

03081
6
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

PROYECTO DE POSTGRADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA

AREA NEUROCIENCIAS

DISTRIBUCION DE RECEPTORES DEL POLIPEPTIDO
VASOACTIVO INTESTINAL (VIP) EN EL DIENCEFALO
Y TALLO CEREBRAL DE RATAS PRIVADAS DE SUEÑO
MOR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**DOCTORA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**
PRESENTA LA
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. RENE DRUCKER COLIN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1996

**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.

"La vida es sueño"

"Sueña el rey que es rey, y vive
con este engaño mandando,
disponiendo y gobernando,
y este aplauso que recibe
prestado en el viento escriba;
y en cenizas le convierte
la muerte ¡desdicha fuerte!
¡Que hay quien intente reinar
viendo que hay que despertar
en el sueño de la muerte!
Sueña el rico en su riqueza
que mas cuidados le ofrece
sueña el pobre que padece
su miseria y su pobreza
sueña el que a medrar empieza
sueña el que afana y pretende
sueña el que agravia y ofende
y en el mundo en conclusión,
todos sueñan lo que son
aunque ninguno lo entiende.
Yo sueño que estoy aquí
de estas cadenas cargado,
y soñé que en otro estado
mas lisonjero me vi
¿Qué es la vida? Un frenesí
¿Qué es la vida? Una ilusión,
una sombra, una ficción,
y el mayor bien es pequeño
¡ Que toda la vida es sueño,
y los sueños, sueños son !

- Pedro Calderón de la Barca.

La presente tesis se realizó en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con apoyo de beca de Doctorado otorgada por el CONACyt y de PADEP con clave de proyecto: 030371.

DEDICO ESTA TESIS A:

ALEJANDRO.

Por ser parte de mi.

Por el amor, el apoyo y la confianza que me brinda diariamente.

Por que con él, gran parte de las cosas son posibles.

Por lo buenos momentos que hemos vivido y que espero nunca terminen.

KAREN

Por compartir conmigo su infancia, sus horas interminables de juegos y risas. Por hacerme participe de algunas cosas elementales, que con el tiempo había olvidado, como la luz del día y el olor de todo: barro, tierra, humedad y flores.

Pero sobre todo por aprender con ella, una nueva faceta de mi vida.

A MIS PADRES Y HERMANOS

Por su continuo cariño y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. René Drucker Colín.

Por ser un gran investigador y maestro, con una visión poco convencional de la realidad y la ciencia. Por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, pero sobre todo por participar de manera fundamental en el inicio y término de una parte de mi formación académica.

GRACIAS.

Al comité tutorial formado por el Dr. René Drucker Colín, Dr. León Cintra McGlone, Dr. Raúl Aguilar Roblero, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Adolfo García Sainz, Dr. Carlos Valverde Rodríguez y Dr. Oscar Próspero García, por sus comentarios y aportes al trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, que de una u otra forma participaron para la realización de este trabajo y con los cuales he compartido una gran cantidad de cosas. En especial, a Oscar, Fabio, Fernando, Marissa, Adalberto, Lety, Rubén, Lolita y Rafael. Asimismo, a José Luis, Jacky, Adriana, Marcela, Carlos, Leonardo, Mario, Carmen, Luis, Consuelo, Li y Marie.

Al Dr. Raúl Aguilar Roblero por el apoyo y la confianza brindada para el término de este trabajo. Asimismo a Daniel, Alberto, Jorge, Carlos, Arturo, Ricardo, José Luis, Paty, Ivette y Carolina, por los buenos momentos que hemos compartido.

A todos mis amigos fuera del laboratorio.

A todo el personal del Departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina y del Instituto de Fisiología Celular, por las facilidades otorgadas. En especial a Tere Torres, Martha Cerrilla, Lulú Navarro, Tere Martínez, Raúl Ramírez, Alicia Mondragón, Jesús Méndez y Félix Sosa. Asimismo, a Marú Araiza.

INDICE

1.RESUMEN.....	5
2.INTRODUCCION	7
2.1 ASPECTOS FENOMENOLOGICOS DEL SUEÑO.....	8
2.2 SUBSTRATOS NEUROANATOMICOS DEL SUEÑO.....	11
2.3 NEUROTRANSMISORES Y SUEÑO.....	15
2.3.1 SEROTONINA (5-HT).....	15
2.3.2 NORADRENALINA (NA).....	16
2.3.3 ACETILCOLINA (ACh).....	18
2.4 MODELO DE INTERACCION RECIPROCA.....	21
2.5 PRIVACION DE SUEÑO.....	22
2.6 ESTRES Y SUEÑO	24
2.7 REGULACION NEUROHUMORAL DEL SUEÑO.....	26
2.8 NEUROPEPTIDOS Y SUEÑO.....	30
2.8.1 VIP Y SUEÑO.....	31
2.9 EL POLIPEPTIDO VASOACTIVO INTESTINAL (VIP).....	35
2.9.1 ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS.....	35
2.9.2 DISTRIBUCION Y LOCALIZACION.....	35
2.9.3 ACCIONES BIOLÓGICAS.....	37
2.9.4 RECEPTORES.....	39
2.9.5 INTERACCION VIP/ACh.....	40
2.10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
3. ARTICULO ANEXO.....	44
4. DISCUSION.....	45
5. CONCLUSIONES.....	55
6. BIBLIOGRAFIA.....	56

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TEXTO:

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AcVIP	Anticuerpo anti VIP
AP	Area Preóptica
BDB	Banda Diagonal de Broca
CAT	Colina-Acetil-Transferasa
CAP	Cloranfenicol
CCK-8	Colecistocinina-octapéptido
CCON	Condiciones Control
CGL	Cuerpo Geniculado Lateral
CLIP	Péptido-semejante-a-Corticotropina (Corticotropin- Like Intermediate Lobe Peptide)
Cx	Corteza cerebral
DSIP	Péptido inductor de sueño delta (Delta Sleep Inducing Peptide)
E	Epinefrina
EEG	Electroencefalograma
EEGrafía	Electroencefalografía
EOG	Electro-oculograma
EMG	Electromiograma
FTG	Campo Tegmental Gigantocelular (Gigantocellular Tegmental Field)
FR	Formación Reticular
FRM	FR Mesencefálica
FRP	FR Pontina
GHRH	Factor Liberador de la Hormona del Crecimiento
GH	Hormona de Crecimiento
HA	Hipotálamo Anterior
HP	Hipotálamo Posterior
5-HT	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
5-HTP	5-Hidroxitriptofano
5-HIAA	Acido Indolacético
IP	Intraperitoneal
IVT	Intracerebroventricular
LC	Locus Coeruleus
LCP	LC Principal

LCA	LC α
LCS	LC Subcoeruleus
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LCRN	LCR Normal
LCR PS	LCR de animales privados de sueño
MOR	Movimientos Oculares Rápidos
MDP	Muramil Dipéptido
NE	Norepinefrina
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PHI	Péptido Histidina Isoleucina
PGO	Ondas Ponto-Genículo-Occipital
PCPA	Paraclorofenilalanina
PG	Plataforma grande
periLC	Perilocus Coeruleus
PSMOR	Privación de Sueño MOR
RIA	Radioinmunoensayo
RD	Rafe Dorsal
SMOR	Sueño MOR
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	SN Periférico
SRAA	Sistema Reticular Activador Ascendente
SPS	Sustancia Promotora de Sueño
SL	Sueño de Ondas Lentas
SP	Sueño Paradójico
TM	Tegmento Mesencefálico
TRH	Hormona Liberadora de Tirotrópina
VIP	Polipéptido Vasoactivo Intestinal (Vasoactive Intestinal Polypeptide)

1. RESUMEN

La privación de sueño MOR produce durante el período de recuperación, un rebote ó aumento en el tiempo total de sueño MOR en ratas, gatos y humanos. Asimismo, se ha observado que la administración de líquido cefalorraquídeo (LCR) de animales privados de sueño a animales normales e insomnes pretratados con paraclorofenilalanina o propranolol produce un incremento en esta fase de sueño. Por otra parte, se ha demostrado que el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) induce sueño MOR en animales normales e insomnes y el bloqueo de sus receptores produce una disminución del mismo. Adicionalmente, se ha observado que el VIP se acumula en el LCR de animales privados de sueño MOR (PSMOR), y que las propiedades inductoras de sueño del LCR disminuyen cuando este es incubado con anticuerpos anti-VIP. Estas evidencias indican que el VIP es una sustancia inductora y reguladora del sueño MOR en condiciones normales y en el rebote de sueño, posterior a la PSMOR. Recientemente, sin embargo, ha sido reportado que los niveles de este neuropéptido medidos por radioinmunoensayo (RIA) no cambian durante la PSMOR en diversas estructuras cerebrales. No obstante, tal incapacidad para detectar VIP por RIA en algunos núcleos posterior a la PSMOR, pudiera estar relacionada con el hecho de que a periodos cortos de exposición al VIP, ocurre una internalización del complejo péptido-receptor dentro de vesículas endosomales claras con una vida media de minutos. Si este fuera el caso, el RIA, no es una técnica apropiada para medir los niveles del VIP posterior a la PSMOR. Por lo que sería entonces necesario utilizar otros métodos que determinen de manera más eficiente cuando en el cerebro, la PSMOR produce cambios en la actividad relacionada con el VIP. Con base en estas evidencias, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Determinar la densidad de receptores a VIP después de la PSMOR por 24 y 72 hrs y 2) Establecer la participación del estrés producido por la PSMOR sobre la densidad de receptores a VIP. Para tal efecto, se realizaron 2 experimentos. En el experimento 1, se utilizaron 5 grupos de ratas (n=12), las cuales fueron estudiadas bajo las siguientes condiciones: control, privación de sueño MOR por 24 y 72 horas; y control de PSMOR por 24 y 72 horas. En el experimento 2, se utilizaron también 5 grupos de ratas (n=6), bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero con la variante de que antes de someter a los

animales a la PSMOR o bien a las situaciones control, fueron previamente habituados al método de privación por dos horas diarias. Después de los respectivos períodos de privación de sueño ó situaciones control, todos los animales fueron sacrificados y sus cerebros fueron rápidamente removidos y congelados a -70°C . Posteriormente, los cerebros fueron cortados y procesados para autorradiografía del VIP. Los resultados mostraron que la PSMOR produjo un incremento significativo en la densidad de receptores a VIP en diversos núcleos involucrados con la regulación del ciclo vigilia -sueño y dicho efecto fue disminuído de manera considerable al habitar a los animales al método de privación. Estos resultados sugieren que durante la vigilia prolongada se producen diversos cambios neuroquímicos, entre ellas el aumento en la densidad de receptores a VIP, los cuales posiblemente son en parte responsables de modular el rebote de sueño. Asimismo, consideramos que el estrés es una variable inherente a la PSMOR, que contribuye de manera importante a modular el rebote de sueño. Tal vez, el VIP participa en la homeostasis del sueño y en el rebote posterior a la privación de sueño MOR, a través de una interacción con neurotransmisores y segundos mensajeros los cuales inciden sobre diferentes grupos neuronales involucrados en la regulación del ciclo vigilia-sueño.

2. INTRODUCCION

El sueño en los mamíferos, implica un enorme espacio temporal pues la tercera parte de la vida se ocupa durmiendo. Por otro lado cada noche mientras dormimos experimentamos involuntariamente episodios de actividad mental, acompañados de percepciones sensoriales, que nos evocan vivencias personales con un tono emocional y con una sensación de realidad. ¿Por que necesitamos dormir? ¿Para que nos sirve el soñar?. Estas son interrogantes muy antiguas y según la época o la cultura, los sueños han sido considerados de diversas maneras.

Las ensoñaciones, han interesado a la humanidad desde épocas remotas, e incluso han sido utilizadas para varios fines. En la Biblia encontramos que José interpreta los sueños del Faraón y predice el auge y la desolación de Egipto. A finales, del siglo XVIII y principios del XIX, los sueños fueron interpretados por adivinos y charlatanes , para predecir la suerte y esta práctica, impulso la publicación de libros que contenían series de símbolos esotéricos que explicaban los significados de los sueños. También, en estos siglos, las ciencias médicas se ocuparon de la cuantificación de las variables vegetativas durante el dormir, pero los médicos consideraron a las ensoñaciones como fenómenos anormales, producto de un cerebro mal oxigenado. A través del tiempo, los sueños también han sido parte de diferentes géneros literarios, empleándose para resaltar episodios románticos, pasajes fantásticos, o bien para hacer analogías con aspiraciones inalcanzables. Posteriormente, Sigmund Freud se basó en el contenido de las ensoñaciones para elaborar su teoría acerca de los procesos del pensamiento, que propuso como útil en el tratamiento de enfermedades nerviosas.

En esta breve nota histórica, apreciamos que por muchos años solo se consideró el aspecto mental de las ensoñaciones sin que hubiera un interés sobre su relación con el estado funcional del cerebro. Esto está aunado, a la ausencia de una tecnología que permitiera explorar el funcionamiento cerebral.

El estudio científico de los sueños, el asociarlos con un estado fisiológico cerebral, es relativamente reciente. Aún quedan por determinar varios aspectos sobre su origen y funciones, pero el conocimiento sobre los fenómenos cerebrales que los acompañan, ha tenido un avance apreciable, sin embargo hoy en día el sueño continúa representando un enigma biológico.

2.1 ASPECTOS FENOMENOLOGICOS DEL SUEÑO

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

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

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

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

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

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

Los segundos, representan ondas con un complejo negativo seguido por uno positivo con una duración mayor de 5 seg.

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

d-) SUEÑO MOR: El EEG presenta actividad de bajo voltaje, parecido al de la vigilia, con la presencia de MOR y atonía muscular. El 90% de la ensoñaciones ocurren en esta fase (Retschaffen y Kales, 1968). Durante esta fase ocurren también cambios fisiológicos importantes, tales como un aumento del flujo sanguíneo en áreas visuales asociativas, disminución del mismo en la corteza frontal inferior y depresión ó estimulación del ritmo cardio-respiratorio. Dichos cambios fisiológicos pudleran estar asociados con las ensoñaciones (Madsen y col., 1991).

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

Por otra parte, en la investigación básica del sueño, el gato y la rata, han sido los animales más utilizados. Las señales registradas son las mismas que en el humano, pero adicionalmente se registran las ondas ponto-genículo-occipital (PGOs). Las fases del ciclo vigilia-sueño del gato se describen de la siguiente forma (FIG. 1): La vigilia cursa con una actividad cortical rápida (14-40 Hz) y de bajo voltaje, el EMG de los músculos posturales esta muy activado y el cuerpo geniculado lateral (CGL) exhibe potenciales que colnciden con los movimientos oculares, por lo que se denominan potenciales relacionados a movimientos oculares.

Conforme la actividad del EEG se hace mas lenta se instala el SOL con la aparición de los llamados husos de sueño, que presentan una frecuencia de 5-8 Hz y representan el SOL I.

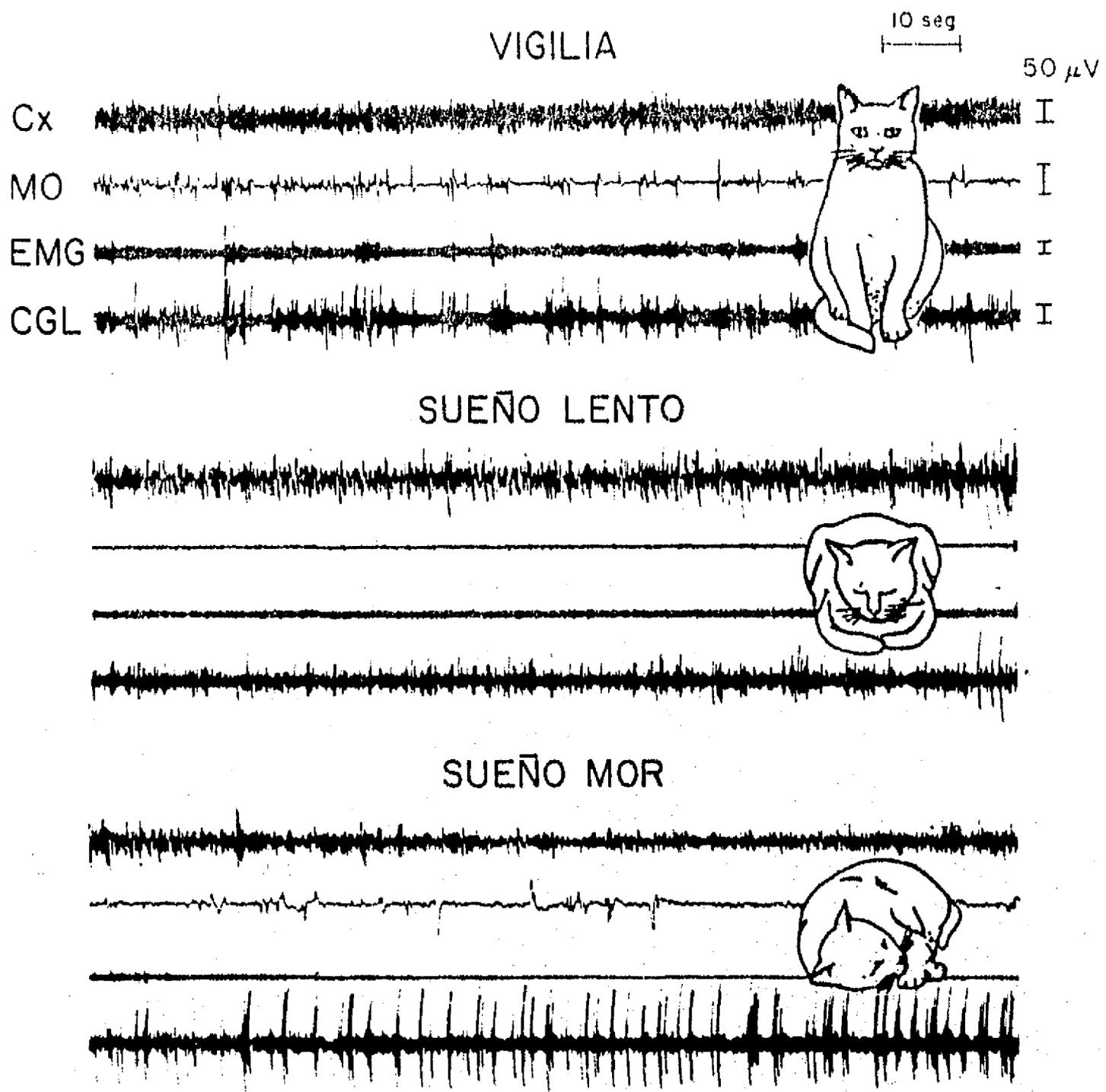


Fig 1. Registro poligráfico del ciclo vigilia-sueño del gato. Como puede observarse la actividad cortical (Cx) durante la vigilia es similar a la que se presenta en el sueño MOR. Obsérvese también la pérdida de tono muscular (EMG) y la presencia de las PGOs registradas en el CGL, característicos de esta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

Después al disminuir su frecuencia (1-3 Hz) y aumentar su amplitud, aparece el SOL II. Durante estos estados la actividad del tono muscular disminuye (Ursin y Sterman, 1981).

El sueño MOR se caracteriza por la presencia de fenómenos tónicos y fásicos. Los fenómenos tónicos corresponden a la desincronización cortical, el ritmo theta hipocampal y la atonía muscular, así como una reactividad disminuida frente a los estímulos externos e internos. Mientras que los fenómenos fásicos corresponden a: 1) las contracciones musculares rápidas, en extremidades, cuello, cara y músculos oculares. 2) las ondas ponto-genículo-occipital (PGOs). En estos animales el ciclo vigilia-sueño es polifásico, a lo largo de las 24 h del día están durmiendo y despertando. Además, la duración de cada ciclo es aproximadamente de 27 min, menor a la del hombre (Delorme y col., 1984).

Asimismo, se ha propuesto que el sueño está regulado por tres procesos: el homeostático, el circádico y el ultradiano. Estos procesos son independientes, pero operan en conjunto para determinar cuando y que cantidad de sueño debe presentarse, en condiciones normales. El proceso homeostático depende de las cuotas previas de sueño. La presión de sueño aumenta o disminuye de manera inversamente proporcional a la cantidad anterior, de tal forma que cuando un individuo se mantiene más tiempo en vigilia, más presión de sueño tiene y una vez que empieza a dormir esta presión de sueño disminuye. El proceso circádico es independiente de la ocurrencia de sueño, aumentando la presión de sueño cada 24 h, sin que la información del medio modifique su aparición. Por último, el proceso ultradiano regula la forma en que se alternan el SOL y el sueño MOR durante el día, induciendo que la distribución de las fases de sueño no sea homogénea a lo largo de las 24 h. La aparición del SOL o sueño MOR ocurre cuando la presión de sueño de los procesos homeostático, circadiano y ultradiano llega al máximo (Borbély y Tobler, 1985). En este contexto, se ha demostrado que lesiones bilaterales del núcleo supraquiasmático (NSQ) (estructura que regula los ritmos circádicos) abolen la periodicidad del sueño, pero no modifican la cuota diaria de este fenómeno, indicando que los procesos circádicos y homeostáticos son independientes entre sí (Borbély y col., 1989).

En resumen, con base en estos parámetros la descripción fenomenológica del sueño ha permitido proponer diferentes teorías para tratar de explicar los mecanismos que subyacen el

sueño. En la siguiente sección revisaremos brevemente la participación de los substratos cerebrales en la modulación del sueño.

2.2 SUBSTRATOS NEUROANATOMICOS DEL SUEÑO.

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

Los estudios iniciales, fueron publicados por Von Economo en 1930, en pacientes que morían a causa de la epidemia de encefalitis letárgica que ocurrió en Europa alrededor de 1918. El observó que aquellos sujetos en quienes la enfermedad cursaba con insomnio marcado, presentaban lesiones en el hipotálamo anterior (HA), mientras que los que mostraban hipersomnía, tenían lesiones en el hipotálamo posterior (HP). Poco después, Ranson en 1931, confirma que lesiones del HA de monos produce insomnio. No obstante, lesiones en el HP no mostraron ningún efecto. Años más tarde, Nauta en 1946 confirma los resultados obtenidos por Von Economo al demostrar que lesiones en el HA de ratas producen insomnio y que lesiones a nivel del mesencéfalo y del HP producen sueño. Estos resultados sugirieron la existencia de dos centros neuroanatómicos responsables de la generación del sueño y la vigilia: por un lado el HP como centro de la vigilia el cuál inhibe activamente el centro del sueño localizado en el HA.

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

Paralelamente, se ha visto que otras regiones cerebrales también han sido relacionadas con la modulación del ciclo vigilia-sueño. De esta forma, Bremer en 1935 (en Bremer 1974) realizó sus estudios en dos preparaciones hechas en el gato, mediante secciones finas a diferentes niveles

del cerebro: Por una parte realizó, el cerebro aislado, separando la región anterior del cerebro del tallo cerebral, al seccionar el cerebro a nivel intercolicular, y mediante registro EEGráfico observó que existía una sincronización permanente, lo que él interpretó como un animal constantemente dormido. Mientras que en la otra preparación, encéfalo aislado; que consistió en seccionar a nivel más caudal entre médula oblongada y espinal, observó que no se modificaba el ciclo vigilia-sueño del gato. Por lo que concluyó que el sueño era el producto de la llegada insuficiente de estímulos sensoriales capaces de despertar al animal y que la vigilia era el caso contrario, la cantidad de estímulos recibidos eran importantes para mantener despierto al animal. Con estos resultados, Bremer sugirió que el sueño era un estado pasivo que dependía de la disminución de la actividad sensorial. Sin embargo, Moruzzi y Magoun, en 1949, interpretaron estos resultados con otro enfoque. Ellos consideraron la existencia de una estructura intermedia entre ambas secciones responsable de generar dicho efecto. Con esta idea, realizaron, en la preparación aguda del encéfalo aislado, estimulaciones eléctricas de la formación reticular bulbar, del tegmento mesencefálico y pontino, así como del tálamo y del subtálamo. Estos investigadores observaron que la estimulación de la Formación Reticular (FR) producía sincronización del EEG, y sugirieron que la FR a través de un sistema denominado: Sistema Reticular Activador Ascendente (SRAA), ejerce una influencia activadora tónica en estructuras subcorticales y corticales, para aumentar y mantener el estado de vigilia. Mientras que para que el sueño se presente tiene que disminuir la actividad de la FR. La existencia de este sistema fue demostrado mediante lesiones de la FR las cuales produjeron una disminución inmediata y crónica de la activación cortical tónica (Lindsley y col., 1950; citado en Jones, 1991). Asimismo, se demostró que la influencia activadora de la FR después de la estimulación eléctrica, sobre la corteza cerebral es transmitida a partir de una vía con dos relevos: una vía dorsal hacia el tálamo y una ventral al subtálamo, a hipotálamo y Area Preóptica (AP) (Sterman y Shouse, 1985). Dentro del sistema dorsal, el "núcleo talámico no-específico" ejerce una influencia activadora difusa sobre la corteza cerebral, como la que es producida por la estimulación del núcleo talámico intralaminar y ventromedial. Sin embargo, esta influencia no es necesaria para la activación cortical, ya que la estimulación de la FR puede aumentar la

activación cortical, en la ausencia del tálamo. Por lo que, el sistema extratalámico ventral es el particularmente importante para mantener la activación cortical. Asimismo, se ha observado que estimulaciones eléctricas a bajas y altas frecuencias del hipotálamo anterior de gatos produce sincronización del EEG (Sternman y Clemente, 1962).

Interesantemente, los enfoques pasivo y activo de la regulación del sueño consideraban a la vigilia como un estado opuesto a la condición del sueño, y el sueño por sí mismo fue visto como un estado homogéneo. El descubrimiento del sueño MOR, realizado por Aserinsky y Kleitman, en 1953, y su asociación con el dormir humano, marco el punto de inicio de una serie de estudios donde la idea monolítica del sueño fue abandonada, y sustituida por los conceptos duales de mecanismos activos reguladores del sueño lento y del sueño MOR.

En cuanto, a los substratos responsables de la generación de sueño MOR, se ha evidenciado que se localizan dentro del romboencéfalo, ya que el diencéfalo y telencéfalo no exhiben ningún patrón de actividad característico de esta fase cuando son separados del tallo cerebral. Los signos de sueño MOR ó espigas PGOs en asociación con la atonía muscular fueron evidentes en el romboencéfalo. Separaciones mayores mostraron que el puente es la región más importante para esta fase, ya que transectos a través del mesencéfalo caudal, no impiden la aparición periódica de este estado. Mientras que transectos a través de la médula rostral eliminan la atonía muscular, pero no impiden la aparición periódica de la actividad fásica, como son las espigas PGO y los MORs. Los resultados de estos estudios indicaron la importancia del tegmento pontino en la generación de la activación fásica y tónica, así como de los procesos inhibitorios del sueño MOR (Jouvet, 1962). Posteriormente, se demostró que lesiones eléctricas extensas del tegmento pontino producen una disminución total del estado de sueño MOR, incluyendo espigas PGO, MORs y atonía muscular (Jones, 1979).

En 1960, Shute y Lewis, establecieron que un considerable número de células dentro del tegmento ponto-mesencefálico eran colinérgicas, ya que contenían acetilcolinesterasa (AChE), la enzima degradativa para la Acetilcolina (ACh). Asimismo, fueron teñidas con AChE fibras ascendentes de la FR a lo largo de la vía dorsal del hipotálamo. En el área preóptica (AP), estas fibras ascendentes se tiñeron para AChE y alcanzaron otra población celular hacia la corteza

cerebral. Con base en estos resultados Shute y Lewis postularon que las neuronas colinérgicas representan el SRAA y que el enlace en el cerebro anterior basal representa el relevo extratalámico hacia la corteza cerebral del SRAA. Recientemente, se ha demostrado que durante la vigilia y el sueño MOR, ocurre una influencia activadora de los núcleos colinérgicos del tallo cerebral (Núcleo Tegmental Pedunculopontino y Tegmental Laterodorsal) y de los sistemas monoaminérgicos (norepinefrina del Locus Coeruleus y serotonina del núcleo rafe dorsalis) hacia el tálamo y la corteza cerebral (Jones, 1991). Estos neurotransmisores aparentemente aumentan la excitabilidad y reducen o suprimen los procesos inhibitorios a largo plazo de las células tálamo-corticales (Steriade y col., 1990; McCormick, 1992). Mientras tanto durante el SOL o al menos durante la presencia de los husos de sueño, ocurre una reducción de la influencia de las proyecciones ascendentes colinérgicas y monoaminérgicas, las cuales permiten por tanto que las células talamocorticales y las retículo talámicas oscilen y sincronicen redes sinápticas "pasivamente" (Steriade y col., 1990). La naturaleza oscilatoria pasiva de las células talámicas depende de sus propiedades intrínsecas y de las diferentes conductancias iónicas, tales como la conductancia lenta inactivante de Na^+ , el bajo umbral de la espiga de Ca^{2+} y la conductancia de Ca^{2+} , dependiente de K^+ (Steriade y Llinás, 1988). Asimismo, estas propiedades controlan las influencias del núcleo reticular talámico, el cual es de naturaleza gabaérgica y funciona como un oscilador, que mediante conexiones con el núcleo talámico sincroniza la actividad de las neuronas talámicas, induciendo una hiperpolarización coordinada a largo plazo.

En resumen, los resultados anteriormente descritos han sido de gran utilidad para establecer las conexiones y los substratos cerebrales relacionados con la generación y el mantenimiento de las fases y de los signos del ciclo vigilia-sueño. De esta forma podemos concluir que los mecanismos reguladores del SOL residen dentro de estructuras diencefálicas, mientras que las que regulan el sueño MOR parecen encontrarse principalmente en la formación reticular pontina. Diversos núcleos neuronales involucrados con la regulación del sueño han sido identificados que son de naturaleza colinérgica, noradrenérgica, serotoninérgica y gabaérgica, principalmente. Esta relación representa una interacción importante para establecer no

solamente los substratos, sino también los mediadores químicos que en conjunto, participan en la modulación del ciclo vigilia-sueño. Con base en estas evidencias, en la siguiente sección revisaremos, la participación de dichos neurotransmisores en la modulación del sueño.

2.3 NEUROTRANSMISORES Y SUEÑO

Jouvet en 1969, a partir de diversas evidencias experimentales, propuso la "teoría monoaminérgica del sueño", la cual postula que el SOL se inicia por la liberación de 5-HT de las neuronas del núcleo rafe dorsal (RD). Mientras que el sueño MOR, se inicia por la liberación de 5-HT del núcleo del rafe caudal y la ejecución depende de las neuronas noradrenérgicas localizadas en el complejo del LC (Núcleo LC, Subcoeruleus y posiblemente el núcleo Parabraquialis Medialis), que además se encargan de preservar las diversas manifestaciones de dicha fase.

2.3.1 SEROTONINA (5-HT)

Las evidencias experimentales que apoyan la participación de la 5-HT en la generación de los mecanismos del SOL y en el disparo del sueño pueden resumirse de la siguiente manera: La administración de serotonina (5-HT) en el área postrema de gatos (Koella y col. 1968), o bien de sus precursores inmediatos, tales como el aminoácido L-triptofano (L-TRIP) ó el 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (Jouvet, 1969), inducen SOL suprimiendo el sueño MOR. Mientras que el bloqueo farmacológico de la 5-HT mediante la paraclorofenilalanina (PCPA), un inhibidor de la enzima triptofano hidroxilasa, que transforma el TRIP en 5-HT, reduce el SOL y el sueño MOR, durante un período de 48-52 horas, produciendo un insomnio casi completo, acompañado de la descarga continua de ondas PGOs (Delorme y col., 1969). El insomnio es reducido con una sola administración de 5-HTP o 5-HT, respectivamente (Mouret y col., 1967; Petitjean y col., 1985). También, se ha observado que lesiones electrolíticas del núcleo RD, producen una reducción de los niveles serotoninérgicos cerebrales y una reducción del SOL y de sueño MOR. Dicho efecto depende del tamaño de la lesión. De esta forma, lesiones de un 80 a 90% de este núcleo producen un insomnio continuo durante los primeros 3 a 4 días, mientras que lesiones

menores al 15% no modifican el sueño (Jouvet y Renault, 1966). Asimismo, lesiones rostrales inducen la aparición de sueño MOR directamente después de la vigilia, semejante a estados de narcolepsia (Jouvet, 1969).

2.3.2 NORADRENALINA (NA)

Por otra parte, la teoría monoaminérgica también sugirió que el sistema noradrenérgico del tallo cerebral jugaba un papel importante en los mecanismos ejecutivos del sueño MOR debido a las siguientes evidencias: La administración del disulfiram (un bloqueador de la síntesis de NE), induce un decremento en la cantidad de sueño MOR (Dusan-Peyrethon y Forment, 1968). Diversos fármacos antagonistas de los receptores α_1 , disminuyen el sueño MOR (Matsumoto y Watanabe, 1967). Asimismo, lesiones bilaterales electrolíticas del LC, suprimen de manera selectiva el sueño MOR e interrumpen la atonía muscular característica de la fase de sueño MOR e incluso si las lesiones destruyen la mayoría de las neuronas noradrenérgicas del LC, también son eliminadas las ondas PGOs (Jouvet y Delorme, 1965). Además, se ha demostrado que la privación de sueño MOR (PSMOR) en la rata, produce un rebote de sueño MOR posterior a la privación y dicho rebote está asociado con un aumento en la concentración de NE cerebral (Pujol y col., 1969).

Pese a estas evidencias, la teoría monoaminérgica del sueño fue refutada por diversos estudios electrofisiológicos, de lesión y neuroanatómicos. La primera evidencia que no apoyó dicha teoría, fueron los registros de actividad unitaria de los sistemas del rafe y del LC, los cuales mostraron que la frecuencia de disparo disminuye gradualmente, conforme el animal transita de la vigilia (100% de descarga), al SOL (50%) hasta llegar al sueño MOR (10%) (McGinty y col., 1976; Fornal y col., 1985; McGinty y col., 1988). Asimismo, lesiones neurotóxicas selectivas con 6-hidroxidopamina en el LC (Laguzzi y col., 1972), o con 5,6 dihidroxitriptamina en el RD (Forment y col., 1974) no suprimieron el SOL o el sueño MOR, aunque produjeron la actividad permanente de espigas PGO a través del ciclo vigilia-sueño. Además, manipulaciones farmacológicas han mostrado que la administración crónica de PCPA a gatos produce un efecto temporal, ya que el ciclo vigilia-sueño retorna a la normalidad

después del 7o. día de administración, a pesar de que la 5-HT permanece disminuida (95% de reducción) desde el 5o. día (Dement y col., 1973). Asimismo, se ha observado que diferentes dosis de PCPA en la rata, reducen la biodisponibilidad de 5-HT; y que pese a que la 5-HT está disminuida no se presentan cambios en el ciclo vigilia-sueño (Retschaffen y col., 1973). También, se ha visto que el enfriamiento del RD (10 ° C) produce un incremento en la cantidad de sueño (Cespuglio y col., 1982). La liberación de 5-HT y las concentraciones del ácido indolacético (5-HIAA) incrementan durante la vigilia y decrecientan durante el sueño, en el núcleo caudado y corteza (estructuras que reciben terminales nerviosas serotoninérgicas axonales) (Cespuglio y col., 1988). Por otra parte, bloqueadores de la síntesis de NE, tal como el α -metilparatirosina, no disminuye el sueño MOR (Stern y Morgane, 1973). Asimismo, la administración de propranolol (antagonista β adrenérgico), clonidina (agonista de receptores α_1 -adrenérgicos presinápticos) o anfetamina (fármaco que aumenta la liberación de las concentraciones sinápticas de catecolaminas) inducen una disminución significativa en el SOL y sueño MOR, así como un incremento en la vigilia (Jacobs y Jones, 1978; Hilakivi, 1983), mientras que la inyección de fentolamina o prazocin (antagonistas α_1 -adrenérgicos) inducen un incremento en el sueño MOR (Hilakivi y Leppavuori, 1984).

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

Recientemente, Sallanon y col., 1985, han sugerido que la 5-HT es un neuromodulador que puede ser responsable durante la vigilia de la síntesis, liberación y almacenamiento de algún factor inductor de sueño en el hipotálamo, área que recibe proyecciones del núcleo del RD. Esta hipótesis fue apoyada por estudios realizados en gatos pretratados con PCPA donde se mostró que la inyección local de 5-HT en el hipotálamo restaura el sueño. Además, observó que la administración regional de 5-HT en el hipotálamo y NSQ aumenta significativamente la liberación de un péptido con propiedades hipnóticas, el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) (Shimatsu y col., 1982; 1983; Kiss y col., 1984). Posteriormente, mediante voltametría, Cespuglio y col., 1988, han propuesto que existen dos modalidades diferentes que regulan la

liberación de 5-HT del núcleo del RD durante el ciclo vigilia-sueño. El primero ocurre durante la vigilia, a través de la liberación axonal de 5-HT, medida en el hipotálamo y la cual se correlaciona con los registros de actividad unitaria del RD. Esta modalidad de liberación fue interpretada como la señal para la acumulación de un factor hipotalámico de sueño. La segunda modalidad está dada a través de la liberación dendrítica local de 5-HT, donde un decremento en la concentración extracelular de 5-HT ocurre durante el estado de vigilia en este núcleo, mientras que en el SOL y el sueño MOR, ocurre un incremento. La liberación local dendrítica, fue interpretada como la responsable de un proceso autoinhibitorio que reduce la actividad de neuronas serotoninérgicas durante el sueño (Cespuglio y col., 1990). Uno de los factores que han sido propuestos, es el péptido parecido a la corticotropina (CLIP) ya que tiene un efecto inductor de sueño junto con un incremento en los niveles de 5-HIAA del núcleo RD (Cespuglio y col., 1990; Houdoin y col., 1991).

En un esfuerzo por integrar los diversos estudios del LC y la NE en relación a la regulación del sueño. Siegel y Rowaski, 1988; han sugerido que una de las funciones del sueño MOR es aumentar la sensibilidad de los receptores noradrenérgicos. De tal forma, que el sueño MOR serviría para sobreregular o prevenir la regulación decreciente de los receptores noradrenérgicos cerebrales, dado que la actividad de disparo de las neuronas del LC y los niveles de NE disminuyen durante esta fase de sueño. En este sentido, se ha visto, que la privación de sueño MOR, se acompaña de un decremento en la unión específica de la NE al receptor beta-adrenérgico (Mogilnicka y col., 1986).

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

2.3.3 ACETILCOLINA (ACh)

Contemporánea a la teoría monominérgica, surgió la teoría colinérgica propuesta por Hernández-Peón, basado en estudios de inyecciones discretas de ACh en diversos núcleos

cerebrales. Esta teoría propuso que el ciclo vigilia-sueño está regulado por dos sistemas antagonistas colinérgicos: el de sueño y el de vigilia. El sistema de sueño estaba compuesto por dos componentes: el descendente y el ascendente. El primero seguía la trayectoria del haz medial del cerebro anterior desde el AP a través del hipotálamo lateral y hasta el área del cerebro medial límbico. Al respecto mostraron que inyecciones locales de microcristales de ACh dentro de este circuito aumentan el SOL, mientras que lesiones o inyecciones de atropina- un antagonista muscarínico- caudal a la inyección de ACh suprimen el efecto inductor de sueño (Velluti y Hernández-Peón, 1963). Por otra parte, el componente descendente se unía a nivel pontino con uno ascendente originado de la sustancia gris de la médula espinal (Hernández-Peón y col., 1963; 1965). En este sentido, se ha visto, que inyecciones de ACh en la médula caudal producen una sincronización regular del EEG, mientras que su administración a nivel dorsal aumenta con una latencia corta, todos los signos del sueño (Rojas-Ramírez y Drucker-Colín, 1973). La teoría de Hernández-Peón sugirió, que el sueño es un proceso unitario, donde el SOL y el sueño MOR, no son entidades separadas, sino diferentes manifestaciones de los mismos procesos básicos.

Por otra parte, el sistema colinérgico de vigilia correspondió al SRAA colinérgico descrito por Shute y Lewis, en 1968. Se ha visto, que la estimulación local colinérgica de este sistema produce vigilia (Morgane, 1969). No obstante, ambos sistemas de sueño y vigilia son topográficamente intermezclados en el haz medial del cerebro anterior y en el área hipotalámica lateral, donde las inyecciones de ACh en núcleos restringidos producen letargia o sueño conductual (Bandler, 1969).

La teoría de Hernández-Peón no ha sido aceptada debido al consenso casi universal de la naturaleza independiente del SOL y el sueño MOR, a nivel neurofisiológico, neuroquímico y funcional. No obstante, el papel de las neuronas colinérgicas en el tallo cerebral y en el cerebro anterior basal en la regulación del sueño MOR, ha sido completamente confirmado.

Se ha mostrado, que la administración sistémica de atropina sincroniza el EEG, al mismo tiempo que aumenta de dos a tres veces la liberación de ACh cortical (Celesia y Jasper, 1968). Mientras que en la corteza, cuerpo estriado y el FTG ocurren los mayores picos de

liberación de ACh durante el sueño MOR, comparada con la vigilia y el SOL (Jasper y Tessier, 1971; Gadea-Ciria y col., 1973; Kodama y col., 1990). A su vez, la lesión electrolítica del AP impide que dicho efecto se presente.

En estudios farmacológicos, se ha observado que el hemicolinio-3, un inhibidor de la síntesis de ACh bloquea la desincronización del EEG (Slater, 1968) y disminuye la duración de sueño MOR en el ciclo vigilia-sueño del gato (Hazra, 1970; Domino y Stawisky, 1971); mientras que la atropina sistémica disminuye el sueño MOR, sin afectar el SOL, en el gato pontino (Jouvet y col., 1973). Inyecciones regionales de agonistas colinérgicos en la FRP aumentan la cantidad de sueño MOR. De esta forma, se ha observado que la ACh, o la eserina un inhibidor de la acetil colinesterasa inducen sueño MOR con una latencia de 20 segundos y una duración aproximada de 3 h. Dicho efecto es potenciado con la administración simultánea de tales compuestos (Baghdoyan y col., 1984). La estimulación colinérgica de la FRP con betanecol (Hobson y col., 1983), carbacol (Gnadt y Pegram, 1988), neostigmina (Baghdoyan y col., 1984) o fisostigmina (Sitaram y col., 1976), aumentan la cantidad de sueño MOR, a partir de un incremento en la frecuencia y de una reducción en la latencia. Dicho efecto es bloqueado por la administración de diversos antagonistas. De tal forma, que la atropina y la escopolamina, retrasan la aparición y reducen la duración de los períodos de sueño MOR en gatos (Baghdoyan y col., 1985) y sujetos normales. Adicionalmente, la administración endovenosa de fisostigmina o arecolina, en los primeros períodos de sueño MOR, aumentan el tiempo total de esta fase (Sitaram y Gillin, 1980). La fisostigmina y agonistas muscarínicos inducen inmediatamente un estado de SMOR, incluyendo también eventos fásicos (espigas PGOs y MORs) y tónicos (inhibición motora), mientras que la atropina produce el efecto contrario. Adicionalmente, se ha evidenciado, que en el puente existe un gradiente neuroanatómico de colinocepción para inducir sueño MOR, de tal forma que el tegmento pontino dorsalis es el más sensible a la estimulación colinérgica para aumentar esta fase de sueño (Baghdoyan y col., 1987). En particular, se ha observado que la administración del carbacol en la región peribraquial del tallo cerebral produce un aumento en la cantidad de sueño MOR y de SOL con PGOs de 2 a 4 días y hasta una semana posterior a la inyección (Datta y col., 1991). Además, se ha visto que la cepa de ratas

Flinders, las cuales presentan hipersensibilidad a la ACh, presentan mayor cantidad de sueño MOR en relación a otras cepas (Shiromani y col., 1988 b).

Estos resultados claramente apoyan la participación de la ACh en la regulación y mantenimiento de la fase de sueño MOR. Sin embargo, consideramos que la acción de este neurotransmisor en el efecto inductor de sueño parece depender también de su capacidad para estimular otros sistemas, principalmente el hormonal. Sobre este aspecto, se ha involucrado a la hormona de crecimiento (GH), en la generación de sueño MOR (Takahashi, 1968), además de que su liberación sucede principalmente durante el sueño delta, el cual ocurre al inicio la primera mitad del ciclo de sueño del humano (Sassin, 1969). También, se ha observado que la administración de fármacos colinérgicos aumentan la liberación de la GH (Leveston y Cryer, 1980). y que fármacos anticolinérgicos, tales como la metescopolamina (Mendelson y col., 1978); la atropina (Taylor y col., 1985) y la pirenzepina (Peters y col., 1986), reducen la liberación de la GH asociada al sueño delta en humanos.

2.4 MODELO DE INTERACCION RECIPROCA

A partir de algunos trabajos anteriormente mencionados, Hobson y McCarley, en 1975, relacionaron la teoría monoaminérgica y colinérgica del sueño, para proponer su modelo de interacción recíproca. Este modelo relaciona la oscilación de dos poblaciones neuronales. Por un lado, las células localizadas en la FRP responsables de la generación de sueño MOR que se sugieren sean colinérgicas y/o colinoceptivas (células REM-ON) y por otro, las neuronas del LC y del RD de naturaleza aminérgica, las cuales, decrecen su actividad para permitir la activación de las células pontinas (células REM-OFF). Este modelo fue apoyado por experimentos de inyecciones con agonistas colinérgicas, las cuales mostraron que posterior a la microinyección de carbacol en la FRP ocurre un incremento importante en la cantidad de sueño MOR (Baghdoyan y col., 1987). Estudios adicionales han mostrado que la actividad de las neuronas del FTG aumentan su frecuencia de disparo unos segundos antes y durante el sueño MOR (El Mansari y col., 1983; Steriade y col., 1990).

La versión original del modelo de interacción recíproca postuló que la FRP era el centro controlador de la fase de sueño MOR. No obstante, registros electrofisiológicos realizados en animales en libre movimiento han mostrado que las neuronas de la FRP las cuales descargan durante el sueño MOR, también lo hacen durante los movimientos producidos durante la vigilia (Siegel y McGinty, 1977). Además, se ha demostrado que lesiones con ácido kaínico del campo tegmental gigantocelular (FTG), no afectan los niveles basales de sueño MOR del gato, sugiriendo que dicha estructura participa únicamente en la facilitación de sueño MOR, pero no en su generación (Sastre y col., 1981; Drucker-Colín y Bernal-Pedraza, 1983). No obstante, en tales condiciones, el carbacol fue incapaz de incrementar el sueño MOR (Drucker-Colín y Prospero-García, 1988).

Debido a que las células colinérgicas están localizadas en los núcleos del PPT y del LDT, y no en el FTG (Shiromani y col., 1988), se ha buscado caracterizar una potencial interacción entre estos núcleos, para la modulación del sueño MOR. Finalmente, evidencias recientes sugieren que el sueño MOR es generado por una amplia distribución neuronal a lo largo del tallo cerebral, más que por una estructura en particular (Vertes, 1984; Hobson y col., 1988; McCarley y Massaquoi, 1992).

2.5 PRIVACION DE SUEÑO

Una de las herramientas más utilizadas para tratar de entender los mecanismos reguladores y las funciones del dormir, ha sido su privación, es decir, mantener despierto a un individuo durante periodos prolongados y determinar que efectos tiene dicha privación sobre el organismo. De esta forma, se ha observado que la privación total de sueño produce un déficit general que se manifiesta principalmente por la dificultad para sostener la atención de manera continua y la irrupción de pequeños lapsos de sueño (microsueños) durante la vigilia. Además, desaparece el ritmo α y aumentan las ondas lentas cerebrales. También ocurre un deterioro en los mecanismos de producción energética y de las respuestas vegetativas ante el estrés. Aumenta el consumo de alimento, aunque disminuye el peso corporal. (Naito y col., 1971). Todos estos cambios son reversibles, cuando al organismo se le permite dormir.

Por la diferente naturaleza bioquímica y funcional de una y otra fase de sueño, y debido a que la privación total de sueño involucra a ambas fases, se han desarrollado diversas técnicas para privar selectivamente de sueño MOR (PSMOR). Una de las más utilizadas en muchos laboratorios, por su bajo costo y fácil instalación, ha sido el método del florero invertido ó del tanque, desarrollada inicialmente para gatos (Jouvet y col., 1964). Actualmente, también ha sido utilizado para ratas. Brevemente, este método consiste en colocar al animal en una plataforma, con un diámetro de 8 cm de ancho por 11 de largo, la cuál se encuentra rodeada de agua en un bote. La privación de sueño MOR consiste en que cada vez que el animal presenta relajación muscular total, la cual ocurre segundos antes de entrar a la fase de sueño MOR, el animal pierde el tono muscular cae al agua, y de esta forma se mantiene despierto por periodos prolongados. Cabe mencionar que esto solo sucede durante los primeros episodios de sueño MOR, después el animal aprende a que el solo desbalance corporal lo despierta sin que necesariamente tenga que caer al agua.

Durante la PSMOR aumentan los niveles de RNA m para la tirosina hidroxilasa (TH) en el LC, así como la concentración local de NE. Además, dichos cambios no están asociados con efectos de estrés, ya que los niveles de corticosterona no fueron diferentes entre los grupos con plataforma pequeña y grande (Porkka-Heiskanen y col., 1995).

Sin embargo, el método del tanque presenta ciertas desventajas pues no es tan selectivo para el sueño MOR, ya que también reduce entre el 10 y 40 % del SOL (Mark y col., 1969), además de que provoca estrés por el confinamiento. Gran parte de los efectos del estrés están asociados con la disrupción del sueño. Para controlar esta variable se han utilizado plataformas grandes (PG), de tal manera que le permite a los animales una relajación total, por lo que entonces pueden dormir libremente y transitar de una fase a otra, pero en condiciones de confinamiento.

Recientemente se han desarrollado métodos selectivos de privación de SMOR menos estresantes. Tales como, la técnica de multiplataformas, en las que el animal puede desplazarse evitando los efectos del confinamiento y la inmovilidad (Van Hulzen y Coenen, 1981); y la del péndulo, en la cuál los animales son colocados en una plataforma móvil donde la posición del

desbalance produce la PSMOR (Van Hulzen y Coenen, 1980). Estos dos sistemas de privación, con respecto al método del tanque, muestran una disminución de estrés con base en los índices clásicos de Selye: presencia de úlceras gástricas, atrofia del timo y suprarrenales, y pérdida del peso corporal (Coenen y Van Luitjelaar, 1985). También se ha observado que el estrés per se, provoca un aumento en la cantidad de sueño MOR (Rampin y col, 1991).

La PSMOR, produce una serie de cambios en el organismo, tales como incremento en la ingestión de alimento, en la actividad motora, así como en la agresividad y conducta sexual (Dement, 1965), y disminución en la capacidad de aprendizaje (Smith, 1985).

Posterior, a la PSMOR se ha observado que ocurre un aumento ó rebote de sueño MOR (Jouvet y col., 1964). Dicho rebote se caracteriza por acortamiento en la latencia, aumento en la frecuencia y duración de los períodos de sueño MOR. Asimismo se ha observado que aumentan los movimientos oculares y las espigas PGOs (Dement y col., 1969). El rebote de sueño MOR es proporcional al tiempo de privación, de tal forma que se ha observado que posterior a 72 horas de PSMOR, ocurre un incremento límite en la cantidad de sueño MOR del 60 %, a tiempos posteriores se ha visto que ya no hay compensación (Siegel y Gordon, 1965).

Por otra parte, se ha sugerido que el rebote de sueño MOR esta modulado por un incremento en los niveles de excitabilidad de diversas estructuras del tallo cerebral (Drucker-Colín y Valverde, 1970).

2.6 ESTRES Y SUEÑO

Generalmente la PSMOR produce durante el período de recuperación un incremento en la duración de sueño (Vogel y col., 1970). Diferentes grupos de investigación se han cuestionado si el rebote de sueño es el resultado de la privación de sueño o si el estrés producido principalmente por la interrupción del sueño, modula dicho efecto. Al respecto se ha demostrado, que algunos parámetros involucrados en la respuesta del estrés, tales como los niveles de ACTH, corticosteroides, E y NE, no muestran variaciones con la PSMOR (Everson y col., 1989). Aunque recientemente, diversos grupos de investigación han mostrado que el estrés por sí mismo induce cambios importantes en la neuroquímica cerebral (Gray, 1991).

Evidencias experimentales recientes han mostrado que el estrés intenso inducido por dos horas de inmovilización, al inicio del periodo de oscuridad, produce un incremento en la duración de sueño MOR. Asimismo, si la inmovilización se repite diariamente, la cantidad de sueño MOR disminuye con respecto al control (Rampin y col., 1991). Estos resultados ponen de manifiesto que el aumento del SMOR puede ser dependiente del estrés.

El efecto del estrés ha sido atribuido a un complejo circuito de retroalimentación, donde se han involucrado a la 5-HT, ACh, NE, proopiomelanocortina (POMC) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), los cuales además de modular el sueño, han sido involucrados con la respuesta del estrés (Smelick y col., 1982). En este sentido, se ha demostrado que durante la inmovilización, ocurre un aumento en la liberación de 5-HT en el hipotálamo basal (Cespuglio y col., 1995). Estos resultados han sugerido que posiblemente la 5-HT participa de manera secundaria, en el rebote de sueño MOR posterior a la maniobra de inmovilización, en la síntesis y/o liberación de algunas sustancias hipnogénicas (Cespuglio y col., 1995). Aunque también se ha observado, que el sistema noradrenérgico localizado en el LC participa en la respuesta del estrés (Brady, 1994) y en el rebote de sueño, que ocurre posterior a 10 h de privación mediante el método del tanque, ya que una sola inyección del DSP-4, una sustancia neurotóxica que destruye las fibras noradrenérgicas provenientes del LC, disminuye el rebote de sueño (González y col., 1993). Asimismo, observaron que el rebote de sueño MOR producido por una hora de inmovilización, disminuye después de la administración del DSP-4 (González y col., 1995). Estos hallazgos sugieren que durante la inmovilización el incremento de sueño inducido por tal estresor es mediado al menos en parte por neuronas serotoninérgicas del núcleo del RD y noradrenérgicas del LC. Adicionalmente, se ha visto mediante estudios de inmunoreactividad para el c-fos, que una hora de inmovilización produce un incremento importante en su expresión en diversos núcleos cerebrales, tales como el LC y diversas áreas de proyección, como el septum lateral, el área preóptica lateral, el área hipotalámica lateral, el núcleo paraventricular, la amígdala medial y diversas estructuras del tallo cerebral (Tononi y col., 1994).

En cuanto a la relación de la ACh y el estrés, diversos estudios han mostrado que la actividad de la enzima de síntesis de la ACh, la Colina Acetiltransferasa, incrementa su

actividad después del estrés agudo y crónico en el cerebro, en regiones tales como: la corteza, hipotálamo, hipocampo, cerebelo y médula suprarrenal. El incremento en dicha enzima, puede traducirse en una mayor disponibilidad de ACh y quizás en un aumento en la liberación. Este hallazgo checa con los trabajos de privación de sueño y estrés, en los cuales se ha reportado un incremento en los niveles de ACh (Wahba y Sohman, 1992).

A partir de estas evidencias podemos señalar que el estrés aumenta el sueño MOR mediante la interacción de diversos núcleos cerebrales y algunos sistemas de neurotransmisión.

Por otra parte, se ha evidenciado que existen compuestos de naturaleza proteínica, las denominadas sustancias inductoras de sueño, que también participan tanto en la modulación del sueño MOR, como del SOL.

2.7 REGULACION NEUROHUMORAL DEL SUEÑO.

Las primeras observaciones al respecto fueron obtenidas a principios de siglo, por Pieron en 1913. En sus experimentos este investigador mostró que el LCR obtenido de animales PS era capaz de inducir sueño cuando se administraba a la cisterna magna de animales normales. Estas observaciones sugirieron que durante la vigilia prolongada se acumulaban sustancias inductoras de sueño en el LCR, por lo que las denominó "hipnotoxinas". A pesar de estos resultados, esta teoría fue retomada de manera formal hasta la década de los 60's, por diversos grupos de investigadores. A partir de entonces, se ha postulado la existencia de varias sustancias ó factores inductores para el SOL y el sueño MOR, presentes en el plasma, LCR, orina y cerebro.

La nueva era en la investigación de las diferentes sustancias de sueño, fue iniciada por Monnier y col., en 1963, quienes sugirieron la existencia de una sustancia inductora de sueño en el plasma. En sus experimentos utilizaron parejas de conejos que tenían circulación cruzada, mediante la anastomosis de las venas yugulares. Adicionalmente, a uno de los animales le estimularon eléctricamente los núcleos intralaminares del tálamo, lo que produjo sincronización del EEG y a los pocos minutos el animal no estimulado también se durmió. Este experimento sugirió, que el cerebro del animal estimulado liberó alguna sustancia hipnogénica, vía el torrente

circulatorio, la cual llegó al cerebro del animal receptor y produjo sueño. Evidencias posteriores mostraron que el dializado obtenido de las muestras de sangre de los animales estimulados, inducía sueño en conejos despiertos por vía endovenosa o intracerebroventricular (Monnier y Hosli, 1964; 1965; Monnier y Hatt, 1971). Poco después, se determinó que el principio activo del dializado era un nonapéptido, el cual cuando se administra en el 3er. ventrículo, induce SOL (Monnier y col., 1972). Debido al efecto de esta sustancia sobre el sueño delta le denominaron péptido inductor de sueño delta (DSIP). Recientemente, se ha visto que el DSIP se localiza en el cerebro de la rata (Kastin y col., 1988), en el interior de neuronas serotoninérgicas, catecolaminérgicas y productoras de somatostatina (Ernst y Schoenenberger, 1988), así como en el suero (Kastin y col., 1978) y en el LCR de humanos (Kato y col., 1985). A pesar de que existen estudios que no apoyan la participación del DSIP en la inducción de sueño (Tobler y Borbély, 1980; Mendelson y col., 1980), actualmente este péptido se utiliza con fines terapéuticos, para tratar de corregir disfunciones del sueño, tales como el insomnio y la narcolepsia sin que los resultados sean aún concluyentes (Schneider -Helmert, 1988).

Pappenheimer y col., en 1967, retomaron los experimentos de Pieron y propusieron la existencia de una sustancia inductora de sueño presente en el LCR de cabras PS. Ellos privaron de sueño a cabras durante 24, 48 y 72 h, y después les extrajeron LCR. Posteriormente, el LCR fue administrado a ratas. Los resultados mostraron que el LCR indujo sueño conductual y un decremento en la actividad motora conforme más prolongado fue el tiempo de privación. Debido a que esta sustancia o factor inducía sueño, Pappenheimer, le denominó factor S. Poco después fue caracterizado como un oligopéptido de menos de 500 daltones capaz de inducir sueño (Fencel y col., 1971). Posteriormente, se demostró que el factor S, es un proteoglicano, el muramil dipéptido (MDP) (Krueger y col., 1985a), el cual se ha sugerido, es aportado a la economía del organismo por las bacterias del tracto digestivo. Además, se ha observado que el MDP es el más potente de los péptidos muramil, para la inducción del SOL (Krueger y col., 1985 b), aunque también su efecto inductor de sueño esta acompañado por un incremento en la temperatura corporal y estimula la respuesta inmune (Krueger y col., 1985). Pese a estas desventajas, estudios de microinyección del MDP en diversas regiones cerebrales, han sugerido

que el sitio de acción del MDP está en el AP, hipotálamo y subtálamo (García-Arriaga y Pappenheimer, 1983).

Debido a las limitantes del factor S o MDP para la inducción de sueño y a los efectos producidos sobre la temperatura corporal, actualmente, Krueger y col., 1987, han postulado la teoría inmunológica para la regulación del ciclo vigilia-sueño, en la cual han involucrado a la interleucina-1 y al interferón- α -2 como factores inductores del SOL (Krueger y Kamovsky, 1987). Sin embargo, la participación de dichos factores en la regulación del sueño continua siendo controvertida.

Por otra parte, el inicio del estudio de las sustancias inductoras de sueño en el cerebro de animales PSMOR fueron iniciadas por Nagasaki y col., en 1974; quienes demostraron que extractos del tallo cerebral de ratas PS por 24 hrs, administrados a ratas controles promueve la aparición de SOL y sueño MOR. Debido a estos efectos le nombraron sustancia promotora de sueño (SPS) (Nagasaki y col., 1980). La administración intracerebroventricular (i.c.v.) de la SPS provoca un aumento del SOL en el período de oscuridad durante el primero y segundo día, pero no produce cambios durante los períodos de luz. Mientras que el sueño MOR, aumentó solo durante el período de oscuridad del 2o. día (Inoué y col. 1983). Asimismo, la administración i.p. de la SPS induce SOL y también se observa un efecto tardío sobre el sueño MOR (Nagasaki y col. 1980). La caracterización bioquímica de la SPS mostró que es una molécula de 500 daltones, la cuál produce inhibición de la descarga espontánea del ganglio abdominal del cangrejo de río (acocil) (Nagasaki y col. 1976). Por lo que sugirieron, que la SPS es una sustancia de índole proteínica con poderosas propiedades inhibitorias. Purificaciones posteriores de la SPS han identificado tres principios activos, demostrando que uno de ellos es la Uridina y que es la más potente de los tres para inducir SOL (Honda y col., 1984).

De todas las sustancias inductoras de sueño citadas anteriormente, la SPS presenta una ventaja a diferencia del DSIP y del factor S, ya que es el primer factor inductor de sueño que se obtiene de una región específica del parénquima cerebral, por lo que puede sugerirse su sitio de acción. Sin embargo, al igual que las otras, su efecto es preferencialmente sobre el SOL y casi sin ningún efecto sobre el sueño MOR.

El estudio de las sustancias promotoras de sueño, obtenidas del tejido cerebral fue evidenciada por nuestro grupo, quienes demostramos que los perfusados obtenidos de la formación reticular mesencefálica (FRM) de gatos PSMOR son capaces de inducir sueño cuando éstos son administrados a la zona homóloga de gatos sin privar (Drucker-Colín y col., 1970). Asimismo, observaron que la concentración de proteínas de estos perfusados varía en forma cíclica y los picos de mayor amplitud se presentan durante el sueño MOR (Drucker-Colín y col., 1975). En cuanto a la caracterización bioquímica de dichos perfusados durante el sueño MOR, se demostró que contenían dos proteínas con un peso molecular de 75,000 y 45,000 daltones exclusivos de esta fase de sueño (Spanis y col., 1976). Adicionalmente, se mostró que la administración de anticuerpos contra dichos perfusados inhiben la cantidad de sueño MOR en gatos normales (Drucker-Colín y col., 1980) y que lesiones del AP producen insomnio e impiden la liberación cíclica de las proteínas de la FRM (Drucker-Colín y Gutiérrez, 1976). A partir de estas evidencias se muestra claramente que las proteínas están involucradas en la regulación del sueño MOR.

Los primeros estudios que inferían la participación de las proteínas durante el sueño fueron realizados por Oswald en 1969. El sugirió que posterior a la PSMOR ocurre una intensa restauración neuronal, la cual es mediada por un incremento en la síntesis de proteínas cerebrales. Poco después, diversas evidencias apoyaron esta hipótesis. Takahashi y col., en 1968, mostraron que existe una alta correlación entre los picos de liberación de la hormona de crecimiento (GH) y el SOL. Asimismo, se ha demostrado que en niños que presentan deficiencias en la liberación de la GH existe una reducción en la cantidad de sueño MOR, aunque el sueño delta no se afecta (Orr y col., 1977). Dado que la GH es una hormona anabólica, es probable que la liberación de dicha hormona ocurra durante el SOL para producir en el sueño MOR un incremento en la síntesis de proteínas. Esto ha sido indirectamente confirmado, ya que la administración de la GH incrementa la cantidad de sueño MOR en gatos (Stern y col., 1975), ratas (Drucker-Colín y col., 1975) y humanos (Mendelson y col., 1980), sin afectar el SOL y dicho efecto fue dosis-dependiente.

Diferentes inhibidores de la síntesis de proteínas, tales como la anisomicina y el cloranfenicol (CAP), reducen la cantidad de sueño MOR, sin afectar la fase del SOL (Rojas-Ramírez y col., 1977). Asimismo, el CAP también impide el rebote de sueño MOR que se observa después del tratamiento con anfetamina (Drucker-Colín y Benítez, 1977).

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

A partir de estas evidencias se demuestra claramente que las proteínas están involucradas en la modulación de sueño MOR. Sin embargo, se desconoce cuales son los tipos de proteínas responsables de la regulación del sueño MOR. Recientemente, sin embargo, diferentes neuropéptidos han sido involucrados en la regulación del ciclo vigilia-sueño.

2.8 NEUROPEPTIDOS Y SUEÑO

Neuropéptidos tales como la angiotensina II, la renina, sustancia P y la arginina-vasotocina disminuyen el sueño MOR a expensas de un aumento en el SOL (Riou y col., 1982a). Mientras que la neurotensina, la met y leu-encefalina, y la colecistocinina-octapéptido (CCK-8) no modifican el ciclo vigilia-sueño de ratas normales (Riou y col., 1982 b). Por otra parte, el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) es un potente inductor de sueño MOR en ratas mantenidas en condiciones normales y de insomnio (Riou y col., 1982 c). En tanto que la administración i.c.v. de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) aumenta el tiempo total de vigilia, mientras que péptidos derivados de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) y el péptido parecido a la corticotropina (CLIP), aumentan el SOL y el SMOR (Chastrette y Cespuglio, 1985). Sin embargo, la α y la β endorfinas no producen cambios en el sueño. También se ha observado que inyecciones i.c.v o i.p. de arginina vasotocina, inducen un incremento en el SOL y una supresión del sueño MOR. Estos efectos fueron prevenidos por lesiones del RD (Goldstein y Pratta, 1984).

Además, se ha demostrado que la administración i.p. de un análogo de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH) (piroglutamil-seril-fenilalaninamida), aumenta el SOL profundo

en ratas (Sidneva y col., 1988). No obstante, dicho efecto aún es controversial, existen estudios que muestran una reducción en el sueño (Borbély y Tobler, 1989).

Como puede apreciarse, estos trabajos indican que el VIP es uno de los pocos neuropeptidos hasta ahora analizados que incrementa la fase de sueño MOR. Como revisaremos a continuación, evidencias posteriores, han apoyado la participación del VIP como un factor hipnogénico.

2.8.1 VIP Y SUEÑO

Diferentes estudios han demostrado que el VIP aumenta el sueño MOR en gatos (Drucker-Colín y col., 1984), ratas (Obál y col., 1986) y conejos (Obál y col., 1989) en condiciones normales; y que su efecto inductor de sueño no depende de cambios en la temperatura cerebral (Obál, 1986 a). No obstante, en humanos (Steiger y col., 1994) Además, Kruisbrink y col., 1987; demostraron que la administración constante de VIP (200 ng/ día) a ratas, incrementa la cantidad de sueño MOR de manera significativa durante el período de luz y el de oscuridad. También, se ha observado que el VIP induce sueño MOR en ratas (Riou y col., 1982 c) y gatos insomnes por la PCPA (Prospero-García y col., 1986; Prospero-García y col., 1992) o bien en animales con lesiones bilaterales del AP (Pacheco-Cano y col., 1990). Además, se ha demostrado, que la administración de un antagonista selectivo para los receptores de VIP disminuye de manera significativa la cantidad de sueño MOR (Mirmiran y col., 1989). Asimismo, se ha visto que el VIP presenta un efecto inductor de sueño MOR más potente que el factor liberador de la GH y que la CCK-8, en ratas normales (Obál, 1986 b).

Por otra parte, en nuestro laboratorio demostramos que las propiedades inductoras de sueño del LCR de animales PSMOR disminuyen cuando este es incubado con anticuerpos anti-VIP (Drucker-Colín y col., 1988). Lo que sugirió que el VIP o una molécula inmunológicamente parecida, podría ser uno de los factores inductores de sueño MOR presente en el LCR durante la vigilia prolongada. Al respecto, hemos demostrado que el VIP se acumula en el LCR de animales PSMOR y que tal vez mediante esta vía pudiese estar participando en el rebote de sueño (Jiménez-Angulano y col., 1993).

Adicionalmente, se ha observado que el efecto inductor del VIP sobre el sueño está mediado a nivel hormonal. Se sabe que el VIP estimula la liberación de prolactina hipofisiaria y que participa en la regulación de la secreción de esta hormona (Abe y col., 1985), la cuál también aumenta la cantidad de sueño MOR (Roky y col., 1993). Por el contrario, la administración de anticuerpos anti-prolactina disminuye los niveles de VIP y la cantidad de sueño (Obál y col., 1994). Estos hallazgos sugieren que la prolactina media la actividad promotora de sueño del VIP.

El VIP presenta cierta homología estructural con otros péptidos, además de que se localizan en diversas regiones cerebrales asociadas con la regulación del sueño. Investigaciones recientes, han mostrado que algunos péptidos de esta familia modifican también la cantidad de sueño, tales como el péptido histidina metionina (PHM) y el péptido estimulador de la adenilato ciclasa (PACAP), los cuales aumentan selectivamente el sueño MOR en conejos (Obál y col., 1994) y ratas (Fang y col., 1995). Aunque, el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRH), solo aumenta el SOL en ratas, conejos y humanos (Obál y col., 1988). Estos resultados indican que probablemente algún dominio que comparten estos péptidos, participa de manera importante en modular el incremento de sueño MOR.

Asimismo, se ha demostrado que el VIP y la ACh, además de presentar un efecto inductor de sueño MOR, coexisten en varias regiones cerebrales involucradas en la regulación de éste (Suttin y col., 1988). En cuanto a la interacción del VIP, ACh y diversas estructuras cerebrales en la modulación del sueño, hemos evidenciado que la administración simultánea de carbacol en el FTG y de VIP en el 4 ventrículo, producen un decremento del 50 % en relación al efecto observado con la inyección única de VIP (Drucker-Colín y col., 1987). En contraparte, la administración simultánea de atropina y del VIP en animales pretratados con PCPA aumenta aún más la cantidad de sueño MOR en relación a la inyección única de VIP (Prospero-García y col., 1992). Con base en estos resultados sugerimos que la ACh bloquea los efectos inductores de sueño del VIP en animales con el sistema serotoninérgico disminuido. Probablemente, la generación de sueño MOR dependa de un balance en los diferentes sistemas de neurotransmisores, neuropéptidos y diversos núcleos cerebrales. En este sentido, se ha

observado que los niveles del VIP muestran variaciones circádicas en diversas estructuras cerebrales, en especial en el NSQ (Morin y col., 1990). Dicho núcleo participa de manera importante en la regulación de los ritmos circádicos y del ciclo vigilia sueño (Borbély y col., 1985). Estas evidencias apuntan a que posiblemente el VIP interactúa con el sistema circádico de sueño, para la modulación de éste.

En los últimos años un gran número de sustancias, han sido propuestas como reguladoras del ciclo vigilia-sueño (Tabla I). Sin embargo, en la mayoría de los casos el efecto de dichas sustancias es facilitar más que inducir la aparición de sueño, por lo que Jouvet en 1984, propuso una serie de condiciones para identificar a una sustancia dada como un factor inductor de sueño. La mayoría de estos requisitos no han sido investigados de manera profunda en muchas sustancias, por lo que los resultados descritos anteriormente no son concluyentes. Además, el término factor inductor de sueño resulta estar mal empleado, debido a que muchas de estas sustancias, más que inducir, facilitan la aparición del sueño, por lo que a la mayoría se le han denominado factores facilitadores de sueño.

Finalmente, a lo largo de esta revisión, sobre las diferentes sustancias inductoras de sueño, podemos concluir que a pesar de las diversas evidencias experimentales, se desconoce la cinética y el mecanismo de acción de dichas sustancias. Sobre este punto, consideramos que una sustancia inductora de sueño puede actuar de manera indirecta, sobre uno ó más sustratos neuronales, que pueden ser parecidos funcionalmente para aumentar el sueño y donde los niveles de excitabilidad neuronal son indispensables para el mantenimiento de este proceso (Drucker-Colín, 1995). Es posible que tales redes pudieran actuar a través de un mecanismo de retroalimentación, donde la alteración de eventos conductuales y bioquímicos de estas células asociadas, afecten el sueño per se. Las numerosas sustancias bioquímicas y los tipos celulares involucrados en la regulación del sueño, nos ofrecen un cuadro teórico difícil, para tratar de explicar los mecanismos que subyacen al sueño, en el cuál múltiples variables fisiológicas pueden alterar este evento.

Tabla I. Sustancias involucradas en la regulación del sueño.

SUSTANCIAS		SOL	SUEÑO MOR
VIP	+	No cambia	↑
	-	No cambia	↓
CCK-8	+	↑	↑
Endorfinas, Enkefalinas	±	No cambia	No cambia
Arginina-Vasotocina	+	↑	No cambia
Angiotensina	+	↑	No cambia
Renina	+	No cambia	↓
DSIP	+	↑	No cambia
Interleucina-1	+	↑	No cambia
Interferón α2	+	↑	No cambia
Muramil dipéptidos	+	↑	No cambia
Substancia P	+	No cambia	↓
Hormonas y derivados de la HC	+	No cambia	↑
Factor liberador de la HC.	+	↑	↑
CLIP	+	No cambia	↑
Somatostatina	+	No cambia	↑
α - MSH	+	↑	No cambia
Insulina	+	↑	↑
ACTH	+	↓	↓
LCR de animales PS	+	No cambia	↑
	-	No cambia	↓
Prostaglandinas D2	+	↑	No cambia
	-	↓	↓
Uridina	+	↑	No cambia
Adenosina	+	↑	No cambia
Prolactina	+	No cambia	↑
TRH	+	↑	No cambia
	-	↓	↓
GHRH	+	↑	No cambia

EFECTOS BIOLÓGICOS DEL VIP

TABLA 2

SITIO	ACCIÓN
1.- SISTEMA CARDIOVASCULAR	- Vasodilatación de vasos periféricos, espláncnicos, coronarios, extracraneales, cerebrales, pulmonares y genitales. Efecto cronotrópico e inotrópico
2.- SISTEMA DIGESTIVO	<p>ESÓFAGO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Relajación del esfínter menor. <p>ESTÓMAGO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Relajación del músculo liso, antral y fundico. <p>INTESTINO DELGADO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Relajación seguida por contracciones del músculo circular. - Contracción del músculo longitudinal. - Estimulación de secreción de iones y agua. - Estimulación en la secreción de la glándula de Brunner. <p>INTESTINO GRUESO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Relajación del músculo liso. - Secreción de agua y cloro. <p>VESÍCULA BILIAR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Relajación del músculo liso - Inhibición de flúidos y absorción de NaCl. <p>HÍGADO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de la secreción biliar. <p>PÁNCREAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de secreción de agua y HCO_3^-.
3.- FUNCIÓN ENDOCRINA Y METABOLISMO	<p>METABOLISMO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lipólisis. - Glicogenólisis. <p>PÁNCREAS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Liberación de insulina, glucagón, somatostatina y polipeptido pancreático. <p>TIROIDES:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de la secreción de hormonas. - Estimulación de la esteroidogénesis adrenal. <p>RIÑÓN:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de la secreción de renina. <p>PITUITARIA/HIPOTÁLAMO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Liberación de prolactina, oxitocina y vasopresina. <p>OVARIOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de esteroidogénesis.
4.- SISTEMA UROGENITAL	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la actividad mioeléctrica y del músculo liso. <p>RIÑÓN:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de renina liberada por las células yuxtaglomerulares.
5.- SISTEMA RESPIRATORIO	<ul style="list-style-type: none"> - Broncodilatación - Estimulación en la secreción de la glándula submucosa.
6.- SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	<ul style="list-style-type: none"> - Excitación de neuronas de la corteza cerebral y médula espinal. - Hipertermia - Estimulación de glicogenólisis y de utilización de glucosa. - Efecto hipnogénico.
7.- SISTEMA INMUNE	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la transformación mitogénica inducida por linfocitos-T. - Estimulación de la síntesis de Ig.

en el intestino, el corazón, pulmones, en la pituitaria, en la glándula pineal, tiroides, estructuras intraoculares, órganos genitales masculinos y femeninos, piel, oído medio, riñón y médula adrenal.

Mediante estudios de inmunoreactividad y de unión específica se ha demostrado que el VIP se localiza en las siguientes estructuras cerebrales, presentando un gradiente de concentración en el cerebro de diferentes mamíferos. Se ha demostrado, que las mayores concentraciones de VIP se localizan en la Cx en una población homogénea de interneuronas bipolares, radialmente orientadas y en diferentes estructuras del cerebro anterior basal: el septum, estria medularis, amígdala, núcleo acumbens, hipotálamo, hipocampo, cuerpo estriado y el NSQ (Said y Rosenberg, 1976; Giachetti y col., 1977; Besson y col., 1979; Said y Rosenberg, 1972). De todas estas estructuras, el NSQ es el que presenta las mayores concentraciones de síntesis de VIP en el SNC (Card y col., 1988). Mientras que concentraciones moderadas (1 ng/mg de proteína) de VIP han sido localizadas en los núcleos hipotalámicos peri y paraventriculares (Eiden y col., 1982), en la sustancia gris periacueductal y estructuras ventrales al 4- ventrículo (Obata- Tsuto y col., 1983; Wang y col., 1983; Besson y col., 1979). Concentraciones bajas (0.8 ng/mg de proteína) están localizadas en el área postrema, RD, LC y el núcleo tegmental dorsal (Sutin y Jacobowitz, 1988). El VIP también se localiza en estructuras periventriculares (Besson y col., 1979) y en el LCR de gatos (Wang y col., 1983), ratas (Kaji y col., 1983), perro, mono (Ebeid y col., 1978) y humanos (Ebeid y col., 1979; Fahrenkrug y col., 1977).

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

en las mismas concentraciones en el adulto. Esto no ocurre así en el duodeno, ya que en esta estructura sigue aumentando su concentración aún en el adulto (Emson y col., 1979).

Las concentraciones de VIP en el adulto disminuyen conforme la edad del animal aumenta. De esta manera se ha observado, mediante estudios de inmunocitoquímica, que existe un decremento del 36% de neuronas VIPérgicas en el NSQ de ratas viejas en relación con ratas jóvenes. Sin embargo, en las ratas viejas el tamaño promedio de estas neuronas aumenta, lo que sugiere un proceso compensatorio en la disminución del número de dichas neuronas (Chee y col., 1988). Asimismo, el NSQ está involucrado en regular los ciclos de luz medioambientales, actuando como un reloj circádico responsable de la orquestación de los ritmos circadianos endógenos (Van den Pol y Powley, 1979), lo que sugiere una estrecha relación funcional entre este péptido y dicho substrato neuronal. En este sentido, se ha demostrado que las concentraciones del VIP en el NSQ dependen de las condiciones de luz-obscuridad, ya que cuando los animales son expuestos a condiciones constantes de luz la concentración de VIP disminuye. Estos resultados sugieren que las neuronas que contienen VIP en el NSQ están involucradas en mediar la información fótica dentro de este núcleo. Por otra parte, se sabe que la expresión del ácido desoxirribonucleico (RNA) mensajero para VIP (VIP-mRNA) en la rata, disminuye durante el período de luz y aumenta durante el período oscuro (Gozes y col., 1989). Estos resultados sugieren que la maquinaria de síntesis para VIP ocurre durante el período oscuro, fase durante la cuál se presenta el período de actividad ó de vigilia en la rata y en consecuencia durante el período de luz el VIP sintetizado es utilizado cuando el animal duerme, bajo condiciones normales. Estos resultados sugieren que posiblemente el NSQ es una estructura importante para mediar el efecto inductor de sueño del VIP.

2.9.3 ACCIONES BIOLÓGICAS

Las acciones biológicas del VIP son múltiples dependiendo del sitio de acción. Por ejemplo, se ha demostrado que en el sistema cardiovascular actúa facilitando la vasodilatación, en el sistema respiratorio aumenta la broncodilatación, la ventilación y la vasodilatación

pulmonar, mientras que en el sistema digestivo participa en la relajación de la unión entre el esófago y el estómago (esfínter esofágico), y del músculo liso. En el hígado y el páncreas estimula la secreción de agua y bicarbonato e incrementa el flujo biliar. Asimismo presenta diversos efectos metabólicos y bioquímicos, ya que se ha visto que el VIP estimula la actividad de la adenilato ciclasa, la glucogenólisis, lipólisis e hiperglicemia. Además, presenta funciones endocrinas en diversos sistemas, de esta manera se ha observado que en el páncreas estimula la liberación de insulina, glucagón y somatostatina, mientras que en el sistema hipotálamo-hipófisis, estimula la liberación de diversas hormonas entre ellas la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH) y la hormona luteinizante (LH). En la médula adrenal participa en una acción parecida a la adrenocorticotropina (ACTH). En el riñón estimula la liberación de renina por las células yuxtaglomerulares (Gozes y Breneman, 1989; Magistretti, 1990).

En el SNC participa en la excitación de neuronas corticales y de la médula espinal, también se ha demostrado que produce hipertermia, estimula la glucogenólisis y la utilización de glucosa, además de producir efectos hipnagógicos. Además, se ha demostrado que el VIP está involucrado en la maduración, crecimiento y mantenimiento de neuronas (Gozes y col., 1993). El contenido de VIP en diversas regiones cerebrales cambia en forma importante con el desarrollo (Said, 1982), de esta manera se ha observado, que durante el proceso embrionario no se detectan concentraciones significantes de VIP (McGregor y col., 1982). Mientras que desde el nacimiento hasta los 14 días de edad el RNAm para VIP incrementa en la corteza frontal en un 30% , y a los 30 días de edad el RNA VIPm disminuye en un 60% (Gozes, 1988). Posteriormente, se ha demostrado que el bloqueo de la actividad del VIP *in vivo* produce deficiencias neurológicas e impedimento del desarrollo neuronal, adquisición de reflejos, así como disminución del aprendizaje y la memoria (Gozes y col., 1990). También este péptido ha sido involucrado en participar en los desórdenes convulsivos. En una cepa de ratones epilépticos se ha visto que existe un incremento en la inmunoreactividad de VIP en los cuerpos celulares de la región superior del stratum radiatum, en relación a animales de la misma cepa pero no epilépticos (King y col., 1988). En humanos con epilepsia del lóbulo temporal, se ha observado que en el hipocampo se produce un incremento en el pegado de [¹²⁵I-VIP],

principalmente en la capa del giro dentado con niveles bajos en los campos de los cuernos de Ammon. Estos resultados indican que posiblemente dicho aumento en el número de receptores en el foco epiléptico sea relacionado con la magnitud de la pérdida de las neuronas principales (neuronas piramidales y células granulares) (Lanerolle y col., 1995).

2.9.4 RECEPTORES

Se ha demostrado que existen 2 receptores para VIP: VIP₁ y VIP₂ (Lutz y col., 1993). El receptor conocido como VIP₁ se localiza en el pulmón, el intestino y en ciertas regiones del cerebro, tales como, la corteza (en las capas III y IV), el amígdala, el hipocampo (giro dentado y en los campos CA1-CA3) y el bulbo olfatorio (capa plexiforme externa) (Staun- Olsen y col., 1986). El receptor VIP₂, ha sido también localizado en la corteza (capa VI) y bulbo olfatorio (capa granular interna). Además, ha sido localizado en el tálamo (cuerpo geniculado lateral y núcleos anteroventrales), el núcleo supraquiasmático y el hipotálamo (De Souza y col., 1985; Besson, 1988), así como en el tallo cerebral, donde se ha observado que las mayores densidades se distribuyen preferencialmente en el LC, área postrema, en los órganos subcomisurales y en la capa subependimal de los ventrículos (Martin y col., 1987). La distribución de los sitios de pegado del VIP en el SNC, ha sido determinado por autorradiografía, y es consistente con las distribuciones del RNA mensajero para los dos receptores de VIP (Usdin y col., 1994).

La caracterización y distribución de los sitios de pegado del VIP han sido también investigados en el cerebro humano donde se ha observado que con la edad existen diferencias en las densidades de los sitios de unión del VIP, de tal forma que en el cerebro adulto, el AP y los núcleos hipotalámicos anterior, ventral, posterior y supramamilar presentan un incremento en la densidad de receptores del VIP, en relación a los cerebros de neonatos e infantes. Aunque en el hipotálamo mediobasal no se registraron cambios (Sarrleau y col., 1994).

Ambos receptores de VIP están positivamente acoplados a la adenilato ciclasa (Gozes y Breneman, 1989), lo cuál produce un incremento en la producción de AMPc intracelular. El VIP también incrementa el calcio intracelular (Wahl y col., 1993) y el inositol trifosfato (IP₃) (Auidigier

y col., 1986). El receptor para VIP₁ ha sido caracterizado en diversos tejidos y líneas celulares. Se ha evidenciado que es una glicoproteína con un peso molecular de 46 a 73 k Da, y constituye un miembro de una nueva familia de receptores asociados a las proteínas G, a las cuales pertenecen también la calcitonina, la hormona paratiroidea y la secretina (Harmar y Lutz, 1994), dependiendo del tejido y la especie (Laburthe y Couvineua, 1988). El pegado del VIP a su receptor es modulado por proteínas G y fosfolípidos (Paul y Said, 1987). Asimismo, se ha evidenciado que el VIP, es rápidamente internalizado por endocitosis después de pegarse a la superficie del receptor y que el VIP en relativamente altas concentraciones, incrementa la hidrólisis de fosfoinosítidos a inositol trifosfato (IP3) incrementando la movilización de Ca²⁺.

La liberación del VIP en cortes neocorticales, puede provocarse a través de estímulos despolarizantes de una manera dependiente de Ca²⁺. El K⁺ también produce una liberación de VIP y esta liberación es insensible a bloqueadores de canales de Ca²⁺, tales como las dihidropiridinas. El VIP también puede ser liberado por la 4-aminopiridina. Dicha liberación es de naturaleza transináptica, dado que es sensible a la tetrodotoxina, aún más este involucra la formación de metabolitos del ácido araquidónico, vía lipoxigenasa. Estas observaciones sugieren que la 4-aminopiridina provoca la liberación de uno ó más neurotransmisores, el cual a su vez modula la liberación de VIP, vía la cascada de ácido araquidónico (Magistretti, 1990).

Estudios *in vivo* en la neocorteza del gato indican que la liberación de VIP es regulada por varios sistemas de neurotransmisores. El GABA y la NE (vía los α -2 adrenoceptores) inhiben su liberación, mientras que agonistas colinérgicos y el glutamato estimulan la liberación de VIP (Harty y col., 1986).

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

2.9.5 INTERACCION VIP - ACh.

En el caso de la ACh, se ha mostrado que existe una fuerte interacción entre el VIP y la ACh. Se ha observado que el 80 % de las neuronas colinérgicas de la corteza liberan VIP (Peters y

Harriman, 1988). Asimismo, el VIP aparentemente facilita la actividad de la ACh para liberar saliva de la glándula submaxilar del gato (Lundberg y col., 1982) ó catecolaminas de la médula suprarrenal (Malhotra y col., 1988), para despolarizar neuronas del ganglio vesical de gato (Kawatani y col., 1985) y del ganglio mesentérico de cobayo (Mo y Dun, 1984). Aún más, el VIP aumenta la actividad de la CAT, sugiriendo que facilita la síntesis de ACh, en el hipotálamo y el hipocampo (Luine y col., 1984). El VIP también está presente en estructuras donde se localizan neuronas inmunorreactivas para colina acetil transferasa, tales como el hipocampo, así como en áreas del tallo cerebral que reciben proyecciones del sistema tegmental mesopontino (Woolf y Batcher, 1989). También aumenta la unión de ACh a los receptores muscarínicos y modula su liberación (Lundberg, 1982) y el recambio (Eva y col., 1985) de ACh. Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que agonistas colinérgicos y el glutamato estimulan la liberación de VIP en la neocorteza del gato (Wang y col., 1983). En forma correspondiente, la ACh facilita la liberación de VIP al LCR de una manera dependiente de la dosis (Kaji y col., 1983). Estos hallazgos sugieren una estrecha relación, entre la ACh y el VIP.

RECAPITULACION

A partir de la información revisada hasta aquí podemos sugerir que el sueño está modulado por un sistema complejo, altamente organizado de naturaleza neurohumoral. En la facilitación del sueño parece intervenir un sistema hormonal en el que destaca el VIP y otros péptidos cuya oscilación actividad-inactividad depende de estructuras que regulan los ritmos circádicos. Dicha actividad a su vez también facilitaría la síntesis de otros neuropéptidos, que actuarían como factores inductores, para que se presentara el SOL y/o el sueño MOR. Estos probablemente inciden sobre la actividad de diversos sistemas de neurotransmisores, los que se encargarían de modular la duración de las fases. En particular, creemos que el VIP es un neuropéptido con propiedades inductoras de sueño MOR, y que su mecanismo de acción para la inducción de sueño depende probablemente de su capacidad para incrementar los niveles de excitabilidad de ciertos núcleos cerebrales y estimular cascadas de eventos secundarios, para que en consecuencia se presente el sueño.

2.10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diferentes trabajos indican que durante la fase de recuperación, post-privación, ocurre un rebote de sueño en la rata, gato y humano (Borbély y Tobler, 1989). Asimismo, se ha demostrado que la administración de LCR de animales PS a animales normales induce sueño o bien revierte parcialmente el insomnio farmacológico inducido por la PCPA y el propranolol ((Sallanon y col., 1982; Prospero-García y col., 1988; Adrien y Dugovic, 1984). Estos resultados sugirieron la posibilidad de que diversas sustancias podían acumularse en el LCR de los animales PSMOR. En este sentido se ha demostrado, que el VIP induce sueño MOR en condiciones normales y de insomnio, en gatos (Drucker-Colín y col., 1984; Prospero-García y col., 1986;1993), ratas (Riou y col., 1982; Obál y col., 1988) y conejos (Obál y col., 1989). Asimismo, se ha observado que el bloqueo de sus receptores mediante un antagonista competitivo disminuye la cantidad de sueño MOR (Mirmiran y col., 1989). Además, hemos demostrado que el VIP se acumula en el LCR de animales PSMOR y las propiedades inductoras de sueño del LCR disminuyen cuando este es incubado con anticuerpos anti-VIP (Drucker-Colín y col., 1989; Jiménez-Angulano y col., 1993).

Estas evidencias indicaron que el VIP es posiblemente una sustancia inductora de sueño MOR involucrada en la regulación de sueño MOR en condiciones normales y en el rebote de sueño, posterior a la PSMOR. Recientemente, sin embargo, ha sido reportado que los niveles de este neuropéptido medidos por radiolnmuensayo (RIA) no cambian durante la PSMOR en diversas estructuras cerebrales (Morin y col., 1992). No obstante, tal incapacidad para detectar VIP por RIA en algunos núcleos posterior a la PSMOR, pudiera estar relacionada con el hecho de que a períodos cortos de exposición al VIP, ocurre una internalización del complejo péptido-receptor dentro de vesículas endosomales con una vida media de minutos. Si este fuera el caso, el RIA, no es una técnica apropiada para medir los niveles del VIP. Por lo que sería necesario utilizar otros métodos que más eficientemente determinen cuando en el cerebro, la PSMOR produce cambios en la actividad relacionada con el VIP. Con base en estas evidencias el objetivo del experimento 1 fue, determinar por autorradiografía la densidad de receptores a VIP en el diencéfalo y tallo cerebral de ratas PSMOR por 24 y 72 horas. Adicionalmente, se ha reportado

que el rebote de sueño MOR, esta asociado no solamente a la PSMOR sino también a un componente de estrés. Con base en estas evidencias, en el experimento 2 decidimos entonces habitar a los animales al método de privación durante 2 horas diarias mediante la utilización de plataformas grandes, para después determinar la densidad de receptores a VIP por autorradiografía en diversos núcleos cerebrales involucrados con la regulación del sueño MOR.

3-. ARTICULO ANEXO



ELSEVIER



BIENESTAR BIBLIOTECA DE INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.

BRAIN
RESEARCH

Brain Research 728 (1996) 37-46

Research report

Brain distribution of vasoactive intestinal peptide receptors following REM sleep deprivation

Anabel Jiménez-Anguiano^a, Fabio García-García^b, José Luis Mendoza-Ramírez^b,
Adalberto Durán-Vázquez^b, René Drucker-Colín^{a,b,*}

^a Depto. de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

^b Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, México D.F., México

Accepted 19 March 1996

Abstract

Vasoactive intestinal peptide (VIP) has been shown to increase rapid eye movement (REM) sleep in normal and insomniac animals, while the administration of anti-VIP antibodies or an antagonist of VIP receptors decreases REM sleep. In addition, recently, it has been suggested that a VIP-like substance accumulates in the CSF during waking and that it may be involved in the production of the REM rebound normally seen following REM sleep deprivation. This evidence suggests that VIP may be important in modulating REM sleep in normal conditions and during REM sleep rebound. To determine whether VIP is involved in REM sleep homeostasis, VIP receptors of discrete brain areas was determined by autoradiography after 24 and 72 h of REM sleep deprivation (REM SD) by the water tank technique. Since this procedure has been suggested to produce some stress, an additional group adapted for 7 days to the sleep deprivation situation was tested. The results showed that REM SD produces an increase in the density of VIP receptors in several brainstem and forebrain structures at 24 h of REM SD and more so at 72 h of REM SD. Interestingly, results showed that habituation to the REM SD procedure decreases the density of VIP receptors in some areas of the brain of the REM sleep-deprived rats. The results are discussed in terms of the possibility that waking induces an increase of VIP receptors in several structures, which in turn are responsible for modulating REM sleep, but that stress contributes in part to VIP receptor changes.

Keywords: Vasoactive intestinal peptide; VIP receptor; REM sleep deprivation; Stress; Brainstem; Diencephalon

1. Introduction

Several endogenous sleep-promoting substances have been proposed to influence sleep. Nevertheless, most such substances seem to preferentially affect slow-wave-sleep, with little, if any, effects on rapid-eye-movement (REM) sleep [4,17,45]. In the past few years, it has been reported through different studies that intracerebroventricular (i.c.v.) administration of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) induces REM sleep in normal [8,30,32,33] and insomniac animals [36,37,40], and that this effect is independent of temperature [31]. Furthermore, it has been shown that endogenous cerebral VIP could be involved in the induction of REM sleep, since i.c.v. administration of anti-VIP antibodies [40] or of (4 Cl-D-Phe-Leu) VIP, an antagonist of VIP receptors, blocks REM sleep [27]. In addition, it

has been shown that cerebrospinal fluid (CSF) obtained from REM sleep-deprived (REM SD) cats, as well as VIP, induce REM sleep when administered i.c.v. to parachlorophenylalanine (PCPA) insomniac animals [36]. Moreover, the administration of such CSF incubated with VIP antibodies prevents this CSF from inducing REM sleep [9]. These results have led to the suggestion that one of the possible CSF hypnogenic factors could be a VIP-like substance [9,21]. Subsequently, it has been demonstrated that a VIP-like substance accumulates in the cerebrospinal fluid (CSF) during prolonged wakefulness and that this substance may be involved in regulating the REM rebound which occurs after REM SD [18]. The findings summarized above indicate that VIP qualifies as a REM-promoting factor involved in the normal regulation of REM sleep and in its recovery after its deprivation. Interestingly, although co-existence of VIP with serotonin and acetylcholine has been reported [22,24,34,44], it appears that none of these transmitter systems are involved in the mediation of the effects of VIP on REM sleep, since VIP

* Corresponding author. Fax: +525 623-2241; e-mail: drucker@servidor.unam.mx

administered in combination with atropine still increases REM sleep in PCPA-pretreated animals [37]. These results clearly suggest that VIP may be essential in producing and maintaining REM sleep and that prolonged wakefulness induces an accumulation of VIP in the brain. Recently, however, it was reported that REM SD does not induce radioimmunoassayable VIP increases in any of a number of brain structures [28]. However, the inability to detect VIP by radioimmunoassay (RIA) in brain tissue after REM SD could be related to the fact that short-term exposures to VIP results in the internalization of the peptide–receptor complex into clear endosomal vesicles with a half-time of minutes [2]. If this were the case, the RIA would not be an appropriate technique to measure VIP content following REM sleep deprivation. Perhaps it is necessary to use other techniques to more efficiently determine where in the brain REM SD produces changes in VIP-related activity. The purpose of this study, therefore, was to determine with autoradiography, the distribution of VIP receptors throughout the brain, following variable periods of REM sleep deprivation.

2. Materials and methods

Ninety Male Wistar rats (180–200 g) were used in these experiments. All animals were kept on a 12:12 h light/dark cycle. Two different experiments were performed on these animals. In the first one, 60 rats (referred to as non-habituated group) were divided into five groups of 12 subjects as follows: Group 1 were Controls with no manipulations; Groups 2 and 3 were REM SD either for 24 or 72 h by placing them inside a container on a small platform (SP) measuring 4 cm in diameter surrounded by water, and Groups 4 and 5 were placed in the same environment, but on platforms whose diameter was 12 cm (LP) and on which they were easily able to sleep. In the second experiment, 30 rats (referred to as habituated group), were divided into five groups of 6 subjects each, under the same conditions described above, except that before being subjected to REM SD or placed on the large platforms (LP), each animal was habituated to the environment during 7 days by placing them on the LP for 2 h every day. Immediately after the end of the experiments, all animals were decapitated and the brains removed and frozen in isopentane at -30°C . Coronal sections (20 μm) of diencephalon and brainstem were cut in a cryostat, mounted onto gelatin-coated slides and stored at -70°C until used. Slide-mounted brain sections were brought up to room temperature and preincubated in Tris buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, containing 5 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin and 0.1 mM bacitracin). The sections were then incubated for 90 min in Tris buffer containing 100 pM [$^3\text{-iodotyrosyl-}^{125}\text{I}$]VIP (Amersham). Non-specific binding was determined in the presence of 1 μM unlabeled VIP. These experiments were carried out

under equilibrium conditions. Following incubation with [^{125}I]VIP, the tissue sections were washed twice in Tris buffer at 4°C during 5 min and then rinsed in distilled water at 4°C during 5 min for 10 s. The slides were air-dried and stored for 3 h in a desiccator containing silica gel. Autoradiograms were obtained by exposing the slides, together with ^{125}I standards (Microscale, Amersham) to hyperfilm H³ for at least 5 days. The film was then processed with Kodak HC-110 developers and fixers. Finally, the autoradiograms were analyzed with a computerized imaging analysis system (MCID System Imaging Research). Sections which corresponded from bregma to six different anteroposterior levels -10.04 , -9.8 , -9.3 , -5.8 , -3.3 , and -1.4 [35] were analyzed. Within these sections the following 33 structures were separated into two groups; brainstem structures and areas found in the diencephalon and forebrain. The brainstem structures were: subcoeruleus nucleus alpha, laterodorsal tegmental nucleus, raphe pontis nucleus, lateral superior olive, cerebellar lobule 2, choroid plexus of IV ventricle, lateral parabrachial nucleus, locus coeruleus, A5 noradrenaline cells, lateral recess of the IV ventricle, raphe magnus nucleus, posterodorsal tegmental nucleus and lateroventral periolivary nucleus; whereas the diencephalon and forebrain structures were: cortex, suprachiasmatic nucleus, paraventricular thalamic nucleus, anteroventral thalamic nucleus, cingulum, globus pallidus, caudate putamen, field CA1 of Ammon's horn, basolateral amygdaloid nucleus, ventral posterolateral thalamic nucleus, ventral posteromedial thalamic nucleus, entopeduncular nucleus, dentate gyrus, medial geniculate nucleus, central gray medial, raphe rostral, mammillary peduncle, interpeduncular nucleus, hippocampal fissure and superior colliculus [35]. The data obtained were statistically analyzed with a one-way ANOVA and the Fisher test.

3. Results

3.1. Non-habituated

3.1.1. Diencephalon and forebrain

Table 1 summarizes the results obtained from the non-habituated group on VIP receptors density following 24 or 72 h of REM SD. After 24 h of REM SD the structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: suprachiasmatic nucleus ($F = 8.7$; $P < 0.01$), paraventricular thalamic nucleus ($F = 5.9$; $P < 0.01$), anteroventral thalamic nucleus ($F = 4.3$; $P < 0.05$), field CA1 of Ammon's horn ($F = 9.9$; $P < 0.01$), basolateral amygdaloid nucleus ($F = 7.01$; $P < 0.01$), ventral posterolateral thalamic nucleus ($F = 6.5$; $P < 0.05$), ventral posteromedial thalamic nucleus ($F = 11.44$; $P < 0.01$), medial geniculate nucleus ($F = 5.94$; $P < 0.05$), central gray medial ($F = 4.47$; $P < 0.05$), and mammillary peduncle ($F = 4.4$; $P < 0.05$). After 72 h of REM SD the

Table 1
Effects of REM sleep deprivation (REM SD) on the density of VIP-receptors (nCi/mg) in several structures of basal forebrain of non-habituated animals ($n = 12$) ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)

Brain structure	Normal (Group 1)	REM SD 24 h (Group 2)	LP 24 h (Group 4)	REM SD 72 h (Group 3)	LP 72 h (Group 5)
Cortex (Cx)	6.2 \pm 0.5	8.0 \pm 0.9	7.2 \pm 2.0	16.5 \pm 2.3 **	9.0 \pm 1.4
Suprachiasmatic nucleus (SCN)	7.2 \pm 0.8	13.4 \pm 1.3 **	9.6 \pm 1.3	17.6 \pm 1.5 **	7.8 \pm 1.3
Paraventricular thalamic nucleus (PVA)	5.4 \pm 0.4	10.5 \pm 1.1 **	9.3 \pm 0.7 *	13.7 \pm 1.2 *	8.3 \pm 1.5
Anteroventral thalamic nucleus (AVDM)	6.7 \pm 0.8	13.1 \pm 3.1 *	8.5 \pm 1.2	14.3 \pm 1.1 *	9.3 \pm 2.1
Cingulum (Cg)	6.6 \pm 1.2	9.7 \pm 2.5	9.1 \pm 2.1	10.3 \pm 3.6	8.3 \pm 2.0
Globus pallidus (GP)	3.8 \pm 0.2	3.7 \pm 0.7	2.6 \pm 0.3	4.4 \pm 0.1	4.4 \pm 0.8
Caudate putamen (CPa)	3.5 \pm 0.5	5.4 \pm 1.3	5.7 \pm 1.1	5.8 \pm 1.1	5.3 \pm 1.1
Field CA1 of Ammon's horn (CA1)	7.3 \pm 1.5	17.7 \pm 2.2 **	11.1 \pm 1.5	16.1 \pm 1.4 **	7.2 \pm 0.3
Basolateral amygdaloid nucleus (BLA)	9.2 \pm 1.1	27.6 \pm 5.2 **	9.1 \pm 1.4	27.1 \pm 6.2 **	9.2 \pm 1.2
Ventral posterolateral thalamic nucleus (VPL)	7.0 \pm 0.6	14.4 \pm 2.6 *	7.5 \pm 1.1	23.3 \pm 4.4 **	7.7 \pm 0.9
Ventral posteromedial thalamic nucleus (VPM)	8.4 \pm 1.0	29.4 \pm 5.0 **	13.3 \pm 2.8	32.7 \pm 4.5 **	11.1 \pm 1.1
Entopeduncular nucleus (EP)	7.8 \pm 1.0	13.5 \pm 2.2	6.0 \pm 0.8	0.2 \pm 2.0	7.7 \pm 0.7
Dentate gyrus (DG)	5.4 \pm 0.4	8.8 \pm 0.8	6.7 \pm 1.4	8.7 \pm 0.7	8.1 \pm 0.6
Medial geniculate nucleus (MGM)	12.5 \pm 4.3	25.6 \pm 6.8 *	17.4 \pm 1.8	25.2 \pm 4.5 *	12.2 \pm 3.6
Central gray medial (CGM)	10.9 \pm 1.5	22.6 \pm 5.4 *	11.8 \pm 1.6	18.2 \pm 2.5 *	9.7 \pm 1.4
Raphe rostral (RLi)	18.8 \pm 4.1	23.0 \pm 4.5	15.7 \pm 2.4	32.3 \pm 6.4 *	19.9 \pm 1.5
Mammillary peduncle (MP)	7.5 \pm 2.3	15.5 \pm 3.3 *	7.2 \pm 3.4	13.3 \pm 5.5	6.1 \pm 2.5
Interpeduncular nucleus (IP)	16.3 \pm 2.8	21.2 \pm 4.6	13.4 \pm 2.2	22.0 \pm 4.6	14.0 \pm 2.1
Hippocampal fissure (Hif)	19.2 \pm 4.0	20.6 \pm 4.4	14.5 \pm 2.0	23.6 \pm 5.0	16.0 \pm 2.2
Superior colliculus (SC)	11.5 \pm 1.6	14.8 \pm 3.8	12.1 \pm 1.2	14.0 \pm 3.3	9.2 \pm 1.1

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: cortex ($F = 6.94$; $P < 0.01$), suprachiasmatic nucleus ($F = 8.7$; $P < 0.001$), paraventricular thalamic nucleus ($F = 5.9$; $P < 0.05$), anteroventral thalamic nucleus ($F = 4.3$; $P < 0.05$), field CA1 of Ammon's horn ($F = 9.9$; $P < 0.01$), basolateral amygdaloid nucleus ($F = 7.01$; $P < 0.01$), ventral posterolateral thalamic nucleus ($F = 8.49$; $P < 0.01$), ventral posteromedial thalamic nucleus ($F = 11.44$; $P < 0.01$), medial geniculate nucleus ($F = 5.94$; $P < 0.05$), central gray medial ($F = 4.47$; $P < 0.05$) and raphe rostral ($F = 4.99$;

$P < 0.05$). Only one structure, the cortex, showed differences at 72 h of REM SD without having effects at 24 h of REM SD. Similarly, only two structures, central gray medial and mammillary peduncle, showed increases at 24 h but not at 72 h of REM SD. Interestingly, not one structure showed greater increases at 72 h of REM SD, when they already had effects at 24 h. In contrast, no significant differences were observed in any of the structures analyzed when animals were placed on LP either for 24 and 72 h, except for the paraventricular thalamic nucleus after 24 h ($P < 0.05$).

Table 2
Effects of REM sleep deprivation (REM SD) on the density of VIP-receptors (nCi/mg) in several structures of brainstem of non-habituated animals ($n = 12$) ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)

Brain structure	Normal (Group 1)	REM SD 24 h (Group 2)	LP 24 h (Group 4)	REM SD 72 h (Group 3)	LP 72 h (Group 5)
Subcoeruleus nucleus alpha (SubCA)	15.3 \pm 1.0	19.4 \pm 2.0	13.5 \pm 0.9	23.5 \pm 3.0 **	12.8 \pm 0.7
Laterodorsal tegmental nucleus (LDTg)	13.2 \pm 2.6	19.4 \pm 2.2 *	12.5 \pm 2.8	22.8 \pm 5.1 **	11.4 \pm 1.5
Raphe pontis nucleus (RPh)	16.3 \pm 4.2	20.5 \pm 4.5	16.6 \pm 2.0	24.6 \pm 4.2 *	12.4 \pm 2.3
Lateral superior olive (LSO)	24.2 \pm 4.6	29.4 \pm 4.2 *	23.5 \pm 2.8	28.8 \pm 5.1 *	19.4 \pm 3.5
Cerebellar lobule 2 (CbL 2)	14.6 \pm 3.3	20.0 \pm 4.7	14.4 \pm 1.8	24.0 \pm 3.6 **	18.8 \pm 4.3
Choroid plexus of IV ventricle (IV V)	15.4 \pm 2.1	22.2 \pm 3.3 *	15.0 \pm 1.8	24.0 \pm 3.4 *	15.2 \pm 2.0
Lateral parabrachial nucleus (LPB)	16.5 \pm 1.8	17.8 \pm 0.8	17.2 \pm 1.6	22.0 \pm 1.5 *	17.0 \pm 0.6
Locus coeruleus (LC)	12.7 \pm 1.1	14.3 \pm 1.6	14.0 \pm 1.2	18.5 \pm 1.0 *	13.4 \pm 3.3
A5 Noradrenaline cells (A5)	9.1 \pm 0.3	15.7 \pm 1.5 *	9.5 \pm 0.4	20.3 \pm 3.4 **	10.2 \pm 0.5
Lateral recess of 4th ventricle (LR)	14.0 \pm 1.8	16.0 \pm 1.3	13.5 \pm 1.7	18.8 \pm 1.3 *	12.5 \pm 1.6
Raphe magnus nucleus (RMg)	11.6 \pm 0.6	11.0 \pm 0.9	10.1 \pm 0.5	20.6 \pm 2.2 **	13.3 \pm 0.7
Posterodorsal tegmental nucleus (PDTg)	11.5 \pm 0.4	14.1 \pm 0.6	11.7 \pm 0.3	16.4 \pm 2.0 **	10.4 \pm 0.8
Anteroventral periventricular nucleus (LVPV)	17.4 \pm 2.5	14.5 \pm 1.1	13.3 \pm 0.8	22.2 \pm 4.0	14.5 \pm 0.5

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Table 3
Effects of REM sleep deprivation (REM SD) on the density of VIP-receptors (nCi/mg) in several structures of basal forebrain of habituated animals ($n = 6$) ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)

Brain structure	Normal (Group 1)	REM SD 24 h (Group 2)	LP 24 h (Group 4)	REM SD 72 h (Group 3)	LP 72 h (Group 5)
Cortex (Cx)	7.6 ± 1.3	16.8 ± 0.6 **	6.8 ± 0.5	19.0 ± 0.5 **	4.5 ± 0.3
Suprachiasmatic nucleus (SCN)	5.8 ± 0.5	9.0 ± 0.7 **	5.7 ± 0.4	14.2 ± 1.0 **	4.1 ± 0.2
Paraventricular thalamic nucleus (PVA)	4.1 ± 0.5	5.2 ± 0.3	4.0 ± 0.3	11.3 ± 1.2 **	3.5 ± 0.4
Anteroventral thalamic nucleus (AVDM)	4.7 ± 4.0	9.5 ± 1.3 **	7.0 ± 0.2	11.7 ± 1.6 **	3.7 ± 0.4
Cingulum (Cg)	3.0 ± 0.3	4.2 ± 0.8	4.1 ± 0.3	4.6 ± 0.8	3.5 ± 0.3
Globus pallidus (GP)	2.7 ± 0.2	3.3 ± 0.5	2.4 ± 0.2	2.8 ± 0.4	2.7 ± 0.2
Caudate putamen (CPu)	2.8 ± 0.2	3.4 ± 0.3	2.2 ± 0.1	3.0 ± 0.4	2.2 ± 0.4
Field CA1 of Ammon's horn (CA1)	3.6 ± 0.7	9.7 ± 2.3 **	3.0 ± 0.4	8.8 ± 1.4 **	3.8 ± 0.3
Basolateral amygdaloid nucleus (BLA)	3.8 ± 0.6	7.8 ± 0.3 **	2.5 ± 0.2	8.8 ± 1.6 **	4.4 ± 0.5
Ventral posterolateral thalamic nucleus (VPL)	4.3 ± 0.7	10.6 ± 2.0 **	5.0 ± 0.6	11.3 ± 2.0 **	4.8 ± 1.1
Ventral posteromedial thalamic nucleus (VPM)	15.0 ± 0.9	20.2 ± 0.9 **	14.0 ± 0.8	19.8 ± 1.1 **	13.5 ± 0.4
Entopeduncular nucleus (EP)	8.3 ± 0.8	10.5 ± 2.0	6.2 ± 0.5	10.3 ± 1.5	7.8 ± 0.5
Dentate gyrus (DG)	3.4 ± 0.5	5.0 ± 0.8	3.8 ± 0.4	5.5 ± 0.8	5.0 ± 0.4
Medial geniculate nucleus (MGM)	10.7 ± 1.2	22.1 ± 5.6 *	11.5 ± 1.6	16.3 ± 1.0 *	11.6 ± 1.4
Central gray medial (CGM)	6.2 ± 0.6	12.1 ± 2.6 *	5.3 ± 0.4	11.1 ± 1.5 *	5.5 ± 0.1
Raphe rostral (RLi)	6.3 ± 0.3	10.4 ± 1.6 **	6.4 ± 1.1	12.4 ± 0.6 **	5.5 ± 0.7
Mammillary peduncle (MP)	5.4 ± 0.6	10.8 ± 2.7 *	7.4 ± 1.3	10.0 ± 0.7 **	5.4 ± 1.2
Interpeduncular nucleus (IP)	7.1 ± 0.8	11.4 ± 2.7	7.1 ± 1.2	11.6 ± 0.8	5.2 ± 0.8
Hippocampal fissure (Hif)	8.0 ± 0.8	11.1 ± 2.0	5.7 ± 0.6	8.3 ± 0.4	5.3 ± 0.6
Superior colliculus (SC)	8.7 ± 0.9	10.5 ± 2.0	7.6 ± 1.0	9.2 ± 1.0	7.3 ± 2.0

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

3.1.2. Brainstem

Table 2 summarizes the results obtained from the non-habituated group on VIP receptors density following 24 or 72 h of REM SD. After 24 h of REM SD the structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: laterodorsal tegmental nucleus ($F = 5.52$; $P < 0.05$), lateral superior olive ($F = 5.17$; $P < 0.05$), choroid plexus of IV ventricle ($F = 4.64$; $P < 0.05$), and A5 noradrenaline cells ($F = 5.1$; $P < 0.05$). After 72 h of REM SD the structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: subcoeruleus nucleus alpha ($F = 4.02$; $P < 0.01$), laterodorsal tegmental

nucleus ($F = 6.64$; $P < 0.01$), choroid plexus of IV ventricle ($F = 4.64$; $P < 0.05$), lateral parabrachial nucleus ($F = 5.64$; $P < 0.01$), locus coeruleus ($F = 5.26$; $P < 0.05$), A5 noradrenaline cells ($F = 8.03$; $P < 0.01$), raphe magnus nucleus ($F = 13.3$; $P < 0.01$), posterodorsal tegmental nucleus ($F = 7.93$; $P < 0.01$), raphe pontis nucleus ($F = 5.64$; $P < 0.05$), cerebellar lobule 2 ($F = 5.79$; $P < 0.01$), lateral superior olive ($F = 5.17$; $P < 0.05$), and lateral recess of IV ventricle ($F = 4.52$; $P < 0.05$). Only eight structures, Subcoeruleus nucleus alpha, Raphe pontis nucleus, cerebellar lobule 2, lateral parabrachial nucleus, locus coeruleus, lateral recess of IV ventricle, raphe mag-

Table 4
Effects of REM sleep deprivation (REM SD) on the density of VIP-receptors (nCi/mg) in several structures of brainstem of habituated animals ($n = 6$) ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)

Brain structure	Normal (Group 1)	REM SD 24 h (Group 2)	LP 24 h (Group 4)	REM SD 72 h (Group 3)	LP 72 h (Group 5)
Subcoeruleus nucleus alpha (SubCA)	21.5 ± 0.4	24.1 ± 0.6	21.8 ± 0.3	26.4 ± 2.0 **	20.4 ± 0.8
Laterodorsal tegmental nucleus (LDTg)	16.4 ± 0.3	18.7 ± 1.6	16.1 ± 0.4	24.3 ± 0.1 **	13.8 ± 0.7
Raphe pontis nucleus (RPN)	20.8 ± 0.2	24.3 ± 1.0	22.2 ± 0.2	26.2 ± 1.8 **	20.3 ± 0.9
Lateral superior olive (LSO)	10.0 ± 0.3	13.7 ± 2.0	9.5 ± 0.5	13.0 ± 0.9	9.6 ± 0.7
Cerebellar lobule 2 (CbL 2)	11.2 ± 0.3	15.0 ± 1.8 *	11.1 ± 0.4	16.0 ± 1.7 *	12.0 ± 0.8
Choroid plexus of IV ventricle (IV V)	17.5 ± 0.4	19.2 ± 0.8	17.1 ± 0.4	20.2 ± 0.5 *	17.8 ± 0.6
Lateral parabrachial nucleus (LPB)	10.3 ± 0.7	16.1 ± 2.0 **	10.5 ± 0.8	18.3 ± 1.0 **	11.8 ± 0.6
Locus coeruleus (LC)	9.1 ± 0.4	12.7 ± 1.6	7.3 ± 0.4	14.1 ± 0.4 *	9.8 ± 0.7
A5 Noradrenaline cells (A5)	14.0 ± 1.8	16.0 ± 1.4	13.5 ± 1.8	18.8 ± 1.3 *	12.5 ± 1.6
Lateral recess of 4th ventricle (LR)	9.0 ± 0.4	10.2 ± 0.8	7.2 ± 0.4	10.2 ± 0.6	8.7 ± 0.6
Raphe magnus nucleus (RMg)	11.6 ± 0.7	11.0 ± 0.9	10.1 ± 0.5	20.6 ± 2.2 **	13.3 ± 0.7
Posterodorsal tegmental nucleus (PDTg)	14.2 ± 1.1	16.0 ± 0.6	13.8 ± 0.7	18.7 ± 2.8 **	13.1 ± 0.8
Lateroventral periolivary nucleus (LVPO)	18.7 ± 2.1	14.6 ± 1.1	13.3 ± 0.8	20.2 ± 3.0	14.5 ± 0.5

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

nus nucleus and Posterodorsal tegmental nucleus showed differences at 72 h of REM SD without having effects at 24 h of REM SD. Here again, no structure showed greater increases at 72 h of REM SD when effects were already seen at 24 h. Equally, no significant differences were observed in any of the structures analyzed, when animals were placed on LP either for 24 and 72 h.

3.2. Habituated

3.2.1. Diencephalon and forebrain

Table 3 summarizes the results obtained from the habituated group on VIP receptors density following 24 or 72 h of REM SD. After 24 h of REM SD the structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: cortex ($F = 9.8$; $P < 0.01$), suprachiasmatic nucleus ($F = 8.2$; $P < 0.01$), anteroventral thalamic nucleus ($F = 5.85$; $P < 0.05$), field CA1 of Ammon's horn ($F = 6.03$; $P < 0.01$), basolateral amygdaloid nucleus ($F = 10.9$; $P < 0.01$), ventral posterolateral thalamic nucleus ($F = 5.65$; $P < 0.01$), ventral posteromedial thalamic nucleus ($F = 5.85$; $P < 0.01$), medial geniculate nucleus ($F = 4.94$; $P < 0.05$), central gray medial ($F = 4.82$; $P < 0.05$), raphe rostral ($F = 9.37$; $P < 0.01$), and mammillary peduncle ($F = 4.72$; $P < 0.05$). After 72 h of REM SD the structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: cortex ($F = 9.8$; $P < 0.001$), suprachiasmatic nucleus ($F = 8.2$; $P < 0.01$), paraventricular thalamic nucleus ($F = 4.7$; $P < 0.01$), anteroventral thalamic nucleus ($F = 5.85$; $P < 0.05$), field CA1 of Ammon's horn ($F = 6.03$; $P < 0.01$), basolateral amygdaloid nucleus ($F = 10.9$; $P < 0.01$), ventral posterolateral thalamic nucleus ($F = 5.65$; $P < 0.01$), ventral posteromedial thalamic nucleus ($F = 5.85$; $P < 0.01$), medial geniculate nucleus ($F = 4.94$; $P < 0.05$), central gray medial ($F = 5.2$; $P < 0.01$), raphe rostral ($F = 9.37$; $P < 0.05$) and mammillary peduncle ($F = 5.72$; $P < 0.01$). Here, only one structure, the paraventricular thalamic nucleus, showed

increases in receptor density as compared to controls were: cortex ($F = 9.8$; $P < 0.001$), suprachiasmatic nucleus ($F = 8.2$; $P < 0.01$), paraventricular thalamic nucleus ($F = 4.7$; $P < 0.01$), anteroventral thalamic nucleus ($F = 5.85$; $P < 0.05$), field CA1 of Ammon's horn ($F = 6.03$; $P < 0.01$), basolateral amygdaloid nucleus ($F = 10.9$; $P < 0.01$), ventral posterolateral thalamic nucleus ($F = 5.65$; $P < 0.01$), ventral posteromedial thalamic nucleus ($F = 5.85$; $P < 0.01$), medial geniculate nucleus ($F = 4.94$; $P < 0.05$), central gray medial ($F = 5.2$; $P < 0.01$), raphe rostral ($F = 9.37$; $P < 0.05$) and mammillary peduncle ($F = 5.72$; $P < 0.01$). Here, only one structure, the paraventricular thalamic nucleus, showed

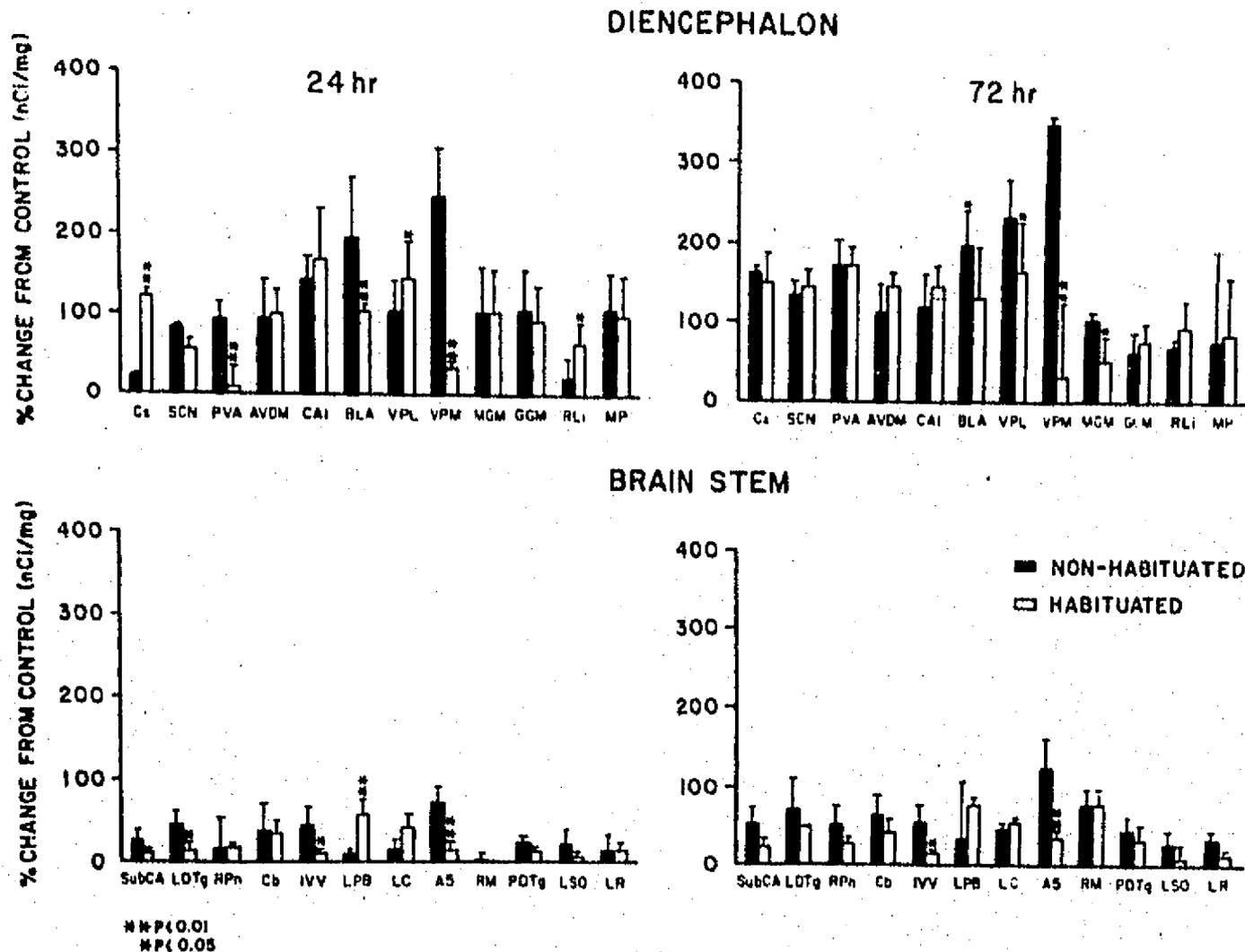


Fig. 1. This bar graph illustrates the effects of REM SD on VIP receptors in diencephalic and brainstem structures through a comparison between non-habituated and habituated animals. Note that at 24 h of REM SD the habituated group showed increases of VIP receptor density in structures such as Cx, VPL, RLi and LPB, whereas the PVA, BLA, VPM, LDTg and A5 showed decreases. On the other hand, at 72 h of REM SD there were only decreases in VIP receptor density in structures such as BLA, VPL, VPM, MGM, IV V and A5. * $P < 0.01$, * $P < 0.05$. See text for more extended description.

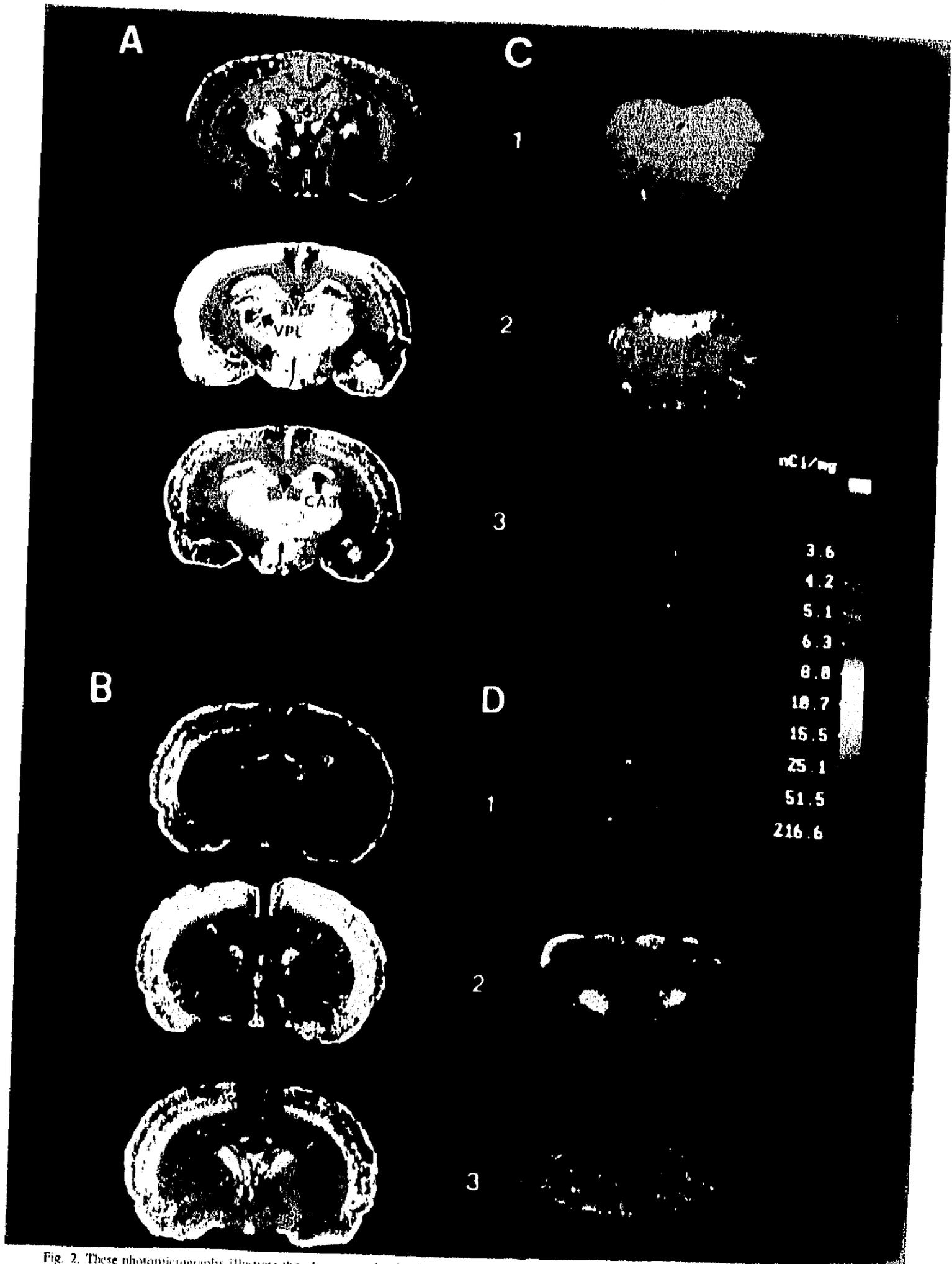


Fig. 2. These photomicrographs illustrate the changes in the density of VIP receptors after 72 h of REM SD in diencephalic and brain stem structures, between non-habituated and habituated animals. Note that at 72 h of REM SD the non-habituated group (A, B, C and D2) showed increases of VIP receptor density in structures such as VPL, CA3, SCN, CX, BLA, AS, LC, TPB and TRG (arrow), whereas the habituated group showed decreases (A, B, C and D3). The micrographs of A, B, C and D0 represent a normal control with no manipulation.

differences at 72 h of REM SD without having effects at 24 h of REM SD. Again, no structure showed greater increases at 72 h of REM SD when effects were already seen at 24 h. As before, no significant differences were observed in any of the structures analyzed when animals were placed on LP either for 24 and 72 h.

3.2.2. Brainstem

Table 4 summarizes the results obtained from the habituated group on VIP receptors density following 24 or 72 h of REM SD. After 24 h of REM SD the structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: cerebellar lobule 2 ($F = 4.42$; $P < 0.05$) and lateral parabrachial nucleus ($F = 9.7$; $P < 0.05$). After 72 h of REM SD the structures that presented increases in receptor density as compared to controls were: subcoeruleus nucleus alpha ($F = 6.33$; $P < 0.01$), laterodorsal tegmental nucleus ($F = 12.23$; $P < 0.01$), raphe pontis nucleus ($F = 13.3$; $P < 0.01$), cerebellar lobule 2 ($F = 4.42$; $P < 0.05$), choroid plexus of IV ventricle ($F = 5.6$; $P < 0.05$), lateral parabrachial nucleus ($F = 9.7$; $P < 0.01$), locus coeruleus ($F = 8.04$; $P < 0.05$), A5 noradrenaline cells ($F = 6.64$; $P < 0.05$), raphe magnus nucleus ($F = 6.54$; $P < 0.01$) and posterodorsal tegmental nucleus ($F = 5.62$; $P < 0.01$). Only eight structures, subcoeruleus nu-

cleus alpha, laterodorsal tegmental nucleus, raphe pontis nucleus, cerebellar lobule 2, choroid plexus of IV ventricle, locus coeruleus, A5 noradrenaline cells, raphe magnus nucleus and posterodorsal tegmental nucleus showed differences at 72 h of REM SD without having effects at 24 h of REM SD. In addition again, no structure showed greater increases at 72 h of REM SD when already having effects at 24 h. No differences were observed in any of the structures analyzed when animals were placed on LP either for 24 and 72 h.

3.3. Habituated vs. non-habituated diencephalon

In Fig. 1 comparison between the two experimental groups showed that at 24 h of REM SD, the cortex ($F = 10.4$; $P < 0.01$), the ventral posterolateral thalamic nucleus ($F = 5.2$; $P < 0.05$) and the raphe rostral ($F = 6.6$; $P < 0.05$) increased VIP receptor density following habituation while the paraventricular thalamic nucleus ($F = 9.8$; $P < 0.01$), the basolateral amygdaloid nucleus ($F = 8.3$; $P < 0.01$) and the ventral posteromedial thalamic nucleus ($F = 15.0$; $P < 0.01$) showed decreases. However, at 72 h there were only decreases in VIP receptor density which recurred in the basolateral amygdaloid nucleus ($F = 6.2$; $P < 0.05$), the ventral posterolateral thalamic nucleus ($F =$

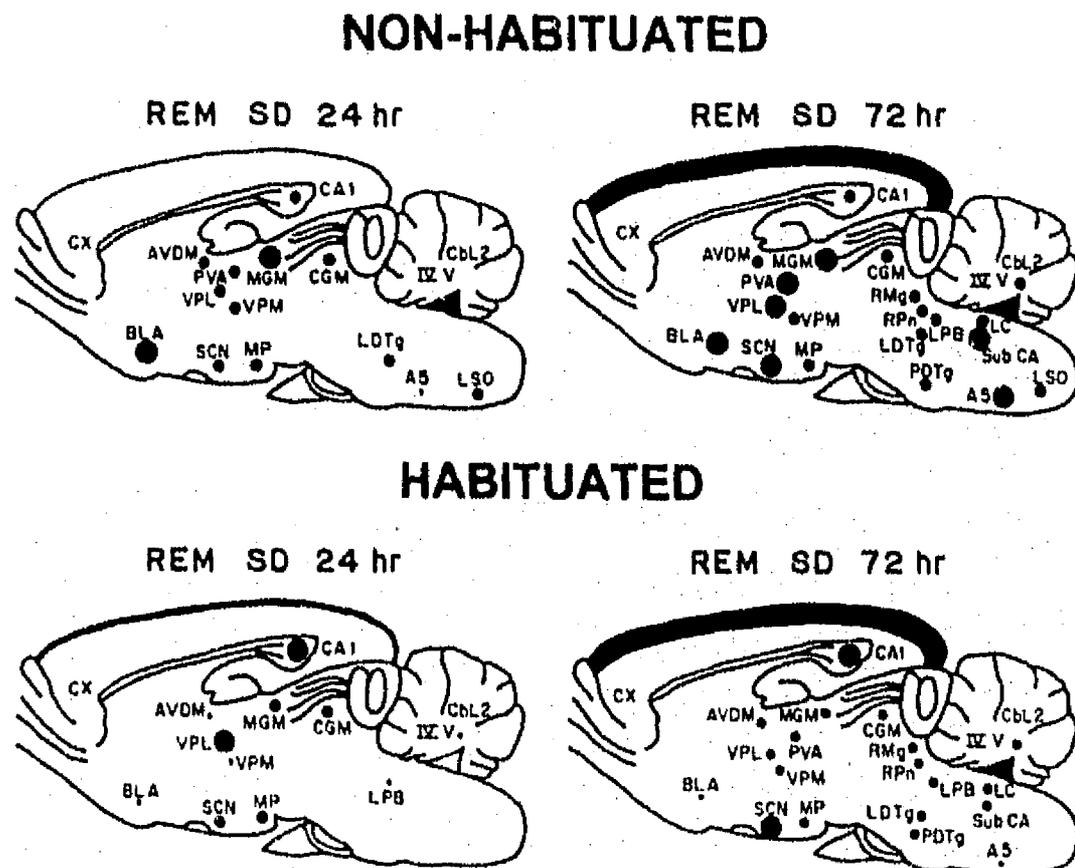


Fig. 3. This graph illustrates the distribution of areas within the diencephalon and brainstem where increases in VIP receptor density were observed in comparison to controls. The black dots indicate the structures where the changes occurred and the size of the dots portrays areas where large changes were observed, while small dots portray smaller changes.

5.8; $P < 0.05$), the ventral posteromedial thalamic nucleus ($F = 14.5$; $P < 0.01$) and the medial geniculate nucleus ($F = 4.6$; $P < 0.05$).

3.4. Habituated vs. non-habituated brainstem

In Fig. 1, comparison between the two experimental groups showed that at 24 h of REM SD, the lateral parabrachial nucleus ($F = 7.9$; $P < 0.01$) increased VIP receptor following habituation, while the laterodorsal tegmental nucleus ($F = 4.6$; $P < 0.05$), choroid plexus of IV ventricle ($F = 4.23$; $P < 0.05$) and A5 noradrenaline cells ($F = 6.34$; $P < 0.05$) showed decreases. At 72 h, there were only decreases in VIP receptor density which were seen in the choroid plexus of IV ventricle ($F = 5.2$; $P < 0.05$) and A5 noradrenaline cells ($F = 9.8$; $P < 0.01$).

Fig. 2 illustrates, through actual photomicrographs, some examples of VIP autoradiography of some areas of the diencephalon and brainstem. In this particular figure, an attempt is made to show the effects of habituating animals to the SD procedure (see Fig. 2A, B, C and D3 vs A, B, C, and D2).

Fig. 3, on the other hand, summarizes by caricature illustration the distribution and intensity of VIP receptor density changes observed in the non-habituated and habituated groups following REM SD or in LP for 24 and 72 h. Clearly more robust effects are seen after 72 h of REM SD and these become evidently attenuated by habituation. No effects are seen by placing animals on LP.

4. Discussion

The results of these experiments not only corroborate previous reports about the regional distribution of VIP [10,12,25], but also clearly show that after 24 or 72 h of REM SD there is a noticeable increase in the density of VIP receptors in a variety of brainstem and diencephalic structures. It is also shown that the increase in VIP receptors in the diencephalic structures occurred at short times after REM SD (24 h) and continued until after 72 h of deprivation. In contrast, in brainstem structures the increases in the density of VIP receptors occurred principally at 72 h of REM SD with only some changes at 24 h. These observations show that there is a time differential in the increase of VIP receptors between brainstem and diencephalic structures which is dependent on the length of forced wakefulness. It is also worth noting that once VIP receptors density increases 24 h after REM SD, no further additional increases are seen after 72 h of REM SD. It would appear as though a ceiling effect occurs in VIP receptor density, once an early change has been established.

It is well known that REM sleep rebound is not only related to REM sleep suppression, but is dependent on the stress induced by the situation produced by the water tank

method as used here [20,38,39,47]. For this reason we habituated the animals to the situation during one week. As a result of this habituation, the density of VIP receptors changed in some areas, as can be seen in Fig. 1. However, it is interesting to note that habituating rats to the environment produced varying effects depending on whether animals were SD 24 or 72 h. With 24 h of SD, 3 of the 6 diencephalic structures (cortex, ventral posterolateral thalamic nucleus and raphe rostral) and 1 of the 4 brainstem structures (lateral parabrachial nucleus) that showed changes in activity, increased VIP receptor density, the others decreased. On the other hand, with 72 h of SD, none showed increases, but 4 diencephalic (basolateral amygdaloid nucleus, ventral posterolateral thalamic nucleus, ventral posteromedial thalamic nucleus, medial geniculate nucleus) and 2 brainstem structures (choroid plexus of IV ventricle, A5 noradrenaline cells) decreased it. In this context, it has been demonstrated that stress induced by immobilization produces an increase in *c-fos* expression in certain neuronal groups, such as basolateral amygdaloid nucleus, paraventricular thalamic nucleus and locus coeruleus and that this effect decreases as a result of adaptation to repeated stress [6]. In the present study, there are changes depending on the time of SD, showing that habituation to the situation modifies the response of the brain (as can be seen in Fig. 2). This suggests that some of the results obtained by sleep deprivation with the water tank method appear to get contaminated by stress, and this may be removed by merely giving a period of habituation to the situation.

The increase of VIP receptors occurred mainly in several of the brainstem areas which have persistently been suggested to be involved in the generation and maintenance of REM sleep [7,15,19,23,42]. This suggests that VIP activity may pertain to the mechanisms influencing the normal occurrence of REM sleep, as well as REM sleep rebound, when long periods of REM sleep deprivation occur. Within this context, it has been demonstrated that the nucleus of the raphe dorsalis is a target for the expression of the hypnogenic properties of VIP [11]. Moreover, since it has been shown that any procedure which increases REM sleep duration increases *fos*-like immunoreactivity in some of the same structures where increases in VIP receptor density were seen following REM SD, it is conceivable that the recruitment of active neurons in structures such as lateral parabrachial nucleus and laterodorsal tegmental nucleus in REM sleep is tightly related to VIP activity [26,43,48].

The increases of VIP receptors in diencephalic nuclei during REM SD suggests that some structures involved in REM sleep regulation may be localized outside of the brainstem. It has been demonstrated that electrical stimulation of basolateral amygdaloid nucleus produces an increment in PGO activity [5], and microinjections of carbachol in this nucleus produce significant increases in REM sleep for several days [14]. In addition, another structure which

showed an increase in the density of VIP receptors was the suprachiasmatic nucleus (SCN). The SCN, localized in the anterior hypothalamus, is known not only as a critical structure for the expression of circadian rhythmicity in a variety of physiological and behavioral functions [3], but also for having high levels of VIP [13,41]. The increase in VIP receptors in this study may reflect alterations in the circadian cycle due to the forced deprivation of REM sleep, which certainly must have altered circadian and homeostatic balance [3]. Moreover, the SCN is characterized by high levels of [¹²⁵I]VIP binding, suggesting that receptors for VIP may be an important component of the functional organization of the SCN [41]. Also, since VIP has been implicated in the regulation of circadian rhythms, the increase in VIP receptors may be due to the altered distribution of REM sleep.

From a theoretical consideration and through experimental evidence, it has been suggested that receptor homeoregulation (e.g., sensitization and desensitization) represents a mechanism by which receptors are modulated by the molecules belonging to its own transmission line (ligand and second messengers) [16,46,49]. In this case, the increase in VIP receptors (up-regulation) may be associated with a decrease or absence of VIP transmission. If this were the mechanism that modulated the up-regulation of VIP receptors during the prolonged wakefulness, the levels of this peptide should decrease during REM SD. However, we have previously reported that REM SD induces an accumulation of VIP levels in the CSF [18], while another report showed no changes in VIP content in almost every structure studied except for the cortex and the anterior pituitary [28]. Perhaps these disagreements may be related to the fact that the levels of VIP are different in the CSF than in the brain, because the CSF has an important role as a neuroendocrine pathway of communication and integration and that it is a site of accumulation by way of diffusion of VIP from central neurons [29]. In any case, we have no clear explanation as to the causes for this discrepancy.

It is interesting to note also that there was an extremely rapid (24 h) shift in ligand binding, which is rather unusual. It is possible that this is caused by the fact that energy requirements as a result of sleep deprivation are very intense and occurs very rapidly [1] and it is known that there is a relationship between VIP receptor and glycogen turnover through cAMP [24].

In view of the powerful REM generating properties of acetylcholine and the fact that VIP has been demonstrated to occur mostly in cholinergic neurons [22,34,44], it is conceivable that the increase of REM sleep produced by VIP is mediated by a cholinergic action. However, it appears that this neurotransmitter is not involved in the mediation of the effects of VIP on REM sleep [37].

Despite some problems of interpretation of the results, it is clear that forced wakefulness changes VIP receptor density in a widely distributed set of structures of the

brainstem and diencephalon, many of which are areas that have been linked to some functional aspects of REM sleep regulation, further suggesting an important role for VIP in such regulation.

Acknowledgements

This work was supported in part by FIRESIN and Fideicomiso UNAM. We wish to thank Mr. Jesús Méndez-Franco, Fernando Carbajal-Esquivel, Francisco Pasos-Nájera and Miss Marcela Palomero-Rivero for their technical assistance, and Mrs. María Teresa Torres-Peralta for typing the manuscript.

References

- [1] Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A., Fang, V.S., Leitch, C.A., Schoeller, D.A., Refetoff, S. and Rechtschaffen, A., Sleep deprivation in the rat: Energy use and mediation, *Sleep*, 12 (1989) 31-41.
- [2] Boissard, C., Marie, J.C., Heblum, G., Gespach, C. and Rosselin, G., Vasoactive intestinal peptide receptor regulation and reversible desensitization in human colonic carcinoma cells in culture, *Cancer Res.*, 46 (1986) 4406-4413.
- [3] Borbély, A. and Tobler, I., Homeostatic and circadian principles in sleep regulation in the rat. In D. McGinty, R. Drucker-Colin, A. Morrison and P. Pannegiani (Eds.), *Brain Mechanisms of Sleep*, Raven Press, New York, 1985, pp. 35-44.
- [4] Borbély, A. and Tobler, I., Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation, *Physiol. Rev.*, 69 (1989) 605-670.
- [5] Calvo, J.M., Badillo, S., Morales-Ramírez, M. and Palacios-Salas, P., The role of the temporal lobe amygdala in ponto-geniculo-occipital activity and sleep organization in cats, *Brain Res.*, 403 (1987) 22-30.
- [6] Chen, X. and Herbert, J., Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular hypothermic and endocrine response, *Neuroscience*, 64 (1995) 675-685.
- [7] Datta, S., Neuronal activity in the peribrachial area: Relationship to behavioral state control, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 19 (1995) 67-84.
- [8] Drucker-Colin, R., Bernal-Pedraza, J., Fernández-Cancino, F. and Oksenberg, A., Is vasoactive intestinal polypeptide (VIP) a sleep factor?, *Peptides*, 5 (1984) 837-840.
- [9] Drucker-Colin, R., Prospero-García, O., Arankowsky-Sandoval, G. and Pérez-Montfort, R., Gastropancreatic peptides and sensory stimuli as REM sleep factors. In S. Inoué and D. Schneider-Helmert (Eds.), *Sleep Peptides: Basic and Clinical Approaches*, Japan Scientific Society Press and Springer Verlag, Tokyo, 1988, pp. 73-94.
- [10] Eiden, L., Nilaver, G. and Palkovitz, M., Distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat brain stem nuclei, *Brain Res.*, 231 (1982) 472-477.
- [11] El Kafi, B., Cespuglio, R., Leger, L., Marinisco, S. and Jouvet, M., Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides possessing hypnotic properties?, *Brain Res.*, 637 (1994) 211-221.
- [12] Hammar, T. and Lutz, E., Multiple receptors for PACAP and VIP, *Trends Pharmacol. Sci.*, 15 (1994) 97-99.
- [13] Hill, J.M., Harris, A. and Hilton-Clarke, D.I., Regional distribution of guanine nucleotide-sensitive and guanine nucleotide-insensitive vasoactive intestinal peptide receptors in rat brain, *Neuroscience*, 48 (1992) 925-932.

- [14] Hobson, J.A., Datta, S., Calvo, J.M., Quattrochi, J., Acetylcholine as a brain state modulator triggering and long-term regulation of REM sleep, *Prog. Brain Res.*, 98 (1993) 389-404.
- [15] Hobson, J.A., McCarley, R.W. and Wyzinski, P.W., Sleep cycles oscillation: a reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups, *Science*, 189 (1975) 55-58.
- [16] Hollenber, D.M., Receptor models and the action of neurotransmitters and hormones: Some new perspectives. In H.I. Yamamura (Ed.), *Neurotransmitter Receptor Binding*, Raven Press, New York, 1985, pp. 1-39.
- [17] Inoué, S., Kimura, M., Honda, K. and Komoda, Y., Sleep peptides: General and comparative aspects. In S. Inoué, and D. Schneider-Helmert (Eds.), *Sleep Peptides. Basic and Clinical Approaches*, Japan Scientific Society Press and Springer Verlag, Tokyo, 1988, pp. 73-94.
- [18] Jiménez-Anguiano, A., Báez-Saldaña, A. and Drucker-Colín, R., Cerebrospinal fluid (CSF) extracted immediately after REM sleep deprivation prevents REM rebound and contains vasoactive intestinal peptide (VIP), *Brain Res.*, 631 (1993) 345-348.
- [19] Jones, B.E., Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain, *Neuroscience*, 40 (1991) 637-656.
- [20] Jouvet, M., Neurophysiology of the states of sleep, *Physiol. Rev.*, 47 (1967) 117-177.
- [21] Kapás, L., Obál, F. and Krueger, J.M., Humoral regulation of sleep, *Int. Rev. Neurobiol.*, 35 (1993) 131-160.
- [22] Lundberg, J.M., Hokfelt, T., Schultzberg, K., Uvnas-Wallensten, Kohler, C. and Said, S.I., Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: Evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining, *Neuroscience*, 4 (1979) 1539-1559.
- [23] Lydic, R., Baghdoyan, H.A., Hibbard, E.U., Bonyac, M.R., De Joseph, R. and Hawkins, R.A., Regional brain glucose metabolism is altered during rapid eye movement sleep in the cat: a preliminary study, *J. Comp. Neurol.*, 304 (1991) 517-529.
- [24] Maggistretti, P.J., VIP neurons in the cerebral cortex, *Trends Pharmacol. Sci.*, 11 (1990) 250-254.
- [25] Martin, J.L., Diel, M., Hof, R., Palacios, J.M. and Maggistretti, P.J., Autoradiographic mapping of [Mono [¹²⁵I] Iodo-Tyr¹⁰, Met¹⁷] Vasoactive Intestinal Peptide binding sites in the rat brain, *Neuroscience*, 23 (1987) 539-565.
- [26] Merchant-Nancy, H., Vázquez, J., García, F. and Drucker-Colín, R., Brain distribution of c-fos expression as a result of prolonged rapid eye movement (REM) sleep period duration, *Brain Res.*, 681 (1995) 15-22.
- [27] Mirmiran, M., Kruisbrink, J., Bos, N.P.A., Van der Werf, D. and Boer, G.J., Decrease of rapid-eye-movement sleep in the light by intraventricular application of a VIP-antagonist in the rat, *Brain Res.*, 485 (1988) 192-194.
- [28] Morin, A.J., Denoroy, L. and Jouvet, M., Effect of paradoxical sleep deprivation of vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in discrete brain areas and anterior pituitary of the rat, *Brain Res. Bull.*, 28 (1992) 655-661.
- [29] Nilsson, C., Lindvall-Axelsson, M. and Owman, Ch., Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system, *Brain Res. Rev.*, 17 (1992) 109-138.
- [30] Obál, F., Effects of peptides (DSIP, DSIP analogues, VIP, GRF and CCK) on sleep in the rat, *Clin. Neuropharmacol.*, 9 (1986) 459-461.
- [31] Obál, F., Sary, G., Alfoldi, P. and Rubicksek, G., Vasoactive intestinal polypeptide promotes sleep without effects of brain temperature in rats at night, *Neurosci. Lett.*, 64 (1986) 236-240.
- [32] Obál, F., Opp, M., Cady, B., Johansen, I. and Krueger, J.M., Prolactin, Vasoactive intestinal peptide and peptide histidine methionine elicit selective increases in REM sleep in rabbits, *Brain Res.*, 490 (1989) 292-300.
- [33] Obál, F., Payne, I., Kacsóh, B., Opp, M.R., Kapás, L., Grosvenor, C. and Krueger, J.M., Involvement of prolactin in the REM sleep promoting activity of systemic vasoactive intestinal peptide (VIP), *Brain Res.*, 645 (1994) 143-149.
- [34] Obata-Tsuto, H.L., Okamura, H., Tsuto, T., Terabayashi, H., Fukui, K., Yanaihara, N. and Iwata, Y., Distribution of the VIP-like immunoreactivity neurons in the cat central nervous system, *Brain Res. Bull.*, 10 (1987) 653-660.
- [35] Paxinos, G. and Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, 1986.
- [36] Prospero-García, O., Morales, M., Arankowsky-Sandoval, G. and Drucker-Colín, R., Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) and Cerebrospinal fluid (CSF) of sleep-deprived cats restores REM sleep in insomniac recipients, *Brain Res.*, 385 (1986) 169-173.
- [37] Prospero-García, O., Jiménez-Anguiano, A. and Drucker-Colín, R., The combination of VIP and atropine induces REM sleep in cats rendered insomniac by PCPA, *Neuropsychopharmacol.*, 8 (1993) 387-390.
- [38] Rampin, C.R., Cespuglio, N., Chastrette, N. and Jouvet, M., Immobilization stress induces a paradoxical sleep rebound in rat, *Neurosci. Lett.*, 126 (1991) 113-118.
- [39] Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A. and Gaillard, M.A., Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings, *Sleep*, 12 (1989) 68-87.
- [40] Riou, F., Cespuglio, R. and Jouvet, M., Endogenous peptides and sleep in the rat III. The hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide, *Neuropeptides*, 2 (1982) 265-277.
- [41] Robinson, M.Q. and Fuchs, J.L., [¹²⁵I] Vasoactive intestinal peptide binding in rodent suprachiasmatic nucleus: developmental and circadian studies, *Brain Res.*, 605 (1993) 271-279.
- [42] Sakai, K., Some anatomical and physiological properties of pontomesencephalic tegmental neurons with special reference to the PGO waves and postural atonia during paradoxical sleep in the cat. In J.A. Hobson and M.A. Brazier (Eds.), *The Reticular Formation Revisited*, Raven, New York, 1980, pp. 427-447.
- [43] Shiromani, P., Kilduff, T., Bloom, F. and McCarley, R., Cholinergically induced REM sleep triggers fos-like immunoreactivity in dorsolateral pontine regions associated with REM sleep, *Brain Res.*, 580 (1992) 315-357.
- [44] Sutin, E.L. and Jacobowitz D.M., Immunocytochemical localization of peptides and other neurochemicals in the rat laterodorsal tegmental nucleus and adjacent area, *J. Comp. Neurol.*, 270 (1988), 243-270.
- [45] Ursin, R., Endogenous sleep factors, *Exp. Brain Res.*, 8 (1984) 118-132.
- [46] Valentine-Braun, K.A. and Hollenber, M.D., Membrane receptors and hormone action. In M. Cantin (Ed.), *Cell Biology of the Secretory Process*, Karger, Basel, 1984, pp. 1-51.
- [47] Vogel, A., Review of REM sleep deprivation, *Arch. Gen. Psychiatry*, 32 (1975) 749-761.
- [48] Yamuy, J., Mancillas, J., Morales, F. and Chase, H., C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep, *J. Neurosci.*, 13 (1993) 2703-2718.
- [49] Zoli, M., Agnati, F.L., Hedlund, P.B., Ming, X.L., Ferré, S. and Fuxe, K., Receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells, *Mol. Neurobiol.*, 7 (1994) 293-334.

Las siguientes autorradiografías ilustran los principales cambios que fueron observados en la densidad de receptores del VIP en diferentes niveles del diencefalo y tallo cerebral de los grupos de animales PSMOR, que además fueron habituados y no habituados.

Todas las composiciones están diseñadas de la siguiente forma:

El panel A representa al grupo normal, el B y C, corresponden a los animales controles colocados en plataformas grandes durante 24 y 72 hrs, respectivamente. Mientras que D y E, ilustran a los grupos PSMOR por 24 y 72 hrs.

Abreviaturas utilizadas:

Cx = Corteza

GD = Giro Dentado

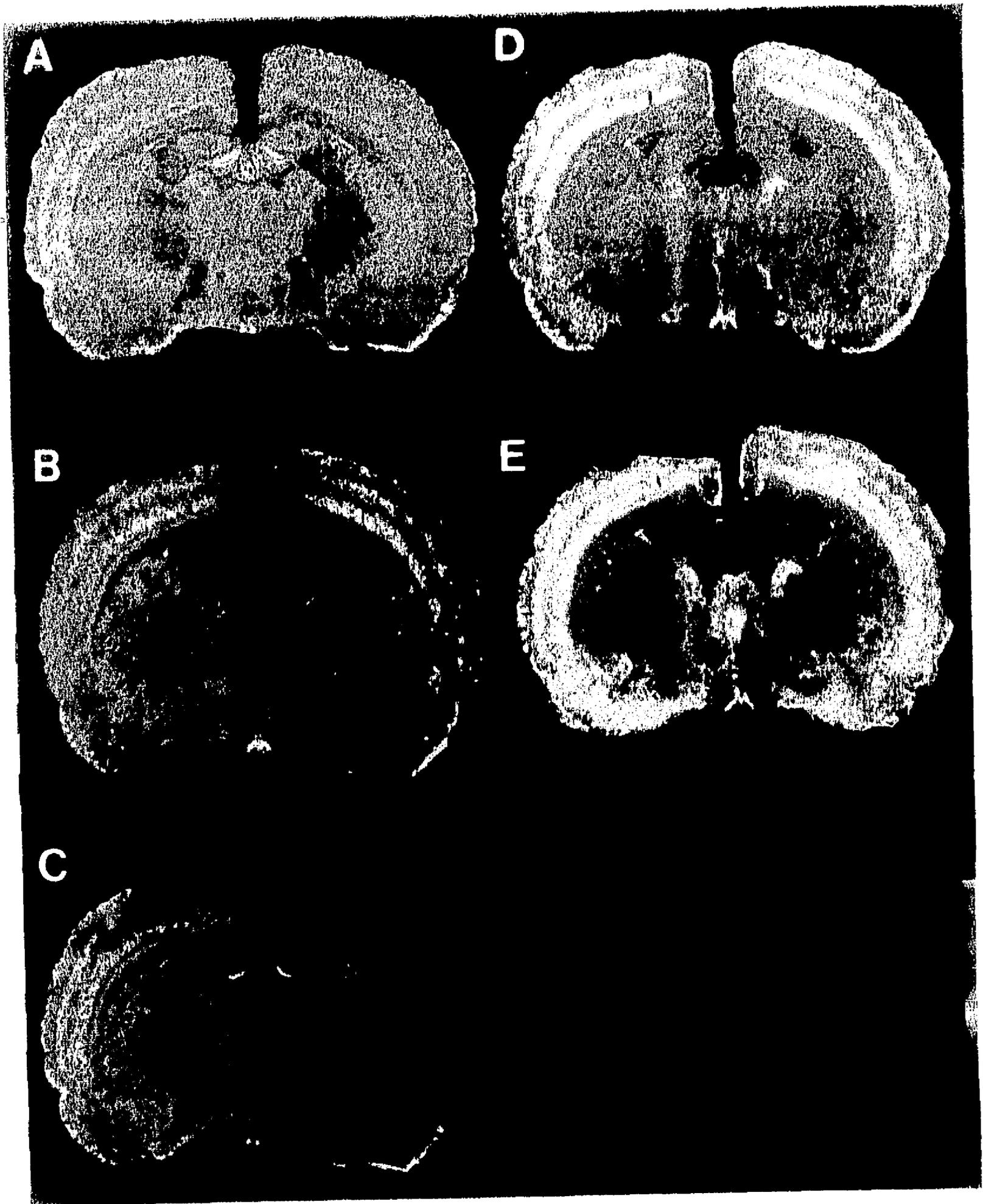
VPL= Tálamo Ventrolateral

BLA= Amígdala Basolateral

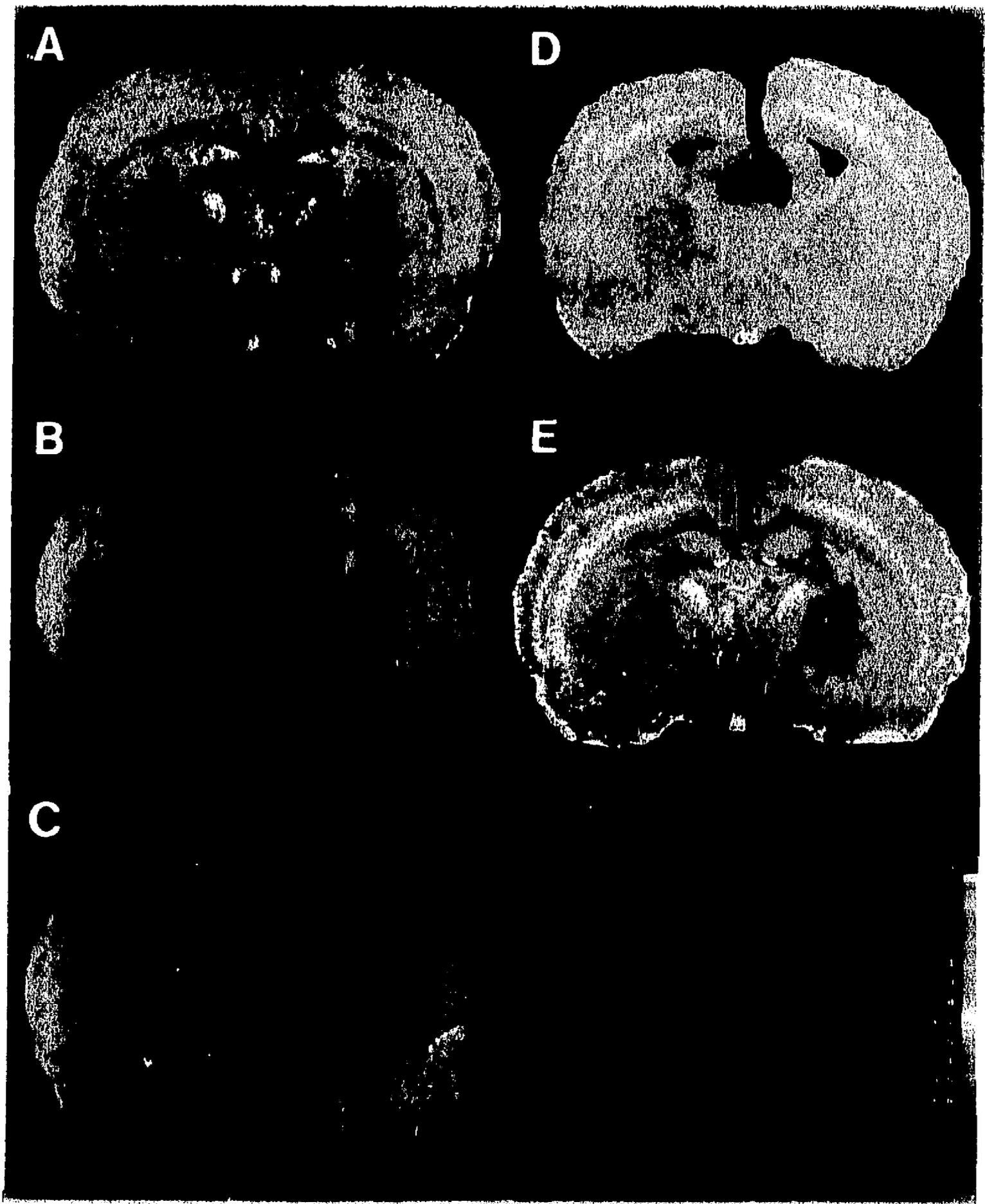
NSQ= Núcleo Supraquiasmático.

LR= Recesos Laterales.

A5= Células Noradrenérgicas.

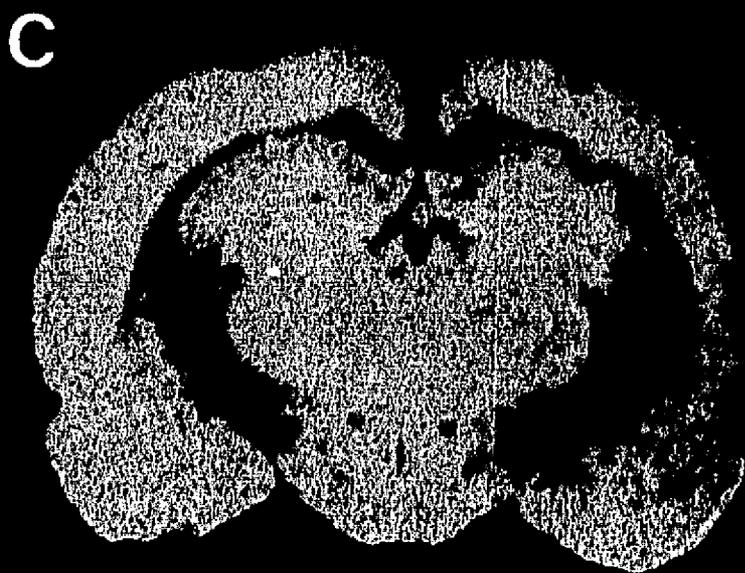
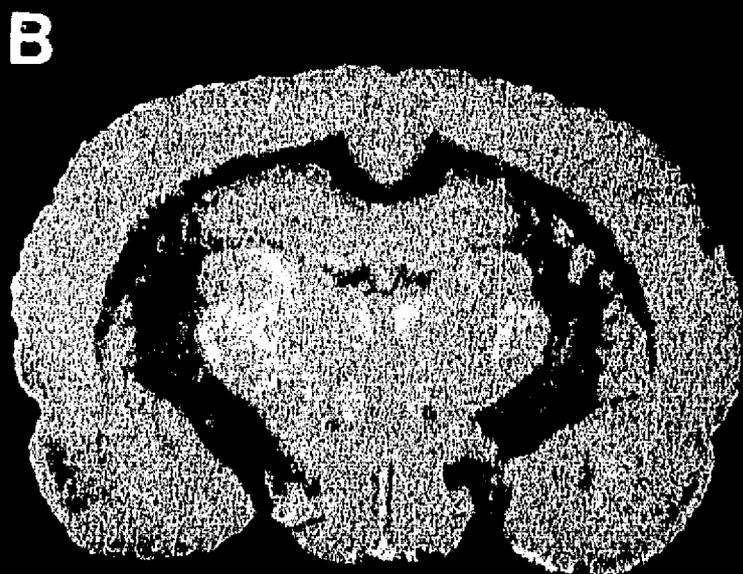
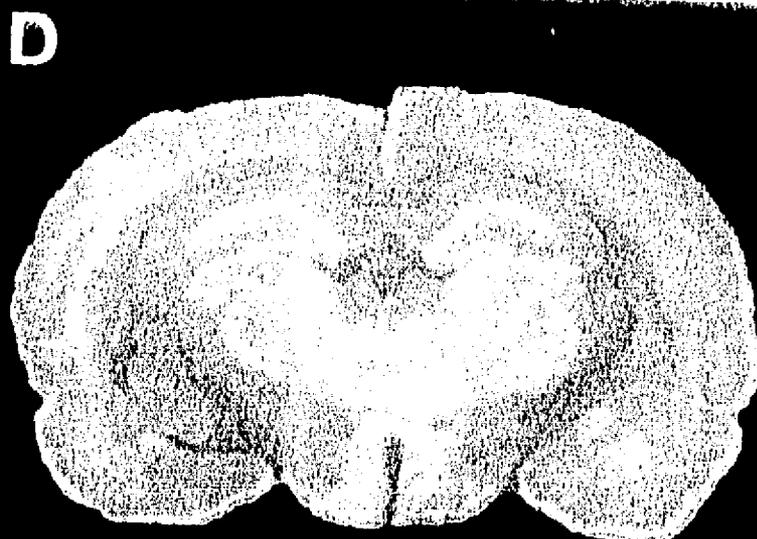
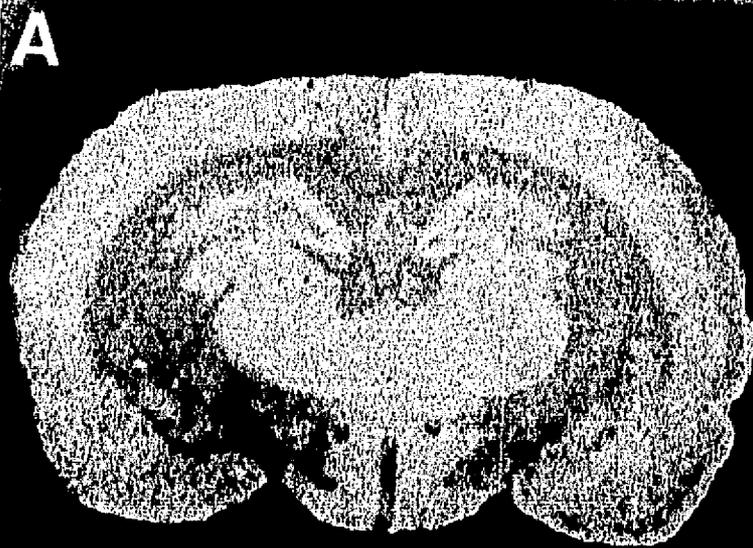


HABITUADOS

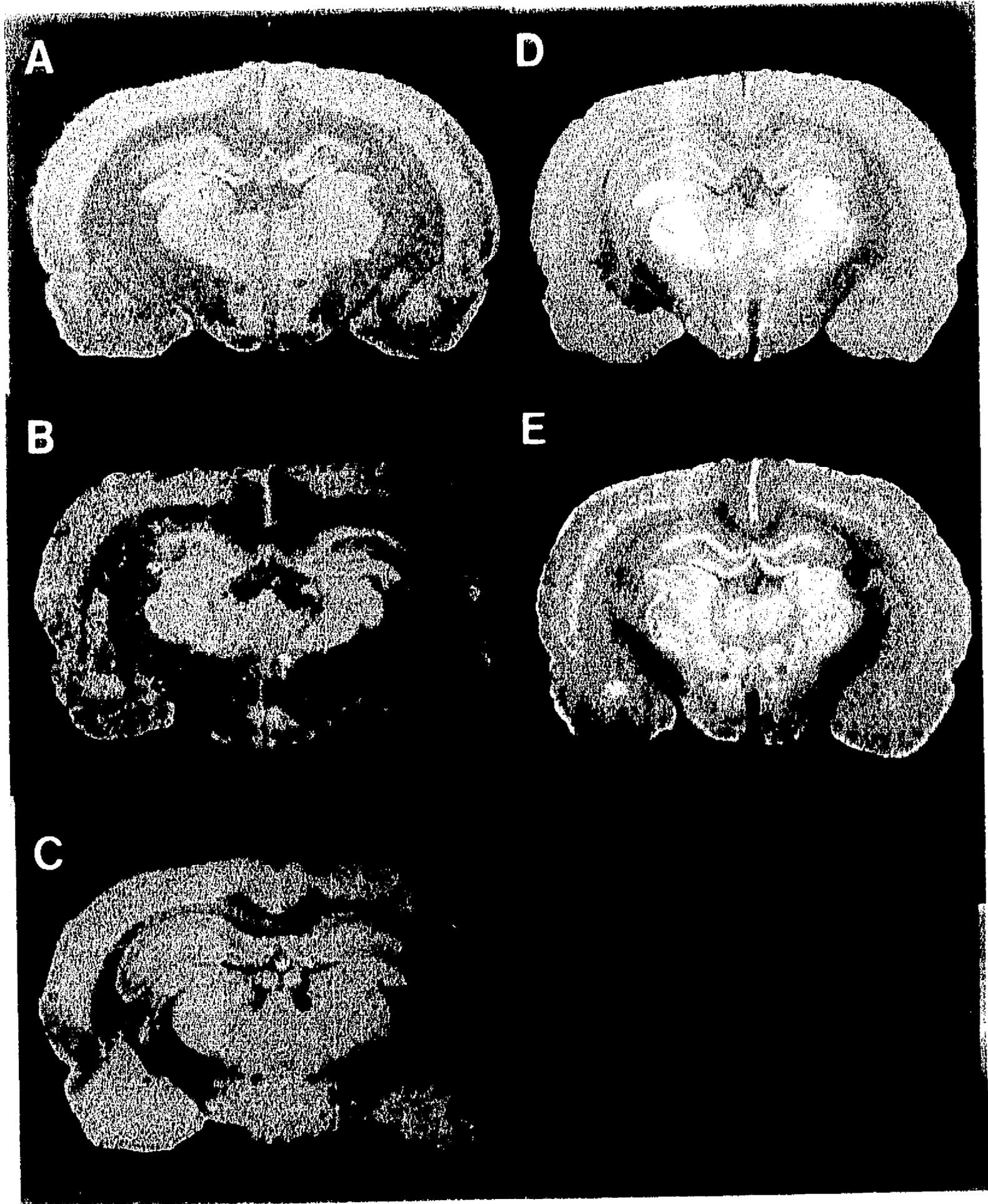


NO HABITUADOS

AP= -3.3



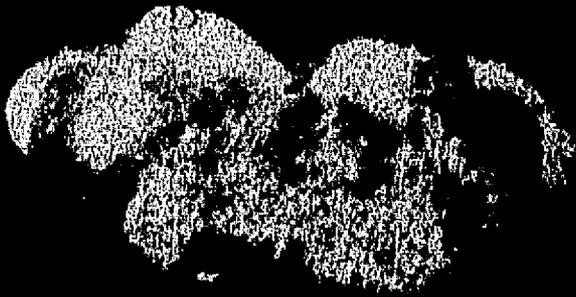
HABITUADOS



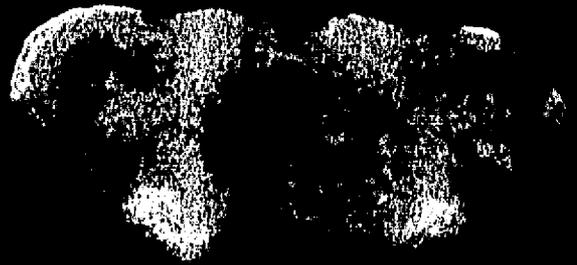
NO HABITUADOS

AP= - 9.8

A



D



B



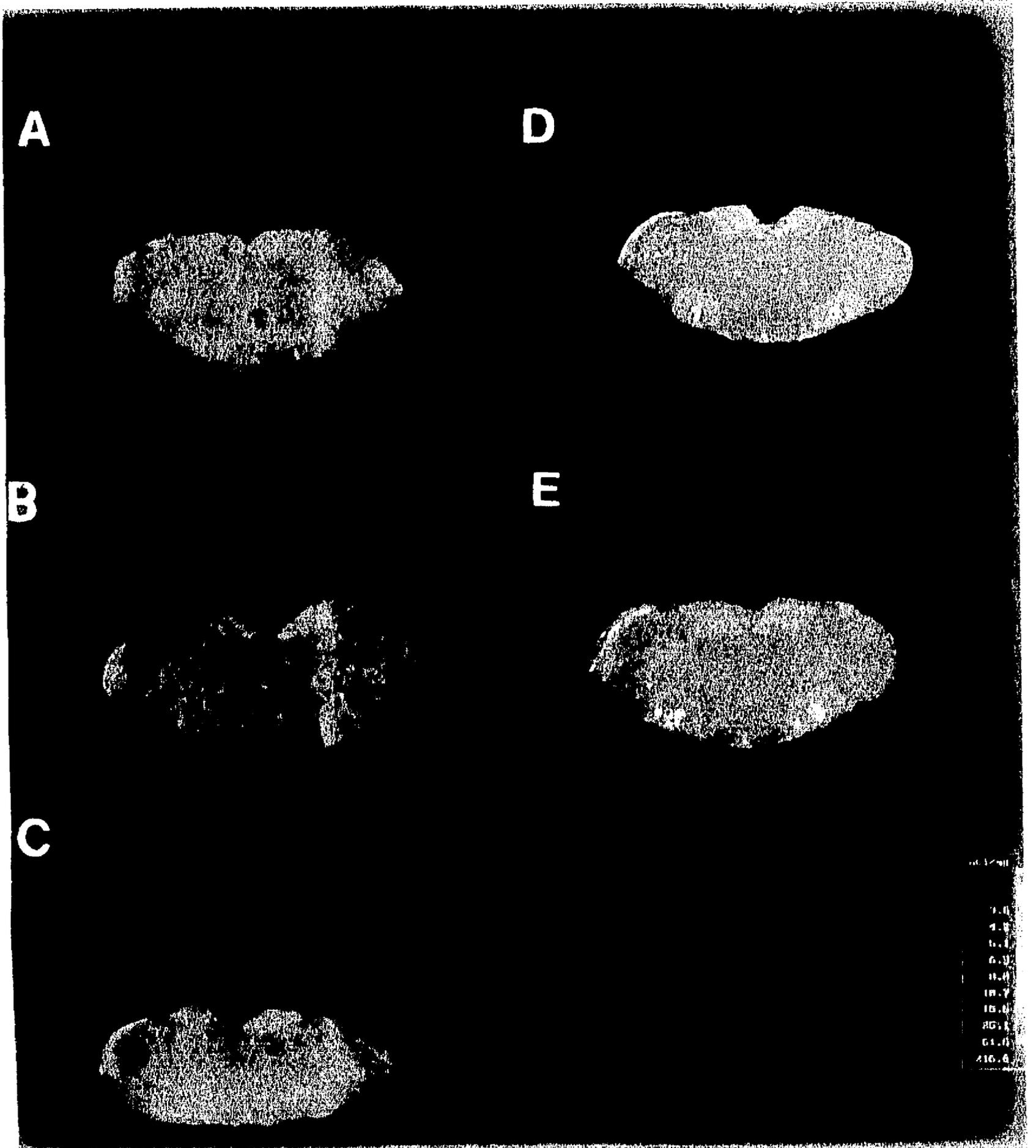
E



C



Figure 10-10-10



4. DISCUSION

En el experimento 1, los resultados mostraron que la PSMOR produjo un aumento en la densidad de receptores a VIP en diversos núcleos del diencefalo y tallo cerebral involucrados con la regulación del ciclo vigilia-sueño. Estos resultados sugieren que durante la PSMOR ocurren diferentes cambios neuroquímicos, que podrían regular el rebote de sueño, el cuál ocurre durante el periodo de recuperación posterior a la privación. Dicho rebote se caracteriza por un aumento en la duración de los periodos de sueño MOR, el cuál solo es proporcional hasta las 72 horas de privación, a tiempos posteriores de PSMOR no hay compensación en la cantidad de sueño MOR (Jouvet y col., 1964; Siegel y Gordon, 1965; Drucker-Colín y Valverde, 1982). Este efecto ha sido observado en diversas especies, tales como el gato, la rata, el conejo y el humano (Vogel y col., 1987; Borbély y Tobler, 1990). Con base en estas observaciones, diversos grupos de investigación han sugerido que posiblemente durante la vigilia forzada ó PS se acumulan sustancias inductoras de sueño, en el tejido cerebral y/o LCR, que permitan "indemnizar" la falta de sueño MOR posterior a la PSMOR y en consecuencia participen en el rebote de sueño MOR. Las evidencias experimentales al respecto, han mostrado que la administración de LCR de gatos PSMOR por 72 horas al 4° ventrículo de gatos insomnes pretratados con PCPA, incrementa la cantidad de sueño MOR de manera significativa (Sallanon y col., 1983; Prospero-García y col., 1986). En ratas, también se ha observado que la administración de LCR de animales PSMOR por 24 horas a animales insomnes con propranolol, induce sueño MOR y dicho efecto es potenciado con LCR de ratas PSMOR por 48 y 72 horas (Adrien y Dugovic, 1984). Adicionalmente, se ha observado que la extracción de LCR a gatos PSMOR disminuye el rebote de sueño (Jiménez-Anguiano y col., 1993). Estos resultados apoyan la viejísima idea de Pieron de que durante la privación de sueño se acumulan diversas sustancias inductoras de sueño en el LCR.

Debido a que el número de dichas sustancias ha aumentado en los últimos años; las cuales además no han sido estudiadas de manera profunda y preferencialmente afectan el SOL, sin presentar ningún efecto sobre el sueño MOR, (Borbély y Tobler, 1989; Krueger y col., 1995), decidimos determinar los efectos de la PSMOR sobre la densidad de receptores de un solo neuropéptido, el VIP, por las siguientes razones: primero, de todos los neuropéptidos estudiados en la regulación del ciclo

vigilia-sueño, se ha demostrado que solamente el VIP incrementó la cantidad de sueño MOR de manera significativa en animales insomnes pretratados con PCPA (Riou y col., 1982c; Prospero-García y col., 1986; Prospero-García y col., 1993a) y en condiciones normales (Drucker-Colín y col., 1984; Obál Jr, 1986; Kruisbrink y col., 1987; Obál, Jr y col., 1989). Segundo, se ha observado que los receptores para VIP modulan el efecto inductor de sueño de este péptido, ya que cuando se bloquean los receptores para el VIP, mediante el uso de un antagonista selectivo (Mirmiran y col., 1988) o bien se administran i.c.v anticuerpos anti-VIP, se produce una disminución significativa de la fase de sueño MOR (Riou y col., 1982c). Además, la incubación del LCR de animales PSMOR con anticuerpos anti-VIP disminuyen los efectos inductores del LCR (Drucker-Colín y col., 1990). Estos trabajos sugieren que el VIP es una sustancia inductora de sueño y que dicho efecto está modulado por sus receptores, además de que el VIP ó una molécula parecida al VIP, puede ser uno de los principios activos del LCR para la inducción del sueño MOR. En este sentido, se ha demostrado que el VIP se localiza en el LCR (Wang y col., 1983) y que sus sitios de pegado son muy ricos en la capa subependimal a nivel de todos los ventrículos, el área postrema, los órganos subcomisurales y subfornicales del cerebro, lo que indica un posible papel del VIP en regular la producción del LCR (Martín y col., 1987; Nilsson y col., 1992).

Paralelamente, se ha propuesto, que la concentración de dichas sustancias depende del tiempo de privación, lo que en consecuencia determinaría la magnitud del rebote de sueño MOR. En este contexto, demostramos que los niveles del VIP incrementan en el LCR de gatos PSMOR de manera casi proporcional al tiempo de privación (Jiménez-Angulano y col., 1993), por lo que sugerimos que posiblemente el VIP participa en modular el rebote de sueño. Asimismo, consideramos que dicho rebote, también fue influenciado de manera importante por interactuar con diversas estructuras cerebrales localizadas en el tallo cerebral, ventrales al 4º ventrículo, las cuales han sido propuestas como generadoras de los mecanismos del sueño MOR (Hobson y col., 1974). En conclusión, consideramos que el VIP es una sustancia inductora de sueño, que se acumula en el LCR durante la PSMOR y que probablemente está involucrado en modular el rebote de sueño MOR mediante su interacción con diversas estructuras cerebrales implicadas en la regulación del ciclo vigilia-sueño.

En el presente trabajo, los resultados del experimento 1 mostraron que las mayores densidades de los receptores del VIP durante la PSMOR se localizan en diversos núcleos del diencefalo y tallo cerebral implicados en la regulación del sueño. En el tallo cerebral, los principales cambios fueron registrados en núcleos tales como, el LDT, PPT, LC, SubC y LPB. Al respecto, se ha demostrado que la estimulación eléctrica del PPT aumenta la liberación de ACh en el FTG, así como un aumento en la actividad de disparo durante el sueño MOR, mientras que la lesión con ácido kainico de los núcleos del PPT y LDTg, producen una disminución en la cantidad de sueño MOR, el cuál es proporcional al número de células colinérgicas destruidas (Webster y Jones, 1988). Experimentos recientes han mostrado que dicha lesión reduce preferentemente los aspectos fásicos del sueño MOR (MORs y PGOs), por lo que esta fase solo llega a presentarse en su forma tónica (Shouse y Siegel, 1992). Estas evidencias sugieren que dichos núcleos participan de manera importante en regular el sueño MOR en condiciones normales. En nuestros resultados observamos que dichos núcleos presentan un incremento en la densidad de receptores a VIP durante la PSMOR lo cual señalaría que posiblemente estas estructuras estarían participando en el rebote de sueño. En este contexto, se ha visto que durante la PSMOR y el rebote de sueño, los núcleos del PPT y LDTg presentan un aumento en su frecuencia de disparo (Mallick y col., 1989; 1992). Los trabajos mencionados son evidencias de la participación de estos núcleos en la regulación del sueño MOR. Es interesante señalar que gran parte de los núcleos que mostraron un aumento en la densidad de receptores a VIP son estructuras que contienen células REM-ON, tales como el PPT, LDTg y PB, las cuáles se les denomina así, porque presentan una actividad fásica alta durante algunas conductas motoras de la vigilia y una frecuencia de disparo baja durante el SL, además de presentar una actividad tónica alta a lo largo del sueño MOR (Sakai, 1988). Además, los núcleos LDTg y PB, contienen células PGO-ON, es decir neuronas que disparan poco antes de la aparición de una espiga PGO (Steriade y col., 1989; Datta, 1995)). También se ha demostrado que en el núcleo SubC, existe una compleja interacción de células colinérgicas REM-ON involucradas en la atonía muscular y de neuronas REM-ON noradrenérgicas, cuya generación en el sueño MOR ha sido ampliamente discutida. Adicionalmente, se ha observado que gran parte de los núcleos que mostraron un incremento en la densidad de receptores a VIP también mostraron inmunoreactividad a c-fos después de la

PSMOR (Merchant-Nancy y col., 1995; Yamuy y col., 1995), lo que sugiere que posiblemente el reclutamiento neuronal de dichas estructuras esta relacionada de manera importante con la actividad del VIP.

En cuanto al diencefalo, también observamos un incremento en la densidad de receptores a VIP, tal vez este efecto sea el resultado de que existen otras estructuras responsables de regular el sueño MOR, que se localizan fuera del tallo cerebral. Entre estas estructuras podemos mencionar estructuras tales como el NSQ, BLA, VPM y Cx, entre otras. Al respecto, se ha demostrado que el NSQ, regula el sueño a través de la modulación circádica (Borbély y Tobler, 1985). Este núcleo recibe proyecciones de otros núcleos cerebrales involucrados con la modulación del sueño, tales como el AP, el área hipotalámica anterior, núcleo talámico paraventricular, CGL, RD y del núcleo tegmental dorsal (Guldner, 1976; 1985).

En tanto que la amígdala, se ha demostrado que participa en modular la densidad de PGOs y el incremento en el sueño MOR, después de la administración de carbacol (Calvo y col., 1995).

Por otra parte, diversos grupos de investigación han tratado de dilucidar si el rebote de sueño MOR que se observa posterior a la PSMOR, esta influenciado solamente por la falta de sueño o por alguna otra variable inherente al método de privación. Una de las principales desventajas de los métodos de privación, es el estrés producido a los animales por los continuos despertares lo que de cierta manera, afecta los resultados y hace difícil su interpretación (Vogel, 1975; Borbély y Tobler, 1989). Para tratar de eliminar los efectos del estrés producido por la PSMOR, se han utilizado plataformas grandes (PG), las cuales permiten que el animal presente relajamiento muscular y en consecuencia se presente el sueño, pero bajo las mismas condiciones de confinamiento (Drucker-Colín y Valverde, 1982).

Debido a que el estrés produce diversos cambios metabólicos importantes, lo que podría estar contribuyendo al rebote de sueño, decidimos entonces en el experimento 2, determinar la participación del estrés sobre la densidad de receptores a VIP posterior a la PSMOR. En nuestros resultados observamos que el estrés participa de manera importante en el incremento de receptores a VIP, ya que en los grupos PSMOR e incluso en los controles colocados en PG, sin habituación, la magnitud de

cambio fue mayor en relación a los resultados obtenidos cuando los animales fueron habituados al método de privación. Estos resultados muestran de manera clara que el incremento en los receptores a VIP en el diencéfalo y tallo cerebral de animales PSMOR, es dado preferencialmente por la PSMOR, aunque también consideramos que dicho efecto está asociado con un componente de estrés. En este contexto, han demostrado que el rebote de sueño MOR que se observa posterior a la PSMOR, también ocurre después de someter a los animales a un estrés intenso (Rampin y col, 1991). En el caso del VIP, han observado que la concentración del VIP, también está modulada por el estrés, ya que los niveles hipotalámicos de este neuropéptido aumentan después de someter a las ratas a un estrés crónico (Gavalda y col., 1993).

En cuanto a los resultados obtenidos con la habituación donde se observó una disminución en los receptores a VIP, nos sugieren que posiblemente durante este período ocurren diversos cambios neuroquímicos que determinan este efecto. En este sentido, han observado que el estrés inducido por inmovilización produce un incremento en la inmunoreactividad a c-fos en ciertos grupos neuronales, como el núcleo amigdalino lateral, varios núcleos talámicos y el LC, e interesantemente muestran que después de la habituación la expresión al c-fos disminuye de manera importante (Chen y Herbert, 1995.)

Con base en nuestros resultados podemos concluir que además de la PSMOR, el estrés participa de manera importante en modular la densidad de receptores a VIP en diversos núcleos cerebrales de la rata. A partir de estas evidencias, podemos concluir que el sueño no es un fenómeno aislado y homogéneo, éste depende básicamente de la actividad neuronal de un gran número de estructuras que generan un flujo de información hacia diferentes áreas del cerebro para modular el sueño. Posiblemente, el aumento en la densidad de receptores a VIP en varios núcleos cerebrales, sea el resultado de un sistema que se encuentra íntimamente conectado formando circuitos excitatorios, que junto con la participación de neurotransmisores y neuropéptidos juegan un papel importante en regular el ciclo vigilia-sueño. Al respecto, se ha demostrado que existen conexiones mutuas entre los núcleos del PPT y del LDTg, con la FRP (Quattrochi y col., 1990).

Por otra parte, el aumento en el número de receptores producido por la PSMOR, es difícil de explicar con base en la literatura clásica de la regulación de receptores; la cuál propone 2 mecanismos

generales, los cuales están modulados por la concentración del ligando: el primero ocurre después de que aumentan los niveles del ligando provocado por diversas condiciones fisiológicas o bien mediante el uso de agonistas, lo que provoca entonces una disminución en el número de receptores (regulación decreciente); y viceversa, cuando los niveles del ligando disminuyen, se produce entonces un aumento en el número de receptores (regulación creciente) (Gaillard y col., 1990). El aumento en la densidad de receptores para VIP observado en nuestros resultados, tendría que ser consecuencia de una disminución en los niveles del VIP. Sin embargo, previamente reportamos que durante la PSMOR se produce un aumento en los niveles de VIP en el LCR de gatos PSMOR, de manera casi proporcional al tiempo de privación (Jiménez-Anguiano y col., 1993). No obstante, Morin y col., en 1992, demostraron que la concentración de VIP en el cerebro de la rata, en lugar de aumentar, disminuye durante la PSMOR por 24 y 48 horas en la corteza y pituitaria, sin cambios en el NSQ, hipotálamo, AP, sustancia gris periacueductal, LC, RD y la médula dorsomedial. Además, de que el rebote de 5 horas de sueño posterior a la PSMOR no produjo cambios significativos en la concentración de VIP.

Estas evidencias, sin embargo, no aclaran el mecanismo por el cual se produce el aumento en la densidad de receptores a VIP durante la PSMOR. Posiblemente, durante este periodo, ocurren otros mecanismos de regulación de receptores que no necesariamente cumplan con los requisitos de una regulación ligando-receptor. Tal es el caso de un agonista colinérgico, la nicotina, que después de la administración crónica en lugar de producir una disminución en el número de receptores por la sobreestimulación de éstos, por el contrario produce una "regulación creciente" de los receptores nicotínicos (Wonnacott, 1990). Estos resultados sugieren que la prolongada desensibilización puede promover la aparición de más receptores nicotínicos en la membrana, sin embargo, el mecanismo que regula este efecto, aún continúa representando un enigma. Esta evidencia, hace aún más compleja la posible explicación del mecanismo por el cual ocurre el incremento en el número de receptores por lo que es necesario un mayor soporte experimental para tratar de dilucidar este efecto.

Por otra parte, se ha demostrado que el VIP coexiste con diversos neurotransmisores, tales como la ACh, NE y 5-HT, en el sistema nervioso central de la rata (Gozes y Breneman, 1993). Al parecer, estos neurotransmisores también pueden regular el número de receptores. De esta forma, se

ha observado que el tratamiento crónico de la glándula salival del gato con atropina (antagonista muscarínico) no únicamente produce un incremento en el número de receptores muscarínicos, sino también de receptores a VIP (Lundberg y col., 1982b; Hedlund y col., 1983), así como en la corteza cerebral de ratas (Abens y col., 1984). En contraparte, se ha demostrado, mediante estudios *in vitro*, que la administración de carbacol (agonista colinérgico) en el páncreas de cobayo induce una disminución en el número de los receptores de alta afinidad para VIP, a través de la interacción directa del carbacol con los receptores colinérgicos, sin interactuar directamente con los receptores para VIP (Murakami y col., 1989). Estos resultados sugieren que la ACh puede influenciar también de manera importante la neurotransmisión del VIP en diversas regiones cerebrales y que este puede ser uno de los posibles mecanismos para producir el aumento en densidad de receptores a VIP durante la PSMOR, tal como lo observamos en nuestros resultados.

Adicionalmente, se ha demostrado que la ACh participa de manera importante en la regulación del sueño MOR. Durante esta fase se ha observado que se produce un aumento importante en la liberación de ACh en el FTG. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito que ocurre con los niveles de este neurotransmisor durante y posterior a la PSMOR. Una posibilidad es que al impedirse el sueño MOR, se atenúe la liberación de ACh y esto de como consecuencia el fenómeno de regulación "hacia arriba" de los receptores. Sin embargo, recientemente se ha reportado que la privación total de sueño no produce cambios significativos en estructuras diencefálicas, las cuáles han sido involucradas con la regulación del sueño (Tsai y col., 1994). Aunque Nuñez y col., reportan que durante este período se produce una disminución. A partir de estos resultados aún no tenemos claro el panorama de como se podrían autorregular los receptores colinérgicos y vipérgicos durante la PSMOR. No obstante, consideramos que existe una estrecha relación en los niveles de ACh y VIP para regular el sueño MOR. Sobre este aspecto, hemos demostrado que la ACh antagoniza los efectos inductores de VIP en condiciones de insomnio (Prospero-García y col 1993).

Además, se ha propuesto que el VIP actúa como un organizador circádico de sueño, ya que en condiciones normales las concentraciones de este péptido, muestran variaciones circádicas en el tallo cerebral (sustancia gris periacueductal y LC), con dos picos máximos uno para el período obscuro

y otro para el de luz. Mientras que en el cerebro anterior, solo el NSQ, presentó las mayores concentraciones durante el periodo obscuro (Morin y col., 1990). Estos resultados sugieren que las estructuras antes mencionadas son importantes para la homeostasis de sueño por parte del VIP, y que además el NSQ estaría participando en la ritmicidad del ciclo vigilia-sueño.

Asimismo, mediante técnicas de biología molecular se ha demostrado que durante el periodo obscuro en el NSQ, se detectan los mayores niveles de RNAm para VIP en comparación con el periodo de luz (Albers y col., 1987). Estos resultados, sugieren que durante el periodo obscuro se prepara la maquinaria bioquímica para que el sueño se presente durante el periodo de luz, que corresponde con el periodo de sueño de la rata. Estas evidencias, señalan que el NSQ es una estructura importante para regular los niveles de VIP y la ritmicidad del sueño.

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

Por otra parte, Obál y col., en 1989, han sugerido que uno de los posibles mecanismos de acción del VIP para la producción de sueño MOR puede estar mediada vía la liberación de prolactina. Esta hipótesis esta basada por que la administración subcutánea de prolactina produce un incremento en la cantidad de sueño MOR a dosis altas, y además dicho incremento esta asociado con un aumento en la latencia de los periodos de esta fase de sueño. De esta forma, proponen que la administración i.c.v. de VIP es el que desencadena la liberación de concentraciones altas de prolactina endógena probablemente via los vasos portales que alcanzan el LCR ó algún sitio de acción hipotálmica, más que la administración sistémica de prolactina. Esta hipótesis fue parcialmente confirmada posteriormente, al demostrar que la administración de VIP además de producir un incremento en la cantidad de sueño MOR produce un incremento en la concentración de prolactina en plasma. Dicho incremento, es inhibido por la administración de anticuerpos contra prolactina, que inhiben el efecto

inductor de sueño del VIP y además la liberación de dicha hormona. Estos resultados sugieren que la prolactina estimula el sueño MOR y que además puede mediar la actividad promolora de sueño de su hormona hipotalámica el VIP (Obál y col., 1994). No obstante, faltan estudios que muestren la participación de diferentes estructuras cerebrales en la modulación de sueño MOR, producida por el VIP.

Con base en estas evidencias, creemos que el VIP es un factor endógeno inductor de sueño de acuerdo a los criterios propuestos por Jouvet en 1984, los cuáles son: 1) ser una sustancia endógena, 2) aumentar durante la privación de sueño; 3) activar los mecanismos del sueño; 4) su efecto debe ser dosis-dependiente; 5) su inactivación debe inducir insomnio y 6) su administración exógena debe incrementar el sueño en sujetos insomnes. Aunque muchos de estos puntos no se han profundizado en la investigación de los efectos del VIP en el sueño, las evidencias experimentales realizadas hasta el momento, apoyan los siguientes: 1) El VIP es una sustancia endógena, que se sintetiza y se libera en el cerebro del gato y de la rata (Obata-Tsuto y col., 1983; Eiden y col., 1982), además de que se ha demostrado de que existen receptores para este péptido en el cerebro de la rata (De Souza y col., 1985; Martín y col., 1987). En cuanto al segundo punto, hemos demostrado que los niveles de VIP en el LCR del 4° ventrículo incrementan después de la PSMOR (Jiménez-Anguiano, y col., 1993). El tercer punto, parece satisfacerse, aunque cabe aclarar que el mecanismo de acción del VIP para la inducción de sueño aún no está completamente claro. Al respecto hemos sugerido que el VIP induce sueño MOR en los gatos insomnes por PCPA activando a los sistemas noradrenérgicos e inactivando a los colinérgicos, lo que supondría entonces una interacción entre sistemas peptidérgicos y de neurotransmisores para que el sueño MOR se presente (Prospero y col., 1990; Drucker-Colín y col., 1990).

En cuanto al cuarto punto, no existe ningún estudio sistemático que demuestre que el efecto del VIP es dependiente de la dosis, pero se ha demostrado que existe una dosis óptima para la inducción de sueño por parte del VIP en gatos, ratas y conejos en condiciones normales y en modelos de insomnio (Riou y col., 1982; Drucker-Colín y col., 1984; Prospero-García y col., 1986; Obál y col., 1988b; 1989). El quinto punto parece cumplirse claramente, ya que se ha demostrado que el efecto inductor de

sueño MOR del LCR de animales PS es bloqueado con anticuerpos anti-VIP (Drucker-Colín y col., 1988). Además, se ha demostrado que el antagonista al receptor del VIP ([4Cl-D-Phe6-Leu17]-VIP12) reduce la cantidad de sueño MOR durante el período de luz del ciclo vigilia-sueño de la rata (Mirmiran y col., 1988). Finalmente, el punto seis se cumple ampliamente, ya que se ha demostrado que el VIP incrementa la cantidad de sueño MOR en animales normales e insomnes, tal como se mencionó anteriormente. Estos resultados apoyan la noción de que el VIP es un factor inductor de sueño.

En conclusión, consideramos que el sueño es un fenómeno difícil de explicar, el cuál es el resultado de una serie de eventos de cascada, de los cuáles diferentes sistemas forman parte, en especial el colinérgico y peptidérgico que inciden sobre diversos grupos neuronales para que éste se presente.

5- CONCLUSIONES

- La PSMOR produce un incremento en la densidad de receptores del VIP en diversas regiones del cerebro anterior y tallo cerebral, involucrados con la regulación del sueño.
- El estrés producido durante la PSMOR, provoca un aumento mayor en la densidad de receptores a VIP, en relación a los animales habituados. Principalmente, en estructuras diencefálicas, en especial, en diversos núcleos talámicos.
- Consideramos, que el sueño es un fenómeno multifactorial, el cuál esta modulado por un sistema complejo, altamente organizado. Posiblemente, el aumento en la densidad de receptores a VIP durante la PSMOR, en diversos núcleos cerebrales, interaccione con diversos circuitos excitatorios, que junto con la participación de algunas hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos, sirvan para regular el ciclo vigilia-sueño.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Engler, D., Moltich, M.E., Bollinger-Gruber, J. y Reichlin, S. Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of prolactin release in the rat. Endocrinology 116: 1383-1390, 1995.
- Abens, J., Westlind, A. y Bartfai, T. Chronic atropine treatment causes increase in VIP receptors in rat cerebral cortex. Peptides 5: 375-377, 1984.
- Acherman, P., Trachsel, L. y Tobler, I. Sleep initiation and sleep intensity: interaction of homeostatic and circadian mechanism. J Biol Rhythms 4: 149-160, 1989.
- Adrien, J., Dugovic, C. Presence of paradoxical sleep (PS) factor in the cerebrospinal fluid of PS-deprived rats. Eur. J.Pharmacol 100: 223-226, 1984.
- Albers, E., Ninanimati, N., Stopa, E. y Ferris, C. Light selectivity alters vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine immunoreactivity within the rat suprachiasmatic nucleus. Brain Res 437: 189-192, 1987.
- Aserinsky, E. y Kleitman, N. Regulatory occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. Science 11: 273-274, 1953.
- Audigier, S., Barberis, C. y Jard, S. Vasoactive Intestinal polypeptide increases inositol phospholipid breakdown in the rat superior ganglion. Brain Res 376: 363-367, 1986.
- Baghdoyan, H., McCarley, R. y Hobson, A. Cholinergic manipulation of brainstem reticular system: effects on desynchronized sleep generation. En: A. Wauquier., J.Monti., M. Gaillard. y M. Radulovacki (Eds). Sleep: Neurotransmitters and neuromodulators. Raven Press, New York. pp: 15-28, 1985.
- Baghdoyan, H., Monaco, A., Rodrigo-Angulo, M., Assen, J., McCarley, R., y Hobson, A. Microinjections of neostigmine in to the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs. Brain Res 414: 245-261, 1987.

- 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.
- Baghdoyan, H., Rodrigo-Angulo, M., McCarley, R. y Hobson, A. A neuroanatomical gradient in pontine tegmentum for the cholinergic induction of desynchronized sleep signs. Brain Res 414: 245-261, 1987.
- Bandler, R. Aggression induced in rats by cholinergic stimulation of hypothalamus. Nature 224: 1035-1036, 1969.
- Bergmann B., Everson, C., Kushida, C., Fang, V., Leitch, C., Schoeller, D. Refetoff, S. y Rechtschaffen, A. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. Sleep 12: 31-41, 1988.
- Besson, J. Distribution and pharmacology of vasoactive intestinal peptide receptors in the brain and pituitary. Ann Acad Sci 527:204-219, 1988.
- Besson, J., Rotsztein, W., Laburthe, M., Epalbaum, J., Beaudet, A., Korrdon, C. y Rosselin, G. Vasoactive intestinal peptide (VIP): Brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in male rats. Brain Res 165: 79-85, 1979.
- Besson, J., Sarrieu, A., Vial, M., Marie, J., Rosselin, G. y Rostene, W. Characterization and autoradiographic distribution of vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat central nervous system. Brain Res 398: 329-336, 1986.
- Borbély, A. y Tobler, I. Homeostatic and circadian principles in sleep regulation in the rat. In D. McGinty, R. Drucker-Colin, A. Morrison y P. Parmeggiani (Eds), Brain Mechanisms of Sleep, Raven Press, New York. 1985, pp. 35-44.
- Borbély, A. y Tobler, I. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. Physiol Rev 69 : 605-670, 1989.
- Brady, L. Stress, antidepressant drugs, and the locus coeruleus. Brain Res Bull 5/6: 545-556, 1994.

- Bremer, F. Historical development on ideas sleep. En: O.Petre-Quadens y J. Schlag (Eds). Basic sleep mechanisms. Academic Press, New York. pp: 3-12, 1974.
- Bredow, S., Kacsóh, B., Obál, F., Fang, J. y Krueger, J.M. Increase of prolactin mRNA in the rat hypothalamus after intracerebroventricular injection of VIP or PACAP. Brain Res 660: 301-308, 1994.
- Brock, J., Hamdi, A., Ross, K., Payne, S. y Prasad, C. REM sleep deprivation alters dopamine D2 receptor binding in the rat frontal cortex. Pharmacol Biochem Behav 52:43-48, 1995.
- Card, J., Fitzpatrick-McElligott, S., Gozes, I. y Baldino, F. Localization of vasopressin, vasoactive intestinal peptide, histidina isoleucine and somatostatin mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. Cell Tissue Res 252: 307-315, 1988.
- Carlquist, M., Jornvall, H., Tatemoto, K. y Mutt, V. A porcine brain polypeptide is identical to the vasoactive intestinal polypeptide. Gastroenterol 83: 245-249, 1982.
- Ceccatelli, S., Villar, M., Goldstein, M. y Hokfelt, T. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter characterized neurons after stress. Proc Natl Acad Sci 86: 9569-9573, 1989.
- Celesia, G. y Jasper, H. Acetylcholine released from cerebral cortex in relation to state of activation. Neurology 16:1053-1063, 1966.
- Cespuglio, R., Chastrette, N., Prevantel, H. y Jouvet, M. Functional relationship for sleep induction. Endogenous sleep factor. En: S. Inoué y J.Krueger (Eds). Endogenous sleep factors. SPB Academic Publishing, Raven Press. pp:87-98, 1990.
- Cespuglio, R., Chastrette, N. y Jouvet, M. Opposite variations of 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) extracellular concentrations measured with voltammetry either in the axonal nerve endings or in the cell bodies of the nucleus raphe dorsalis, throughout the sleep waking cycle. C R Acad Sci (Paris) 307: 817-823, 1988.
- Cespuglio, R., Gómez, M., Faradji, H. y Jouvet, M. Alterations in the sleep-waking cycle induced by cooling of the locus coeruleus area. Electroenceph Clin Neurophysiol 54: 570-578, 1982.

- Cespuglio, R., Marinesco, S., Baubet, V., Bonnet, C., El Kafi, B. Evidence for a sleep-promoting influence of stress. Adv Neuroimmunol 5: 145-154, 1995.
- Chastrette, N. y Cespuglio, R. Influence of proopiomelanocortine derived-peptides on the sleep-waking cycle of the rat. Neurosci Lett 62: 365-370, 1985.
- Chastrette, N., Cespuglio, R. y Jouvét, M. Proopiomelanocortina (POMC)-derived peptides and sleep in the rat. Part I. Hypnogenic properties of ACTH derivatives. Neuropeptides 15: 61-74, 1990.
- Chee, C., Roozendaal, B., Swaab, D., Goudsmit, E. y Mirmiran, M. Vasoactive intestinal polypeptide neuron changes in the senile rat. Neurobiol Aging 9: 307-312, 1988.
- Chen, X. y Herbert, J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. Neuroscience 64: 675-685, 1995.
- Coenen, A. y Van Lujtelaar, E. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. Physiol Behav 35: 501-504, 1985.
- Corsi-Cabrera, M., Ponce de León, M., Juárez, J. y Ramos, J. Effects of paradoxical sleep deprivation and stress on the waking EEG of the rat. Physiol and Behav 55: 1021-1027, 1994.
- Datta, S. Neuronal activity in the peribrachial area: Relationship to behavioral state control. Neurosci Behav Rev 19: 67-84, 1995.
- Datta, S., Calvo, J.M., Quattrochi, J. y Hobson, A. Long-term enhancement of REM sleep following cholinergic stimulation. Neuroreport 2: 619-622, 1991.
- Delorme, F., Jeanneroid, M. y Jouvét, M. Effects remarquables de la reserpine sur l'activité EEG phasique pontogéniculooccipitale. C R Soc Biol 159: 900-903, 1965.
- Dement, C. The biological role of REM sleep. En. A. Kales (Ed). Sleep: Physiology and pathology. Cippincott, Philadelphia. pp: 245-265, 1969.

- Dement, C., Henriksen, S. y Ferguson, J. The effect of the chronic administration of paraclorophenylalanine (PCPA) on sleep parameters in the cat. En: J. Barchas y E. Usdin (Eds). Serotonin and Behavior. Academic Press, New York, 1973. pp: 414-424.
- De Souza, E., Seifert, H. y Kuhar, M. Vasoactive intestinal peptide receptor localization in rat forebrain by autoradiography. Neurosci Lett 56: 113-120, 1985.
- Domino, E. y Stawiski, M. Effect of cholinergic antisyntesis agent HC-3 on the awake-sleep cycle of the cat. Psychophysiol 7: 107-144, 1970.
- Drucker-Colín, R. The function of sleep is to regulate brain excitability in order to satisfy the requirements imposed by waking. Behav Brain Res 69: 117-124, 1995.
- Drucker-Colín, R. y Bernal-Pedraza, J. Kainic acid lesions of gigantocellular tegmental field (FTG) neurons does not abolish REM sleep. Brain Res 272: 387-391, 1983.
- Drucker-Colín, R., Bernal-Pedraza, J., Fernández-Cancino, F. y Oksenberg, A. Is vasoactive intestinal polypeptide (VIP) a sleep factor? Peptides 5: 837-840, 1984.
- Drucker-Colín, R. y Gutiérrez, M.C. Effects of forebrain lesions on release of protein from the midbrain reticular formation during the sleep-wake cycle. Exp Neurol 52 : 339-344, 1978.
- Drucker-Colín, R. y Prospero-García, O. Microinjection of carbachol into the pontine area is unable to modify insomnia induced by parachlorophenilalanine (PCPA). Brain Res 462: 163-166, 1988.
- Drucker-Colín, R. y Prospero-García, O. Neurophysiology of sleep. En: M.Thorpy (Ed). Handbook of sleep disorders. Marcel Dekker, New York, pp:33-53, 1990.
- Drucker-Colín, R., Prospero-García, O., Arankowsky-Sandoval, G., Jiménez-Anguiano, A. y Merchant, H. The regulation of REM sleep: Some considerations on the role of vasoactive intestinal peptide, acetylcholine and sensory modalities. En: M. Mancía. G. Manini (Eds). The diencephalon and sleep. Raven Press, New York, pp. 313-330, 1990.
- Drucker-Colín, R., Prospero-García, O., Arankowsky-Sandoval, G y Pérez-Montfort, R. Gastropancreatic peptides and sensory stimuli as REM sleep factors. En: Inoué S.,

- Schneider-Helmert, D., (Eds). Sleep Peptides: Basic and clinical approaches. Tokyo: Japan Scientific Society Press and Springer Verlag. 73-94, 1988.
- Drucker-Colín, R., Rojas-Ramírez, J.A., Vera-Trueba, J., Monroy-Ayala, G. y Hernández-Peón, R. Effects of crossed perfusion of the midbrain reticular formation upon sleep. Brain Res 23 : 269-273, 1970.
 - Drucker-Colín, R., Spanis, C.W., Cotman, C. y McGaugh J.L. Changes in protein levels in perfusates of freely moving cats: relation to behavioral state. Science 197 : 963-965, 1975 a.
 - Drucker-Colín, R., Spanis, C.W., Hunyadi, J., Sassin, J.F. y McGaugh J.L. Growth hormone effects on sleep and wakefulness in the rat. Neuroendocrinol 18: 1-8, 1975 b.
 - Drucker-Colín, R., Tuena de Gómez Puyou., Gutiérrez, M.C. y Dreyfus Cortés, G. Immunological approach to the study of neurohumoral sleep factors: effects on REM sleep of antibodies to brain stem proteins. Exp Neurol 69 :563-575, 1980.
 - Drucker-Colín, R. y Valverde, C. Endocrine and peptide functions in the sleep-waking cycle. En: D.Ganten y Paff.D. (Eds). Current topics in Neuroendocrinology. Springer, N.Y. pp: 37-81, 1982.
 - Dusan-Peyrethon, D. y Froment, J. Effets du disulfiram sur les états de sommeil chez le chat. C R Soc Biol (Paris) 162: 2144-2145, 1968.
 - Ebeid, M., Attia, R., Sundaran, P. y Fisher, J. Release of vasoactive intestinal peptide in the central nervous system in man. Amer J Surg 137: 123-127, 1979.
 - Ebeid, M., Smith, R., Scourrou, J., Murray, P. y Fisher, E. Increased immunoreactive VIP in the cerebrospinal fluid (CSF) of dogs and monkeys in hepatic failure. J Surg Res 20: 538-541, 1978.
 - Eiden, L., Nilaver, G. y Palkovitz, M. Distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat brain stem nuclei. Brain Res 231: 472-477, 1982.
 - El Kafi, B., Cespuglio, R., Leger, L., Marinesco, S. y Jouvet, M. Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides possessing hypnogenic properties?. Brain Res 637: 211-221, 1994.

- El Mansari, M., Sakai, K. y Jouvet, M. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle of freely moving cats. Exp Brain Res 76: 519-529, 1989.
- Emson, C., Gilbert, T., Loren, J., Fahrenkrug, J., Sundler, E. y Schaffalitzky, B. Development of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) containing neurons in the rat brain. Brain Res 177: 437-444, 1979.
- Ernst, A. y Schoenenberger, A. DSIP: Basic findings in humans beings. En: S. Inoue y Schneider-Helmert (Ed). Sleep peptides. Basic and clinical approaches. Verlag. Tokio. pp:131-173, 1988.
- Eskin, A., Corrent, G., Lin, C. y McAdoo, D. Mechanism for shifting the phase of a circadian rhythm by serotonin involvement of cAMP. Proc Natl Acad Sci 79: 660-664, 1982.
- Espejel, R.M. Administración crónica de un inhibidor de la síntesis de proteínas sobre el ciclo vigilia-sueño. Tesis de Licenciatura. (Dir. R. Drucker-Colín). México, Fac. Ciencias. UNAM. 1980.
- Eva, C., Meek, J.L. y Costa, E. Vasoactive Intestinal peptide which coexist with acetylcholine decreases acetylcholine turnover in mouse salivary glands. J Pharmac Exp Theor 232: 267-269, 1981.
- Fahrenkrug, J., Schaffalitzky, B. y Fahrenkrug, A. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebrospinal fluid. Brain Res 14: 179-188, 1977.
- Fang, J., Payne L. y Krueger, J. (1995). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide enhances rapid eye movement sleep in rats. Brain Res 686: 3-28, 1995.
- Fencí, V., Koski, G. y Pappenheimer, J. Factors in cerebrospinal fluid from goats that affect sleep and activity in rats. J Physiol 216: 565-589, 1971.
- Froment, L., Petitjean, F., Bertrand, N. y Jouvet, M. Effects del injection intracérébrale de 5, 6-hydroxitriptamine sur les monoamines cérébrales et les états de sommeil du chat. Brain Res 67: 405-409, 1974.

- Gadea-Ciria, M., Städler, H., Lloyd, K. y Bartholini, G. Acetylcholine release within the cat striatum during the sleep wakefulness cycle. Nature 243:513-520, 1973.
- Gaillard, J. Neurotransmission and receptor pharmacology. En: Medicine of Sleep. J. Gaillard. (Ed). 198-201, 1987.
- García-Araras, J. y Pappenheimer, J. Site of action of sleep-inducing muramyl peptide isolated from human urine: microinjection studies in rabbit brain. J Neurophysiol 49: 528-533, 1983.
- Gavalda, A., Benyassi, A., Arancibia, S. y Armario, A. Chronic but not acute exposure to stress is associated with hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) release into median eminence. J Neuroendocrinol 5: 421-425, 1993.
- Giachetti, N., Rotsztein, W., Laburthe, M., Epelbaum, J., Beaudet, A., Kordon, C. y Rosselin, G. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): Localization and release from isolated nerve terminals. Proc Natl Acad Sci . 74: 3424-3428, 1977.
- Gilbert, K. y Lydic, R. Muscarinic cholinceptive reticular mechanisms and parabrachial neuron discharge: a novel experimental approach. Neuroreport, 4: 271-274, 1993.
- Gnadt, J. y Pegram, G. Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. Brain Res. 384: 29-91, 1986.
- Goldstein, R. y Pratta D. Sleep in cat: raphe dorsalis and vasotocin. Sleep 7: 373-379, 1984.
- González, M., Debilly, G., Valatx, J.L. y Jouvet, M. Sleep increase after immobilization stress: role of noradrenergic locus coeruleus system in the rat. Neurosci Lett. 202: 5-8, 1995.
- González, M., Valatx, J., Paut, L., Kitahama, K. y Jouvet, M. Role of the locus coeruleus on the mechanism of the sleep rebound. J Sleep Res . 3: 92, 1994.
- Gozes, I., Shachter, P., Shani, Y. y Giladi, E. Vasoactive intestinal peptide gene expression from embryos to aging rats. Neuroendocrinology 47: 27-31, 1988.
- Gozes, I., Hill, J., Mervis, F., Fridkin, M. y Breneman, D. VIP antagonist produces neuronal damage and retardation of behavioral development in neonatal rats. Brain Res

- Gozes, I. y Breneman, E. VIP: Molecular and neurobiological function. Mol Neurobiol. 3: 201-236, 1989.
- Gozes, I. y Breneman, E.D. Neuropeptides as growth and differentiation factors in general and VIP in particular. Journal of Molecular Neuroscience 4: 1-9, 1993.
- Gray, T. Amygdala: Role in autonomic and neuroendocrine responses to stress. En: T. Burks (Ed). Stress, neuropeptides and system disease. pp:37-53, 1991.
- Guldner, F. Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. Cell Tiss Res 165: 509-544, 1976.
- Guldner, F. Structure and neuronal connections of the suprachiasmatic nucleus. En: Redford, P. (Ed). Circadian rhythms in the central nervous system. WCH Publishers, U.S.A. pp: 29-41, 1985.
- Harmar, T. y Lutz, E. Multiple receptors for PACAP and VIP. TIPS, 15: 1114-118, 1994.
- Hartman, E. The 90 minute sleep dream. Arch Gen Psychiat. 18: 280-286, 1968.
- Hazra, J. Effect of hemicholinium-3 on slow wave and paradoxical sleep of cat. Eur J Pharmacol .11: 395-397, 1970.
- Hedlund, B., Abens, J. y Bartfai, T. Vasoactive intestinal polypeptide and muscarinic receptors: supersensitivity induced by long-term atropine treatment. Science. 220: 519-521, 1983.
- Hernández-Peón, R. y Chávez-Ibarra, G. Sleep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain. Electroencepha Clin Neurophysiol. 24: 188-198, 1963
- Hernández-Peón, R. Central neuro-humoral transmission in sleep and wakefulness. En: K. Akert., C. Bally., J.P. Schade. (Eds). Progress in brain research. Elsevier, Amsterdam, 116-117, 1965.
- Hess, R. Das Schlafsynarom als folge dienzephafer reizung. Helv Physiol Pharmacol Acta. 2: 305-344, 1944.
- Hilakivi, Y. The role of beta and alpha adrenoceptors in the regulation of the stages of sleep-waking cycle in the cat. Brain Res .277: 109-118, 1983.

- Hilakivi, Y. y Leppavuori, A. Effect of methoxamine, an alpha-1 adrenoreceptor agonist, and prazosin, an alpha-1 antagonist, on the stages of the sleep-waking cycle in the rat. Acta Physiol Scand 120: 363-372, 1984.
- Hobson, J.A., Datta, S., Calvo, J.M., y Quattrochi, J. Acetylcholine as a brain state modulator triggering and long-term regulation of REM sleep. Prog Brain Res. 98 : 389-404, 1993.
- Hobson, J., Goldberg, M., Vivaldi, E. y Riew, D. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjection of the muscarinic agonist bethanecol. Brain Res. 275: 127-136, 1983.
- Hobson, A., McCarley, R., Freedman, R. y Pivik, R. Time course of discharge rate changes in cat pontine brainstem neurons during the sleep cycle. J Neurophysiol. 37: 1297-1309, 1974.
- Hobson, A. y McCarley, R. Sleep cycles oscillation: a reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. Science. 189: 55-58, 1975.
- Honda, K., Komoda, Y., Nishida, S., Nagasaky, H., Higashi, A., Uchizono, K. e Inoué, S. Uridine as an active component of the sleep promoting substance: its effect on nocturnal sleep in rats. Neurosci. Res. 1: 243-252, 1984.
- Houdoin, F., Cespuglio, R., Gharib, A. y Jouvet, M. Detection of the release of 5-hydroxyindole compounds in the hypothalamus and the n.raphe dorsalis throughout the sleep waking cycle and during stressful situations in the rat: A polygraphic and voltammetric approach. Exp Brain Res. 85: 153-162, 1991.
- Inoué, S., Klmura, M., Honda, K. y Komoda, Y. Sleep peptides: General and comparative aspects. En: Inoué, S., y Schnelder-Helmert, D. (Eds). Sleep peptides: Basic and clinical approaches. Tokyo: Japan Scientific Society Press and Springer Verlag. 73-94, 1988.
- Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K. y Nagata, S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide Neuron. 8: 811-819, 1992.

- Jacobs, B. y Jones, B. The role of central monoamine and acetylcholine systems in sleep-wakefulness states: mediation or modulation?. En. L. Butcher (Ed). Monoaminergic-cholinergic interactions in the brain. Academ Press. New York. pp: 271-290, 1978.
- Jasper, H. y Tessier, J. Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical sleep. Science 177:601-602, 1971.
- Jiménez-Anguiano, A., Báez-Saldaña, A. y 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.
- Jones, B. Elimination of paradoxical sleep by lesion of the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. Neurosci Lett 13: 285-293, 1979.
- Jones, B. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. Neurosci, 40: 637-656, 1991.
- Jouvet, M. Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. Arch Ital Biol 100: 125-206, 1962.
- Jouvet, M. Neurophysiology of the states of sleep. Physiol Rev. 47 : 117-177, 1967.
- Jouvet, M. Biogenic amines and the states of sleep. Science. 163: 32-41, 1969
- Jouvet, M. y Moruzzi, G. Neurophysiology and neurochemistry of sleep and wakefulness. Springer-Verlag, N.Y. pp.534, 1972.
- Jouvet, M. y Renault, J. Insomnie persistante apres lesion des noyaus du rafe chez le chat. C R Soc Biol (Paris) 160: 1461-1465, 1966.
- Jouvet, D., Vimont, P., Delorme, F. y Jouvet, M. Etude de la privation selective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. C R Soc Biol. 158: 756-759, 1984.
- Jouvet, M. Neuromediateurs et facteurs hypnogenes. Rev Neurol (Paris). 140: 389-407, 1984.
- Kaji, H., Chihara, K., Minamitani, N., Kodama, H., Yanaihara, N. y Fujita, J. Release of vasoactive intestinal polypeptide into the cerebrospinal fluid of the fourth ventricle on the rat: involvement of cholinergic mechanism. Brain Res .269: 303-310, 1983.

- Kaneko, T., Cheng, F., Oka, H., Oda, T., Yanaihara, N. y Yanaihara, C. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates adenylate cyclase and serotonin N-acetyl-transferase activities in rat pineal in vitro. Biomed Res. 1: 84-87, 1980.
- Kant, J., Pastel, R., Bauman, R., Meininger, G., Maughan, K., Robinson, T., Wright, W. y Covington, P. Effects of chronic stress on sleep in rats. Physiol and Behav 57: 359-365, 1995.
- Kapás, L., Obál, F. y Krueger, J.M. Humoral regulation of sleep. International Review of Neurobiology, 35: 131-160, 1993.
- Karacan, Y. Rosebloom, A., Williams, R., Finley, W. y Hurich, C. Slow wave sleep deprivation in relation to plasma growth hormone concentration. Physicians Drug Manual. 2:104-107, 1971.
- Kastin, A., Castellous, P., Banks, W. y Coy, D. Radioimmunoassay of DSIP-like material in human blood: possible protein binding. Pharmacol Biochem Behav. 3: 691-695, 1978.
- Kato, N., Nagasaky, S., Takahashi, Y., Namuro, I. y Saito, Y. DSIP-like material in rat brain, human cerebrospinal fluid and plasma as determined by enzyme immunoassay. En. S. Inoue y A. Borbely. (Eds). Endogenous sleep substance and sleep regulation. Tokyo. pp: 141-153, 1985.
- Kawakami, F., Okamura, H., Inatomi, T., Tamada, Y., Nakajima, T. y Iyata, Y. Serotonin depletion by p-chlorophenylalanine decreases VIP mRNA in the suprachiasmatic nucleus. Neurosci Lett, 174: 81-84, 1994.
- Kawataní, M., Rutigliano, M. y De Groat, W. Selective facilitatory effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on muscarinic firing in vesical ganglion of the cat. Brain Res 336: 223-224, 1985.
- Kiss, J., Lóranth, C. y Halasz, B. Serotonergic endings on VIP-neurons in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopy-immunocytochemistry. Neurosci Lett 44: 119-124, 1984.

- Koella, P., Feldstein, A. y Czigman, F. The effect of parachlorophenylalanine on the sleep of cats. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 25: 481-490, 1968.
- Krueger, J. Endogenous sleep factors. En: A. Wauquier. (Ed). Sleep: Neurotransmitters and neuromodulators. Raven Press, New York. Pp: 319-331, 1985 a.
- Krueger, J., Walter, J. y Levin, C. Factor S and related somnogens: an immune theory for slow-wave-sleep. En: D. McGinty (Ed). Brain Mechanisms of sleep. Raven Press, New York. pp: 253-276, 1985b.
- Krueger, J. y Karnovsky, M. Sleep and the immune response. Ann NY Acad Sci. 496: 510-516, 1987.
- Krueger, J., Pappenheimer, J. y Karnovsky, M. The composition of sleep-promoting factor isolated from human urine. J Biol Chem. 257:1664-1669, 1982.
- Kruisbrink, J., Mirmiran, M., Van der Woude, T. y Boer, G. Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or VIP on circadian sleep-wake rhythm in the rat. Brain Res. 419: 76-87, 1987.
- Kodama, T., Takahashi, Y., y Honda, Y. Enhancement of acetylcholine releasing during paradoxical sleep in dorsal tegmental field of the cat brain stem. Neurosci Lett., 114: 277-282, 1990.
- Laburthe, M. y Couvineau, A. Molecular analysis of vasoactive intestinal peptide receptors: a comparison with receptors for VIP-related peptides. Ann NY Acad Sci. 527: 296-313, 1988.
- Laguzzi, R., Petitjean, F., Pujol, J. y Jouvet, M. Effets de l' injection intraventriculaire de 6-hydroxydopamine. II. Sur le cycle veille-sommeils du chat. Brain Res. 403: 249-257, 1987.
- Lanerolle, N.C., Gunel, M., Sundaresan, S., Shen, M.Y., Brines, M.L., y Spencer, D.D. Vasoactive Intestinal Polypeptide and its receptor changes in human temporal lobe epilepsy. Brain Res. 686: 182-193, 1995.
- Larsson, L., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky, O., Sundler, F., y Hakanson, R. Localization of VIP to central and peripheral neurons. Proc Natl Acad Sci. 73: 3197-3200, 1976.

- Leveston, S. y Cryer, P. Endogenous cholinergic modulation of growth hormone secretion in normal and acromegalic humans. Metabolism. 29: 703-706, 1980.
- Luine, V.N., Rostene, W., Rhodes, J. y McEwen, B.S. Activation of choline acetyltransferase by vasoactive intestinal peptide. J Neurochem. 42: 1131-1134, 1984.
- Lundberg, J., Angard, A., Fahrenkrug, J., Lundgren, C. y Holmstedt, B. Co-release of VIP and acetylcholine in relation to blood flow and salivary secretion in cat submandibular salivary gland. Acta Physiol Scand. 115: 525-528, 1982.
- Lundberg, J., Hedlund, B. y Bartfai. Vasoactive intestinal polypeptide enhances muscarinic ligand binding in cat submandibular salivary gland. Nature. 295: 147-149, 1982 b.
- Lundberg, M., Hokfelt, T., Schultzberg, K., Uvnas-Wallensten, Kohler, C. y Said, S.I. Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: Evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. Neurosci, 4:1539-1550, 1979.
- Lutz, M., Sheward, K., West, J., Morrow, G., Fink, A. y Harmar, A. The VIP₂ receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. FEBS Lett. 334: 3-8, 1993.
- Lydic, R. y Baghdoyan, H.A. Pedunculopontine stimulation alters respiration and increases Ach release in the pontine reticular formation. Am J Physiol. 264: 544-54, 1993.
- McCarley, R. y Massaquoi, S. Neurobiological structure of the revised limit cycle reciprocal interaction model of REM sleep cycle control. J Sleep Res 1: 132-138, 1992.
- Madsen, P.L., Holm, S., Vorstrup, S., Friberg, L., Lassen, N.A. y Wildschjodtz, G. Human regional cerebral blood flow during REM sleep. J Cereb Blood Flow Metab. 11: 502-507, 1991.
- Maggistretti, P.J. VIP neurons in the cerebral cortex. TIPS 11: 250-254, 1990.
- Mathotra, K., Wakade, D. y Wakade, R. Vasoactive intestinal polypeptide and muscarinic mobilize intracellular Ca⁺⁺ through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. J Biol Chemistry. 263: 2123-2126, 1988.

- Mallick, B., Siegel, J. y Fahringer, H. Changes in pontine unit activity with REM sleep deprivation. Brain Res . 515: 94-98, 1989.
- Mallick, B. y Thakkar, M. Short-term REM sleep deprivation increases acetylcholinesterase activity in the medula of rats. Neurosci Lett . 130: 221-224, 1991.
- Mark, J., Heiner, L. y Mendel, P. Norepinephrine turnover in brain and stress reactions in rats during paradoxical sleep deprivation. Life Sci. 8: 1085-1093, 1963.
- Martin, L., Diell, M., Hoff, R., Palacios, J. y Magistretti, J. Autoradiographic mapping of [mono [125] iodo-Tyr] vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat brain. Neurosci . 23: 539-565, 1987.
- Matsumoto, J. y Watanabe, S. Paradoxical sleep: effects of adrenergic blocking agents. Proc Jpn Acad 43: 680-683, 1967.
- McCormick, D. Cellular mechanisms underlying: cholinergic and noradrenergic modulation of the neuronal firing mode in the cat and guinea pig dorsal lateral geniculate nucleus. J Neurosci. 12: 278-289, 1992.
- McGinty, D. y Harper, R. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. Brain Res. 101: 569-575, 1976.
- McGinty, D. y Symusiak, R. Neuronal unit activity patterns in behaving animals: brainstem and limbic system. Ann Rev Psychol. 39: 135-168, 1988.
- McGregor, G.P., Woodhams, P.L., O Shaughnessy, D., Ghatei, M.A., Polak, J.M. y Bloom S.R. Developmental changes in bombesin, substance P, somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in the rat brain. Neurosci Lett. 28: 21-29, 1982.
- Mendelson, B., Gillin, C. y Wyatt, J. Studies with the delta sleep-inducing peptide in the rat. Sleep Res. 9: 55, 1980.
- Mendelson, B., Sitaram, N., Wyatt, J., Gillin, C. y Jacobs, S. Methscopolamine inhibition of sleep related GH secretion: Evidence for a cholinergic secretory mechanism. J Clin Invest. 61: 1683-1690, 1978.

- Mendelson, B., Slater, G., Gold, P. y Gillin, C. The effect of growth hormone administration on human sleep: a dose response study. Biol Psychiatry. 15: 613-616, 1980.
- Merchant-Nancy, H., Vázquez, J., García, F. y Drucker-Colin, R. Brain distribution of c-Fos expression as a result of prolonged rapid eye movement (REM) sleep period duration. Brain Res. 681: 15-22, 1995.
- Mirmiran, M., Kruisbrink, J., Bos, N.P.A., Van der Werf, D. y Boer, G.J., Decrease of rapid-eye-movement sleep in the light by intraventricular application of a VIP-antagonist in the rat. Brain Res, 485: 192-194, 1988.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R., M., Minamino, N., Uehara, A., Jang, L., Culler, M.D. y Coy, D.H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylyl cyclase in pituitary cells. Biochem Biophys Res Commun., 164: 567-574, 1989.
- Mo, N. y Dun, J. Vasoactive intestinal polypeptide facilitates muscarinic transmission in mammalian sympathetic ganglia. Neurosci Lett. 52: 19-23, 1984.
- Mogilnicka, E., Przewlocka, B., Van Luijckelaar, E., Klimek, V. y Coenen, M. Effects of REM sleep deprivation on central alpha1 and beta-adrenoceptors in rat brain. Pharmacol Biochem Behav. 25:329-332, 1986.
- Monnier, M. y Hosli, L. Dialysis of sleep and waking factors in blood of the rabbit. Science . 146: 796-798, 1964.
- Monnier, M., Dudler, L. y Schoenenberger, F. Humoral transmission of sleep. VIII. Effects of the sleep factor on cerebral motor and visceral activities. Pluegers Arch. 345: 23-35, 1973.
- Monnier, M., Koller, T. y Graber, S. Humoral influences of induced sleep and arousal upon electrical brain activity of animals with crossed circulation. Exp Neurol. 8: 264-277, 1963.
- Morin, A., Denoroy, L. y Jouvet, M., Daily variations in concentration of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in discrete brain areas of the rat. Brain Res, 538: 136-140, 1990.

- Morin, A., Denoroy, L. y Jouvét, M. Effect of paradoxical sleep deprivation of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in discrete brain areas and anterior pituitary of the rat Brain Res Bull 28: 655-661, 1992.
- Morin, A., Moysé, E., Denoroy, L. y Jouvét, M. VIP binding sites in adult rat hypothalamus: nuclear distribution and daily variations. Peptides 15: 117-123, 1994.
- Mouret, J., Froment, J. Bobillier, P. y Jouvét, M. Etude neuropharmacologique et biochimique des insomnies provoquées par la PCPA. J Physiol 59: 463-468, 1967.
- Morgane, P. Chemical mapping of hypnogenic and arousal systems in the brain. Psychophysiology 6: 219-221, 1969.
- Moruzzi, G. y Magoun, H. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. Electroenceph Clin Neurophysiol 1: 455-473, 1949.
- Murakami, M., Vinayek, R., Jensen, R. y Gardner, J. Carbachol-induced down-regulation of high-affinity receptors for vasoactive intestinal peptide. Am J Physiol 257: G402-408, 1989.
- Nagasaky, H., Iriki, M., Inoue, S. y Uchizono, K. The presence of a sleep promoting material in the brain of sleep-deprived rats. Proc Jpn Acad 50: 241-246, 1974.
- Nagasaky, H., Iriki, M. y Uchizono, K. Inhibitory effect of the brain extracted of sleep deprived rat (BE-SDR) on the spontaneous discharges at crayfish abdominal ganglion. Brain Res 109: 202-205, 1976.
- Nagasaky, H., Kitahama, K., Valatx, J. y Jouvét, M. Sleep promoting effect of the sleep-promoting substance (SPS) and delta sleep-inducing peptide (DSIP) in the mouse. Brain Res 192: 276-280, 1980.
- Naito, P., Paanav, R. y Kollar, E. Psychophysiological changes after prolonged deprivation of sleep. Biol Psychiat 3: 309-320, 1971.
- Nauta, H. Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. J Neurophysiol 9: 285-316, 1946.
- Nilsson, Ch., Lindvall-Axelsson, M. y Owman, Ch. Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid. Brain Res Rev 17: 109-138, 1992.

- Nuñez, G., Tufik, S. y Nabrega, J. Decreased muscarinic receptor binding in rat brain after paradoxical sleep deprivation: an autoradiographic study. Brain Res. 645: 247-252, 1994.
- Obál, F. Effects of peptides (DSIP, DSIP analogues, VIP, GRF and CCK) on sleep in the rat. Clin Neuropharmacol. 9: 459-461, 1986a
- Obál, F., Alfoldi, A., Cady, B., Johansen, L., Sary, G. y Krueger, J.M. Growth hormone-releasing factor enhances sleep in rats and rabbits. Am J. Physiol., 255 R310-316, 1988.
- Obál, F., Sary, G., Alfoldi, P. y Rubicksek, G. Vasoactive intestinal polypeptide promotes sleep without effects of brain temperature in rats at night. Neurosci Lett., 64: 236-240, 1986b.
- Obál, F., Opp, M., Cady, B., Johansen, L. y Krueger, J.M. Prolactin, Vasoactive intestinal peptide and peptide histidine methionine elicit selective increases in REM sleep in rabbits. Brain Res., 490: 292-300, 1989.
- Obál, F., Payne, L., Kacsóh, B., Opp, M.R., Kapás, L., Grosvenor, C. y Krueger, J.M. Involvement of prolactin in the REM sleep promoting activity of systemic vasoactive intestinal peptide (VIP). Brain Res., 645: 143-149, 1994.
- Obata-Tsuto, H.L., Okamura, H., Tsuto, T., Terubayashi, H., Fukui, K., Yanaiharu, N., e Iyata, Y. Distribution of the VIP-like immunoreactivity neurones in the cat central nervous system. Brain Res. Bull. 10: 653-660, 1983.
- Ogawa, B. y Kawamura, N. Increase of multiple unit activity during slow wave sleep in the cat preoptic area.
- Orr, W.C., Vogel, G.W., Stahl, M.L., Griffiths, W.J., y Seely, J.R. Sleep patterns in growth hormone deficient children and age-matched controls: developmental considerations. Neuroendocrinol. 24: 347-352, 1977.
- Oswald, Y. Human proteins, drugs and dreams. Nature. 223: 893-897, 1969.
- Pacheco-Cano, M., García-Hernández, F., Prospero-García, O. y Drucker-Colín, R. Vasoactive intestinal polypeptide induces REM recovery in insomniac forebrain lesioned cats. Sleep 13: 297-303, 1990.

- Paul, S. y Said, S. Characterization of receptors for vasoactive intestinal peptide solubilized from the lung. J Biol Chem. 262: 158-162, 1987.
- Pappenheimer, J., Miller, T y Goodrich, C. Sleep promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep deprived goats. Proc Nat Acad Sci. 58: 543-547, 1967.
- Pedigo, N. Neurotransmitter receptor plasticity in aging. Life Sciences. 55: 1985-1991, 1994.
- Peters, R., Evans, S., Page, D., Hall, T., Gibbs, J., Dieguez, C. y Scanlon. Cholinergic muscarinic receptor blockade with pirenzepine abolishes slow wave sleep related growth hormone release in normal adult males. Clinical Endocrinol. 25:213-217, 1986.
- Petit, M., Denoroy, L. y Jouvét, M. Effects of chronic atropine administration on regional vasoactive intestinal polypeptide concentrations in rat brain. Eur J Pharmacol . 212: 79-85, 1992.
- Petit, J., Luppi, P., Peyron, Ch., Rampon, C. y Jouvét, M. VIP-like immunoreactive projections from the dorsal raphe and caudal linear raphe nuclei to the bed nucleus of the stria terminalis demonstrated by a double immunohistochemical method in the rat. Neurosci Lett. 193: 77-80.
- Petitjan, F., Buda, C., Janin, M., Sallanon, M. y Jouvét, M. Insomnie par administration de parachlorophénylalanine réversible par injection périphérique ou centrales de 5-hydroxytryptophane et de sérotonine. Sleep. 8: 57-57, 1985.
- Pieron, H. Le problème physiologique du sommeil. Masson, Paris, 1913.
- Porkka-Heiskanen, T., Smith, S., Taira, T., Urban, J., Levine, J., Turek, F. y Stenberg, D. Noradrenergic activity in rat brain during rapid eye movement sleep deprivation and rebound sleep. Am J Physiol 268: R1456-63, 1995.
- Prospero-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.

- Prospero-García, O., Jiménez-Anguiano, A. y Drucker-Colín, R. "Factores inductores de sueño". En: G. Buela y J. Navarro (Eds). Avances en la investigación del sueño. Siglo XXI. España. pp: 105-126, 1990.
- Prospero-García, O., Jiménez-Anguiano, A. y Drucker-Colín, R. The combination of VIP and atropine induces REM sleep in cats rendered insomniac by PCPA. Neuropsychopharmacol., 8: 387-390, 1993a.
- Prospero-García, O., Jiménez-Anguiano, A. y Drucker-Colín, R. Chloramphenicol prevents carbachol-induced REM sleep in cats. Neurosci Lett. 154: 168-170, 1993b.
- Pujol, F., Mouret, J., Jouvet, M. y Glowinsky, J. Increased turnover of cerebral norepinephrine during rebound of paradoxical sleep in the rat. Science. 159: 112-114, 1969.
- Quattrochi, J., Mamelak, A., Madison, R., Macklis, J. y Hobson, A. Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorecent microspheres. Science 245: 984-986, 1989.
- Quik, M., Iversen, L. y Bloom, R. Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and other peptides on cAMP accumulation in rat brain. Biochem Pharmacol. 27: 2209-2213, 1978.
- Radulovacki, M. Pharmacology of the adenosine system. En: Kales, A (Ed). Pharmacology of sleep. Springer-Verlag, Berlin. pp: 307-322, 1996.
- Rampin, C., Cespuglio, R., Chastrette, N. y Jouvet, M. Immobilization stress induces a paradoxical rebound in rat. Neurosci Lett. 126: 113-118, 1991.
- Ranson, S. Somnolence caused by hypothalamus lesion in the monkey. Arch Neurol Psychiat. 41: 1-23, 1939.
- Retschaffen, A. y Kales, A. A manual of standardized terminology techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. BIs/Bri, UCLA, Los Angeles, CA, 1968.
- Riou, F., Cespuglio, R. y Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat I. Neuropeptides: 2: 248-254, 1982.

- Riou, F., Cespuglio, R. y Jouvét, M. Endogenous peptides and sleep in the rat II. Peptides without significant effect on the sleep-waking cycle. Neuropeptides: 2: 255-264, 1982.
- Riou, F., Cespuglio, R. y Jouvét, M. Endogenous peptides and sleep in the rat III. The hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide. Neuropeptides 2: 265-277, 1982.
- Roffwarg, H., Muzio, J. y C. Dement. Ontogenetic development of the human sleep dream cycle. Science. 152: 604-619, 1966.
- Rojas-Ramírez, J.A. y Drucker-Colín, R. Sleep induced by spinal cord cholinergic stimulation. Int J Neurosci, 5: 215-221.
- Rojas-Ramírez, J.A., Aguilar-Jiménez, E., Posadas-Andrews, A., Bernal-Pedraza, J., y Drucker-Colín, R. The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep-wake cycle of rat. Psychopharmacol., 53: 147-150, 1977.
- Roky, R., Valatx, J.L. y Jouvét, M. Effects of prolactin on the sleep-wake cycle in the rat. Neurosci Lett. 156: 117-120, 1993.
- Said, S. (Ed). Vasoactive Intestinal Polypeptide, Raven, N.Y. 1982.
- Said, S. Vasoactive Intestinal Polypeptide: Biological role in health and disease. TEM 2: 107-112, 1991.
- Said, S. y Mutt, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. Science 169: 1217-1218, 1970.
- Said, S. y Rosenberg, N. Vasoactive intestinal polypeptide abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. Science .192: 907-908, 1976.
- Sakai, K. Some anatomical and physiological properties of pontomesencephalic tegmental neurons with special reference to the PGO waves and postural atonia during paradoxical sleep in the cat. En: A. Hobson y B. Brazier (Eds). The reticular formation revisited . Raven Press, N.Y. pp: 427-477, 1980.
- Sakai, K. Executive mechanisms of paradoxical sleep. Arch Ital Biol . 126: 239-257, 1988.
- Sastre, J.P., Sakai, K. y Jouvét, M. Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep?. Brain Res 229: 147-161, 1981.

- Sallanon, M., Buda, C., Janin, M. y Jouvet, M. Restoration of paradoxical sleep by cerebrospinal transfer to PCPA pretreated insomniac cats. Brain Res. 251: 137-147, 1982.
- Sallanon, M., Buda, C., Janin, M. y Jouvet, M. Implications of serotonin in sleep mechanisms: induction, facilitation. En: A. Wauquier., J. Monti., J. Gaillard. y Radulovacki, M. (Eds). Sleep: Neurotransmitters and neuromodulators. Raven Press. New York. pp: 136-159, 1985.
- Sallanon, M., Janin, M., Buda, C. y Jouvet, M. Serotonergic mechanisms and sleep rebound. Brain Res. 268: 95-104, 1983.
- Sallanon, M., Kitahawa, K., Buda, C., Puymartin, M., Luppi, P. y Jouvet, M. Effects 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.
- Sarrieau, A., Najimi, M., Chigr, F., Kopp, N., Jordan D. y Rostene, W. Localization and developmental pattern of vasoactive intestinal polypeptide binding sites in the human hypothalamus. Synapse 17: 129-140, 1994.
- Schneider-Helmert, D. DSIP: Clinical application of the programming effect. En: S. Inoue y A. Schneider-Helmert (Eds). Sleep peptides: Basic and Clinical. Tokyo. pp: 175-198, 1988.
- Schoenenberger, F.A., Cueni, L.B., Monnier, M. y Hatt, A.M. Humoral transmission of sleep. VII Isolation and Physicochemical characterization of the "sleep inducing factor delta". Pfluegers Arch. 338: 1-17, 1972.
- Schoenenberger, F. y Monnier, M. Characterization of delta-electroencephalogram sleep inducing-peptide (DSIP). Proc Natl Acad Sci. 74: 1282-1286, 1977.
- Shimatsu, A., Kato, Y., Katakawi, H., Yanaihara, N. y Imura, H. Serotonin stimulates vasoactive intestinal polypeptide from rat hypothalamus in vitro. Brain Res. 264: 148-151, 1983.
- Shimatsu, A., Kato, Y., Matsushita, N., Katakawi, H., Yanaihara, N. y Imura, H. Stimulation by serotonin of vasoactive intestinal polypeptide release into rat hypophysial portal blood. Endocrinol. 111: 338-340, 1982.

- Shiromani, P.J., Armstrong, D.M. y Gillin, J.C. Cholinergic neurons from the dorsolateral pons project to the medial pons: A WGA-HRP and choline acetyltransferase immunohistochemical study Neurosci Lett 95: 19-23, 1988 a.
- Shiromani, P., Overstreet, D., Levy, D., Goodrich, C., Campbell, S. y Gillin, C. Increased REM sleep in rats genetically bred for cholinergic hyperactivity. Neuropsychopharmacol. 1: 127-133, 1988 b.
- Shouse, M.N. y Siegel, J.M. Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. Brain Res. 571: 50-63, 1992.
- Shute, C.D. y Lewis, P.R. Cholinesterase-containing systems of the brain of the rat. Nature 199: 1160-1164, 1963.
- Siegel, J. y Gordon, P. Paradoxical sleep deprivation in the cat. Science 148: 978-980, 1965.
- Siegel, J. y Rogawski, M. A function for REM sleep: regulation of noradrenergic receptor sensitivity. Brain Res. 13: 213-233, 1988.
- Siegel, J. y McGinty, D. Pontine reticular formation neurons: relationship of discharge to motor activity. Science 196: 678-680, 1977.
- Sidneva, N., Babichev, V., Airapetyants, M., Kolomeitseva, I., Shvachkin, Y. y Smimova, A. Effect of the thyrotrophin-releasing hormone analogue on an electrographic picture of sleep. Neurosci Behav Physiol 18: 282-286, 1988.
- Sitaram, N. y Gillin, C. Development and use of pharmacological probes of the CNS in man: evidence of cholinergic abnormalities in primary affective illness. Biol Psychiatry 15: 925-955, 1980.
- Sitaram, N., Wyatt, R., Dawson, S. y Gillin, C. REM sleep induction by physostigmine infusion during sleep. Science 191: 1281-1283, 1976.
- Smith, C. Sleep states and learning: A review of the animal literature. Neurosci Biobehav Rev. 9: 157-168, 1985.

- Spanis, C., Gutierrez, M. y Drucker-Colin, R. Neurohumoral correlates of sleep: further biochemical and physiological characterization of sleep perfusates. Pharmacol Biochem Behav. 7: 345-352, 1971.
- Staun-Olsen, P., Fahrenkrug, J., Gammeltoft, S., Ottesen, B. y Schousbe, A.. Development of binding of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse cerebral cortex and cultured cortical neurons. Int J Dev Neurosci. 3: 609-616, 1985a.
- Staun-Olsen, P., Ottesen, B., Gammeltoft, S. y Fahrenkrug, J. The regional distribution of receptors of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat central nervous system. Brain Res. 330: 317-321, 1985b.
- Steiger, A., Schiert, T., Colla-Muller, M., Frieboes, R., Galdner, J., Wiedemann, K. y Holsboer, F. Dose-dependent effects of VIP on sleep EEG and prolactin release in man. J Sleep Res 3: 240-241, 1994.
- Stein, D., Jouvet, M. y Pujol, J. Effects of alfa methyl-p-tirosine upon cerebral amine metabolism and sleep states in the cat. Brain Res. 72: 360-365, 1979.
- Steriade, M., Domich, L. y Oakson, G. Reticularis thalamic neurons revisited: activity changes during shifts in states of vigilance. J Neurosci. 6: 68-81, 1986.
- Steriade, M. y Llinás, R. The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. Physiol Rev. 68: 649-742, 1988.
- Steriade, M. Brain electrical activity and sensory processing during waking and sleep states. En: M. Krieger, T. Roth. y W. Dement (Eds). Principles and practice of sleep medicine. Saunders. Londres. pp: 86-103, 1989.
- Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G. y Dossi, C. Neuronal activities in brain stem nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. J Neurosci. 10: 2541-2549, 1990.
- Steriade, M. y McCarley, R. Brainstem control of wakefulness and sleep. Plenum, New York. 1990.
- Serman, M. y Clemente, C. Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. Exp Neurol 6: 301-306, 1962.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Stern, C. y Morgane, J. Effects of alpha-methyltyrosine on REM sleep and brain amine levels in the cat. Biol Psychiatry 6: 301-306, 1973.
- Stern, C., Jolowicz, E., Shabshelowitz, H. y Morgane, J. Effects of growth hormone on sleep-waking patterns in cats. Horm Behav. 6 :189-196, 1975.
- Suttin, E. L. y Jacobowitz D.M. Immunocytochemical localization of peptides and other neurochemicals in the rat laterodorsal tegmental nucleus and adjacent area. J Comp Neurol. 270: 243-270, 1988.
- Szymusiak, R. y McGinty, D. Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. Brain Res. 370 : 82-92, 1986.
- Szymusiak, R. y McGinty, D. Sleep-waking discharge of basal forebrain proyección neurons In cats. Brain Res.Bull. 22 : 423-430, 1989.
- Takahashi, Y., Kipnis, D.M. y Danghaday, W.H. Growth hormone secretion during sleep. J Clin Invest. 47: 2078-2090, 1968.
- Takahashi, J. y Turek, F. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, perturbs the phase of mammalian circadian pacemaker. Brain Res. 405: 199-203, 1987.
- Taylor, J., Smith, P. y Brook, C. Inhibition of physiological growth hormone secretion by atropine. Clinical Endocrinol. 22:497-501, 1985.
- Tsal, L., Bergman, B., Perry, B. y Rechtschaffen, A. Effects of chronic sleep deprivation on central cholinergic receptors in rat brain. Brain Res. 642: 95-103, 1994.
- Tononi, G., Pompeiano, M. y Cirelli, Ch. The locus coeruleus and immediate-early genes in spontaneous and forced wakefulness. Brain Res Bull. 35: 589-596, 1994.
- Usdin, T., Bonner, T. y Mezey, E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. Endocrinol. 135:2662-2680, 1994.
- Ursin, R. y Stermann, M. A manual for standard scoring of sleep and waking states in the adult cat. UCLA. Los Angeles, CA. 1981.
- Ursin, R. Endogenous sleep factors. Exp. Brain Res. , 8: 118-132, 1984.

- Van den Pol, N. y Powley, A. A fine-grained anatomical analysis of the role of suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of feeding and drinking. Brain Res. 160: 307-326, 1979.
- Van Hulzen, H. y Coenen, M. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. Physiol Behav. 25: 741-744, 1981.
- Van Hulzen, H. y Coenen, M. The pendulum technique for paradoxical sleep deprivation in rats. Physiol Behav. 25: 807-811, 1980.
- Vertes, R. Brain stem control of the events of REM sleep. Prog Neurobiol. 22: 241-287, 1984.
- Velluti, J. y Hernández-Peón. Atropine blockade within a cholinergic hypnogenic circuit. Exp Neurol 8: 20-29, 1963.
- Vogel, A., Review of REM sleep deprivation. Arch. Gen Psychiatry. 32: 749-761, 1975.
- Von Economo, C. Sleep as a problem of localization. J Nerv Ment Dis. 7: 249-259, 1930.
- Wahba Z. y Sohman, K. Effects of stress on choline acetyltransferase activity of the brain and the adrenal rat. Experientia 48: 265-268, 1992.
- Wahl, M., Straub, S. y Ammon, H. Vasoactive intestinal polypeptide-augmented insulin release: actions on ionic fluxes and electrical activity of mouse islets. Diabetologia. 36: 920-925, 1993.
- Wang, J., Yarsh, L. y Go, L. Studies on the basal and evoked release of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide from cat cerebral cortex and periventricular structures. Brain Res. 280: 105-117, 1983.
- Webster, H. y Jones, B. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. Brain Res. 458: 285-302, 1988.
- Wonnacott, S. The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. TIPS 11: 142-146, 1990.
- Woolf, J. y Batcher, L... Cholinergic systems in the rat brain IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. Brain Res Bull. 23: 519-523, 1983.
- Yamuy, J., Mancillas, R., Morales, F. y Chase, M. c-FOS expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep. J Neurosci. 13: 2704-2718, 1993.