep ontogenesis in early human prematurity from 24-27 weeks of conceptional age. *Develop Psychobiol.* 1: 162-169, 1968.

42-Ei Mansari, M., Sakai, K., y Jouvet, M. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp. Brain Res.* 76: 519-529, 1989.

43-Feldberg, W. y Myers, R. Effects on temperature of amines injected into the cerebral ventricles. A new concept of temperature regulation. *J. Physiol.* 173: 226-237, 1964

44-Folkard, S., Minors, S. y Waterhouse, J. The Desynchronisation of rhythms and its implications for internal clocks. En: Redfern P. (Ed). *Circadian Rhythms in the central nervous System*. WCH Publishers, U.S.A. pp.147-161, 1985.

45-Findlay, A. y Hayward, J. Spontaneous activity of single neurones in the hypothalamus of rabbits during sleep and waking. *J. Physiol.* 201: 237, 1969.

46-Gassel, M., Ghelarducci, B. Marchisfava, P. y Pompelano, O. Phasic changes in blood pressure and heart rate during the rapid eye movement episodes of desynchronized sleep in unrestrained cats. *Arch. Ital. Biol.* 102: 530-544, 1964.

47-Greenberg, M.E., Ziff, E.B. y Greene, L.A. Stimulation of neural acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science.* 328: 632-634, 1987.

48-Guldner, F. Structure and neuronal connections of the supraquiasmatic nucleus. En: Redfern P. (Ed). Circadian Rhythms in the Central Nervous System. WCH Publishers, U.S.A. pp. 29-41, 1985.

49-Guldner, F. Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. Cells Tiss. Res. 165, 509-544. 1976

50-Guldner, F. y Wolff, J. Dendro-dendritic synapses in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamus. J. Neurocytology, 3: 245-250. 1974.

51-Hayward, J. y Baker, M. A comparative study of the role of the cerebral arterial blood in the regulation of brain temperature in five mammals. Brain Res., 16: 417-440, 1969.

52-Hayward, M., Duman, R y Nestler, E. Induction of the c-fos proto-oncogen during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. Brain Res. 525: 256-266, 1990.

53-Hernández-Peón y Chavez-Ibarra, G. Sleep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain. EEG. Clin. Neurophysiol. 24: 188-198, 1963.

54-Herschman, R. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. Annu. Rev. Biochem. 60: 281-319, 1991.

55-Hobson, J. McCarley, R. , Pivik, T. y Freedman, R. Selective firing by car pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. J. Neurophysiol. 37: 497-511, 1974.

56-Hobson, A. Lydic, R. y Baghdoyan, H. Evolving concepts of sleep cycle generation: From brain centers to neuronal populations. Behav. Brain. Sci. 9: 371-448, 1986

57-Hobson, A.,McCarley, R. and Wyzinski, W. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. Science, 189: 55-58, 1975.

58-Hosoya, Y. Suglura, Y, Zhang, F. Ito, R. and Kohno, K. Direct projection from the dorsal hypothalamic area to the nucleus raphe pallidus: a study using anterograde transport with phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. Exp. Brain Res. 75: 40-46, 1989.

59-Huttenlocher, P. Effects of state of arousal on click responses in the mesencephalic reticular formation. EEG. Clin. Neurophysiol. 12: 818-827, 1960.

60-Kucera, P. and Favrod, P. Suprachiasmatic nucleus projection to mesencephalic central grey in the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*). Neurosci. 4: 1705-1715. 1979.

61-Ito,K. and McCarley,R.W. Alterations in membrane potential and excitability of cat medial pontine reticular formation neurons during changes in naturally occurring sleep-wake states. Brain Res. 292: 169-175, 1984.

62-Jímenez-Angulano,A.,Báez-Saldaña, A. Drucker-Colín, R. Cerebrospinal fluid (CSF) extracted immediately after REM sleep deprivation prevents REM rebound and contains vasoactive intestinal peptide (VIP). Brain Res. 631: 345-348, 1993.

63-Jones,B.Paradoxical sleep and its chemical structural substrates in the brain. Neuroscience 40: 637-656, 1991.

64-Jones,B.Basic Mechanisms of sleep-wake states. En: J. Krueger, T. Roth and E.Dement (Eds). Principles of Sleep Medicine. Saunders Ed. New York, 1989. pp. 121-138.

65-Jones, B. y Yang, T. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. J. Comp. Neurol. 242: 56-62, 1985.

66-Jouvet, M. Etude de la dualité des états de sommeil et des mécanismes de la phase paradoxale. En: M. Jouvet (Ed), Aspects anatomofonctionnelles de la physiologie du sommeil. Centre National de la Recherche. Paris, 1965, pp. 397-449.

67-Jouvet, M. Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables de les différents phases du sommeil physiologique. Arch. Ital. Biol. 100: 125-206, 1962.

68-Jouvet, M. y Michael, F. Correlations électromyographiques du sommeil chez le chat décorrique et mésencéphalique chronique. R. Soc. Biol. 153: 1024-1028, 1959.

69-Jouvet, M. y Moruzzi, G. Neurophysiology and neurochemistry of sleep and wakefulness. Springer-Verlag, New York. 1972 p. 534.

70-Jouvet, M. The regulation of paradoxical sleep by the hypothalamo-hypophysis. Arch. Ital. Biol. 126: 259-274, 1988.

71-Kales, A. Wilson, T. y Jacobson, A. Measurements of all night sleep in normal elderly persons: effects of aging. J. Am. Gerat. Soc. 15: 405-414, 1976.

72-Kalitin, K. Preoptic Area unit Activity during sleep and wakefulness in the cat. Exp. Neurol. 83: 347-357, 1984.

73-Kawamura, H. y Sawyer, C. Elevation in brain temperature during paradoxical sleep. Science. 150: 912, 1964.

74-Kievit, J. y Kuypers, H. Basal forebrain and hypothalamic connections to frontal and parietal cortex in Rhesus monkey. Science. 187: 660-662, 1975.

75-Kovalzon, V. y Tsibulsky, V. REM sleep deprivation, stress and emotional behavior in rats. Behavior. Brain Res. 14: 235-245.

76-Lai, Y. y Siegel, J. Cardiovascular and muscle tone changes produced by microinjection of cholinergic and glutamatergic agonists in dorsolateral pons and medulla. Brain Res. 514: 27-36, 1988.

77-Li, H. y Satinoff, E. Effects of p-Chlorophenylalanine on the thermoregulation and sleep in rats. Brain Res. 569: 46-56, 1992.

78-Lindsley, D. Schreiner, L. , Knowles, W. y Magoun, H. Behavioral and EEG changes following chronic brainstem lesions in the cat. EEG. Clin. Neurophysiol. 2: 483-487, 1950

79-Lin, J., Sakai, K. y Jouvet, M. Evidence for Histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. Neuropharmacol. 27(2): 111-122, 1987.

80-Lin, J., Sakai, K., Vanni-Mercier, G. y Jouvet, M. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. Brain Res. 479: 225-240, 1989.

81-Mallick, B., Siegel, J. y Fahringer, H. Changes in pontine unit activity with REM sleep deprivation. Brain Res. 515: 94-98, 1989.

82-Mallick, B. y Thakkar, M. Short-term REM sleep deprivation increases acetylcholinesterase activity in the medulla of rats. Neurosci. Lett. 130: 221-224, 1991.

83-Magnes, J. Moruzzi, G. y Pompelano, C. Synchronization of the EEG produced by low-frequency electrical stimulation of the region of solitary tract. Arch. Ital. Biol. 99: 33-67, 1961.

84-McGinthy, D.J. y Drucker-Colín, R. Sleep mechanisms: Biology and control of REM sleep. Inter. Rev. Neurobiol. 23: 391-436, 1982.

85-McGinthy, D.J. y Serman, M. Sleep suppression after basal forebrain lesion in the cat. Science, 160: 1253-1255, 1968.

86-Mead, S., Francis, J.P., Maywood, E.S., Humby, T., Herbert, J. y Hastings M.H. A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the supraquiasmatic nuclei. J. Neurosci. 12(7): 2516-2522, 1992.

87-Merchant-Nancy H., Vázquez, J., Agullar-Robledo R., y Drucker-Colín R. c-fos proto-oncogene changes in relation to REM sleep duration. Brain Res. 579: 342-346, 1992.

88-Monti, J. Effect of recurrent stimulation of the brain stem reticular formation on REM sleep in cats. Exp. Neurol. 28: 484-493, 1970.

89-Moore, R. The supraquiasmatic nucleus and the mammalian circadian. En: Advances in the Biosciences Vol 73 (Ed. J.M.Hekkens), Pergamon Press, Great Britain, pp. 97-105, 1988.

90-Morgan, J., Cohen, D.R., Hempstead, J.L. y Curran, T. Mapping patterns of c-fos expression in the Central Nervous System after seizure. Science. 237: 192-197, 1987.

- 91-Moruzzi, G. y Magoun, H. Brainstem sticular formation and activation of the EEG. EEG. Clin. Neurophysiol. 1: 455-473, 1949.
- 92-Nauta, W. Hypothalamic regulation of sleep in rats and experimental study . J. Neurophysiol. 9: 285-316, 1946.
- 93-Noo, A. y Nath, B. Differential acute influence of medial and lateral preoptic areas on sleep-wakefulness in freely moving rats. Brain Res. 525: 242-248, 1990.
- 94-Ogawa, Y. y Kawamura, H. Increase of multiple unit activity during slow wave sleep in the cat preoptic area. Brain Res. Bull. 20: 807-902, 1988.
- 95-Parmeggiani, P. Homeostatic regulation during sleep: facts and hypotheses. En: D. McGinty, R. Drucker-Colín, A. Morrison y P. Parmeggiani (Eds.), Brain Mechanisms of Sleep. Raven press, New York, 1985, pp. 385-397.
- 96-Parmeggiani, P., Cevalani, D., Azzaroni, A. y Ferrari, G. Thermosensitivity of anterior hypothalamic-preoptic neurons during the waking-sleep cycle: A study in brain functional states. Brain Res. 415: 79-89, 1987.
- 97-Parmeggiani, P., Zamboni, G., Pérez, E. y Lenzi, P. Hypothalamic temperature during desynchronization sleep. Exp. Brain Res. 54: 315-320, 1984.
- 98-Paxinos, G. y Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. New York, 1985.
- 99-Perez, E. Zamboni, G. Amici, R. Fadiga, L. y Parmeggiani, P. Ultradian and circadian changes in the AMPc concentration in the preoptic region of the cat. Brain Res. 551: 132-135, 1991.

- 100-Pierón, H. Le probleme physiologique du sommeil. Paris, Asson, 1913
- 101-Phillipson, E., Kozar, L. Rebeck, A. y Murphy, F. Respiratory control and sleep. Am. Rev. Respir. Dis. 115: 217-224, 1977.
- 102-Pompeiano, M., Cirelli, C. y Tononi, G. Effects of sleep deprivation of Fos-Like immunoreactivity in the rat brain. Arch. Ital. Biol. 130: 325-335, 1992.
- 103-Pompeiano, O. y Jouvet, J. EEG and behavioral manifestations of sleep produced by cutaneous nerve stimulation in normal cats. Arch. Ital. Biol. 100: 343-380, 1962.
- 104-Prospéro-García, O., Morales, M., Arankowsky-Sandoval, G. y Drucker-Colín, 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.
- 105-Rampin, C., Cespuglio, R., Chastrette, N. y Jouvet, M. Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. Neurosci. Lett. 126: 113-118, 1991.
- 106-Ranson, S. Somnolence caused by hypothalamus lesion in the monkey. Arch. Neurol. Psychiat. 41: 1-23, 1939.
- 107-Rojas-Ramírez, J.A., Aguilar Jiménez, E., Posadas-Andrews, A., Bernal-Pedraza, J.G. y Drucker-Colín, R. The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep-wake cycle of rats. Psychopharmacol. 53: 147-150, 1977.
- 108-Roitback, A. Electrical phenomena in the cerebral cortex during the extinction of orientation and conditional reflexes. EEG. Clín. Neurophysiol. 13: 91-100, 1960.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

109-Saito, H. Sakai, K, y Jouvét, M. Discharge patterns of the nucleus parabrachialis lateralis neurons of the cat during sleep and waking. Brain Res. 134: 59-72, 1977.

110-Sagar, S. Sharp, F. y Curran, T. Expression of c-fos protein in brain metabolic mapping the cellular level. Science. 240: 1328-1331, 1988.

111-Satlinoff, E., Drucker-Colín, R. y Hernández-Peón, R. Paleocortical excitability and sensory filtering during REM sleep deprivation. Physiol. Behav. 7: 103-106, 1971.

112-Saper, C. Loewy, A. Swanson, L. y Cowan, W. Direct hypothalamo-autonomic connections. Brain Res. 117: 305-312, 1976.

113-Sassin, J., Frantz, A., Wietzman, E. y Kapen, S. The secretion of prolactin in sleep. Science. 177: 1205-1207, 1972.

114-Sakai, K. Central mechanisms of paradoxical sleep. Brain Develop. 8: 401-407, 1986.

115-Sakai, K. Sastre, P. Salvat, M. Touret, M. Tohyama, M. y Jouvét, M. Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study. Brain Res. 176: 233-254, 1979.

116-Sakai, K. El Mansari, J. Lin, J. Zhang, G. y Vanni-Mercier, G. The posterior hypothalamus in the regulation of wakefulness and paradoxical sleep, En: M. Mancía and G. Marine (Eds). The Diencephalon and Sleep. Raven Press, New York, 1990. pp. 171-198.

117-Sakai, K., y Jouvét, M. Brain stem PGO on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. Brain Res. 194: 500-505, 1980.

- 118-Sakai, K. Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. En: D. McGinty, R. Drucker-Colín, A. Morrison and L. Parmeggiani (Eds.), *Brain Mechanism of Sleep*. Raven Press, New York. 1985. pp 111-137.
- 119-Salín-Pascual, R. Granados-Fuentes, D. De la Fuente, J. y Drucker-Colín, R. Effects of auditory stimulation during REM sleep in healthy volunteers and depressed patients. Psychiatry Res. 38: 237-246, 1991.
- 120-Sallanon, M., Kitahawa, K., Buda, C., Puymartin, M., Luppi, P.H. y Jouvet, M. Effect of electrolytic lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and its related areas on the sleep-wake cycle in the cat. Arch. Ital. Biol. 125: 305-315, 1986.
- 121-Sallanon, M., Sakai, K., Buda, C., Puymartin, M. y Jouvet, M. Increase of paradoxical sleep induced by microinjections of ibotenic acid into the ventrolateral part of the posterior hypothalamus in the cat. Arch. Ital. Biol. 126: 87-97. 1987.
- 122-Sheng, M. y Greenberg, M. The regulation and function of c-Fos and other immediate early genes in the nervous system. Neuron. 4: 477-485, 1990.
- 123-Shiromani, P., Kilduff, T., Bloom, F. y McCarley, R. Cholinergic induced REM sleep triggers fos-like immunoreactivity in dorsolateral pontine regions associated with REM sleep. Brain Res. 580: 351-357, 1992.
- 124-Shutte, C. y Lewis, P. The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. Brain. 90: 497-520, 1967
- 125-Siegel, J. y Gordon, T. Paradoxical sleep deprivation in cat. Science. 148: 978-980, 1965.

126-Smith, C. Sleep states and learning: a review of animal literature. Neurosci. Biobehav. Rev. 9: 157-168, 1985.

127-Starzl, T., Taylor, C. y Magoun, H. Ascending conduction in reticular activating system with special reference to the diencephalon. J. Neurophysiol. 14: 461-468, 1951.

128-Sterlade, M. Mechanisms underlying cortical activation: neuronal organization and properties of the midbrain reticular core and intralaminar thalamic nuclei. En: O. Pompeiano and A. Ajmone-Marsan (Eds.), Brain Mechanisms and perceptual awareness. Raven Press, New York, 1981. pp. 327-377.

129-Sterlade, M. Basic Mechanisms of sleep generation. Neurology. 42 (suppl 6): 9-18, 1992.

130-Sterman, M. y Ciomenna, C. Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induce by basal forebrain stimulation in the behaving cat. Exp. Neurol. 6: 103-109, 1962.

131-Sterman, M. and Shouse, M. Sleep "center" in the brain: the preoptic basal forebrain area revisited. En: D. McGinty, R. Drucker, A. Morrison and P. Parmeggiani (Eds.). Brain Mechanisms of Sleep. Raven press, New York, pp. 277-298, 1985.

132-Sudol, M. Seth, G. Grant, N. y Mainsopierre, C. Proto-oncogenes and signaling processes in neural tissues. Neurochem. Int. 44: 369-384, 1993.

134-Szymusiak, R. y McGinty, D. Sleep suppression following kainic acid-induced lesion of the basal forebrain. Exp. Neurol. 94:98-614, 1986.

135-Szymuslak, R. y McGinty, D. Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. Brain Res. 370: 82-92, 1986.

136-Szymuslak, R. y McGinty, D. Sleep-waking discharge of basal forebrain protection neurons in cats. Brain Res. Bull. 22: 423-430, 1989.

137-Szymuslak, R. y Satlinoff, E. Thermal influences on basal forebrain hypnogenic mechanisms. En: D. MacGinty, R. Drucker-Colín, A. Morrison and P. Parmeggiani (Eds.). Brain Mechanisms of Sleep. Raven press, New York, pp. 301-319, 1985.

138-Szymuslak, R., Iriye, T., y McGinty, D. Sleep-Waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamic area of cats. Brain Res. Bull. 23: 11-1209, 1989.

139-Tachibana, S. Relation between hypothalamic heat production and intra and extracranial circulatory factors. Brain Res. 16: 405-416. 1969.

140-Tekeuchi, E. Polygraphic study of the wakefulness-sleep cycle of the rat. Jap. J. Psychol. 20: 19-26, 1970.

141-Tobler, I. Evolution of the sleep process: Aphylogenetic approach. En: A. Borbély and J. Valatx (Eds.), Sleep Mechanisms. Exp. Brain Res Suppl. Springer, Munchen , 1984. pp. 207-226.

142-Tribollet, E. y Dreyfus, J. Localization of neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus area of the rat: a horseradish peroxidase study. Neuroscience. 6: 1315-1328, 1981.

143-Van Hulzen , H. y Coenen, M. The pendulum technique for paradoxical sleep deprivation in rats. Physiol. Behav. 25: 807_811, 1980.

144-Vani-Mercier, G. Sakai, K. and Jouvet, M. Waking-state specific neurons in the caudal hypothalamus of the cat. C.R. Acad. Sci. 298: 195-220, 1984.

145-Vertes, R. Brainstem control of the events of REM sleep. Prog. Neurobiol. 22: 241-288, 1984.

146-Vertes, R. Brainstem generation of the hippocampal EEG. Prog. Neurobiol. 19: 159-186, 1982.

147-Vilablancas, J. Marcus, R. and Olmstead, C. Effects of caudate nuclei or frontal cortex ablations in cats. Exp. Neurol. 53: 31-37, 1978.

148-Von Economo, C. Sleep as a problem of localization. J. Nerv. Ment. Dis. 7: 249-259, 1930.

149-Vogel, G. A review of REM sleep deprivation. Arch. Gen. Psychiat. 32: 740-781, 1975.

150-Witzman E. Circic release of cortisol and 5TH. Ann. Rev. Med. 27: 225, 1976.

151-Winters, W., Mori, K., Spooner, C., and Kado, R. Correlation of reticular and cochlear multiple unit activity with auditory evoked responses during wakefulness and sleep. EEG. Clin. Neurophysiol. 23: 539-545, 1967.

152-Yamuy, A. Morales, F. Hobeon, J. Expression proto-oncogen c-fos induce carbachol in relation the REM sleep. Progr. Neuroscience. 224: 234-245, 1983.