

0034129⁵



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ANALISIS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE
LOS CAMBIOS MORFOLOGICOS DE LA REGION
PARABRAQUIAL PROVOCADOS POR LA
APLICACION TOPICA DE CARBACOL Y SU
RELACION CON LA ORGANIZACION DEL SUEÑO,
EN EL GATO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
LA ESPECIALIDAD EN MICROSCOPIA
ELECTRONICA APLICADA A LAS
CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
Q.F.B. JOSE MENDOZA SOTELO

TUTOR: DR. JOSE MARIA CALVO Y OTALORA.
COTUTOR: DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN.

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

266864



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Esta tesina de especialidad fue realizada en el Laboratorio de microscopia electrónica e histología de la división de Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría, bajo la dirección del Dr. José María Calvo y Otálora y la coodirección del Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Esta tesina fue apoyada por el proyecto del Instituto Mexicano de Psiquiatría IMP-3000.

A mi esposa e hijos

Por su paciencia y cariño

A mis padres

A mis hermanos

A mis sobrinos

Agradecimientos

Al Dr. José María Calvo y Otálora, por su tolerancia, apoyo y amistad para la realización de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, por su amistad, apoyo interés y entusiasmo en el desarrollo de esta tesina. ¡Gracias Doctor!

A los miembros del jurado por sus observaciones sugerencias y críticas que moldearon y enriquecieron el contenido de esta tesina.

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

E. en M.E.A.C.B. Marco Antonio González Jiménez

A Lourdes Agredano

A Ernestina Ubaldo

A Raúl Cardoso

A mis amigos y compañeros del Instituto Mexicano de Psiquiatría Dr. Martha León, Eduardo, Carolina y a todos los que con su amistad y apoyo contribuyeron de alguna forma en la elaboración de este trabajo.

Al instituto Mexicano de Psiquiatría por el apoyo y las facilidades que me brindaron, en la realización de este trabajo.

INDICE

	Página
Indice general	1
Indice de figuras	3
Abreviaturas	5
Resumen	6
I. Introducción y Antecedentes	8
I.1 Fundamentación del tema	13
II. Generalidades	16
II.1 La acetilcolina	16
II.2 Campo de acción de los fármacos colinomiméticos	17
II.2.1 Mecanismo de acción de los fármacos colinomiméticos	18
II.2.2 Farmacología básica de los estimulantes colinoceptores de acción directa	19
II.2.2.1 Química y farmacocinética	19
II.2.2.1.1 Estructura	19
II.2.2.1.2 Absorción, distribución y metabolismo	21
II.2.2.2 Carbacol	22
II.2.2.2.1 Propiedades y usos	22
II.2.2.3 Efectos en organos, aparatos y sistemas	23
II.2.2.3.1 Ojos	23
II.2.2.3.2 Sistema cardiovascular	23
II.2.2.3.3 Aparato respiratorio	24
II.2.2.3.4 Aparato digestivo	24
II.2.2.3.5 Aparato genitourinario	24
II.2.2.3.6 Sistema nervioso periférico	24
II.2.2.3.7 Sistema nervioso central	25
II.2.3 Farmacodinamia	25
II.2.3.1 Mecanismo de acción	25

II.3 Farmacología clínica de los estimulantes de los colinoceptores	26
II.3.1 Estimulantes muscarínicos de acción directa	26
III. Estudios sobre acciones colinérgicas mediante la microcopia electrónica	26
IV. Reacciones de las neuronas al daño	28
IV.1 Hinchamiento	28
IV.2 Entrada de Ca^{2+}	28
IV.3 Factores tróficos que previenen la degeneración de las neuronas después de la axotomía	29
V. Hipótesis y Objetivos	31
VI. Material y métodos	32
VI.1 Análisis electrofisiológico	36
VI.2 Procedimientos quirúrgicos	36
VI.3 Períodos de recuperación y habituación a las situaciones experimentales	37
VI.4 Administración de carbacol	37
VI.5 Comprobación del sitio de microinyección de carbacol	38
VI.6 Perfusión de los animales	38
VI.7 Procesamiento de las muestras para su análisis por Microscopia Electrónica	39
VII. Resultados	40
VII.1 Aspectos Cualitativos	40
VII.2 Aspectos Cuantitativos	56
VIII. Discusión	62
IX. Conclusiones	70
X. Bibliografía	71

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 .- Clases Principales de Fármacos que activan a los colinoceptores.	19
Figura 2 .- Una molécula de (+) 25: 3R: 5S - muscarina superpuesta a una imagen plana del receptor muscarínico hipotético.	20
Figura 2.1.- Estructuras Moleculares de cuatro ésteres de colina y del ácido carbámico.	21
Figura 3a .- Sitio de la aplicación de carbacol y localización del área PBL.	32
Figura 3b .- Corte sagital del cerebro del gato (localización del área PBL), tomado del atlas del cerebro del gato de Snider (1961).	33
Figura 3c .- Corte coronal del cerebro del gato (localización del área PBL) tomado del atlas del cerebro del gato de Snider (1961).	34
Figura 3d .- Localización del área PBL en cortes coronales del cerebro del gato	35
Figura 4 .- Micrografías electrónicas mostrando el efecto de carbacol sobre mitocondrias, lisosomas y vacuolas citoplásmicas.	43
Figura 5 .- Efecto de carbacol sobre la cromatina nuclear y aparato de Golgi.	44
Figura 6 .- Efecto de carbacol sobre la cantidad de vesículas de corazón denso y posición del nucleolo.	46

Figura 6' .-	Efecto del carbacol sobre dendritas.	48
Figura 7 .-	Micrografías electrónicas mostrando daño celular por la aplicación de carbacol en terminales sinápticas, mitocondrias y citoplasma celular.	49
Figura 8 .-	Efecto del carbacol sobre el tamaño de algunas terminales sinápticas.	51
Figura 9 .-	Efecto del carbacol sobre membranas y presencia de terminales con vesículas claras.	52
Figura 10 .-	Presencia de cuerpos electrodensos en las muestras tratadas con carbacol.	54
Cuadro 1.-	Propiedades de los Esteres de colina.	22
Cuadro 2.-	Características diferenciales de los agentes parasimpaticomiméticos.	25
Gráfica 1.-	Efecto del carbacol sobre el tamaño de los núcleos celulares del área PBL del gato.	57
Gráfica 2.-	Efecto del carbacol sobre número de sinapsis en el área PBL del gato.	58
Gráfica 3.-	Efecto del carbacol sobre el tamaño de mitocondrias en el área PBL del gato.	59
Gráfica 4.-	Efecto del carbacol sobre el número de mitocondrias en el área PBL del gato.	60
Gráfica 5.-	Efecto del carbacol sobre la densidad numérica de vesículas de centro denso en el área PBL del gato.	61

ABREVIATURAS

Ach.....	Acetilcolina
ACTH.....	Hormona Adenocorticotrófica
AMPc.....	Adenosin Monofosfato Cíclico
CGL.....	Cuerpo Geniculado Lateral
DNA.....	Acido Desoxirribonucleico
GMPc.....	Guanidin Monofosfato Cíclico
MORs	Movimientos Oculares Rápidos
NGF.....	Factor de Crecimiento del Nervio
PBL	Parabraquial
PGO.....	Ponto-Genículo-Occipitales
RNA.....	Acido Ribonucleico
SOL.....	Sueño de Ondas Lentas
VIP.....	Polipéptido Intestinal Vasoactivo

RESUMEN

Desde el punto de vista polarográfico se pueden distinguir dos estadios principales de sueño: el sueño de ondas lentas (SOL) y el sueño con movimientos oculares rápidos o sueño REM (del inglés: *rapid eye movements*).

El sueño REM en el gato tiene las mismas características que en el hombre. Los mecanismos de integración del REM tienen lugar en extensas redes neuronales distribuidas en la región pontina del tallo cerebral.

En la región pontina se localizan diferentes grupos celulares, entre ellos el núcleo tegmental dorsolateral (NTDL) y el núcleo tegmental pedúnculo pontino (NTPP) que están comprendidos en la región parabraquial (PBL). Estas estructuras juegan un papel importante en la generación de los potenciales ponto-genículo-occipitales (PGO), que siempre preceden al sueño REM y la generación de esta fase del sueño.

La aplicación de una sola microinyección de carbacol (un colinomimético) en la región PBL del tegmento pontino, provoca durante 20-24 hrs. un estado de activación electroencefalográfica y la ocurrencia ininterrumpida de salvas de potenciales PGO. También se ha encontrado que después de este período de actividad PGO, el sueño REM y los episodios que preceden al REM cuando comienzan a aparecer los potenciales PGO, denominados sueño fásico en ondas lentas (SFOL), se incrementan significativamente durante los siguientes 6 a 8 días, sugiriendo una activación colinérgica sostenida de las neuronas colinérgicas/colinoceptivas del área PBL; apoyando por lo tanto, la hipótesis de que los impulsos colinérgicos para la inducción del REM provienen del tegmento pontino.

Por otra parte, también se ha mostrado que la aplicación de carbacol en el núcleo central de la amígdala del lóbulo temporal (AMG), relacionado anatómicamente con la región PBL, provoca el aumento duradero (6 días) de los episodios SFOL y del sueño REM.

En este trabajo se valoran mediante microscopia electrónica los cambios morfológicos y estructurales provocados por la aplicación de carbacol sobre amígdala AMG y su efecto indirecto sobre el área PBL del gato; con la finalidad de explicar los cambios a nivel celular y/o estructural que están relacionados con el efecto a largo plazo del carbacol sobre el sueño tan prolongado de

éste, después de su aplicación.

Los resultados obtenidos muestran cambios tanto morfológicos, como estructurales en las muestras tratadas con carbacol. Tales cambios son el incremento del tamaño de mitocondrias, de algunos botones sinápticos con vesículas claras, engrosamiento de fibras dendríticas, ramificación de espinas dendríticas, el aumento de vesículas claras y el incremento del número de vesículas de centro denso. También la presencia de vacuolas formadas por el aparato de Golgi.

Por otro lado, los resultados también indican la aparición de puntos electrodensos y filamentos que pueden reflejar daño celular.

Todos estos resultados sugieren, que el carbacol podría inducir mediante mecanismos colinérgicos, la hidrólisis de fosfoinosítidos provocando cambios a nivel celular, por la activación de la fosfolipasa C y la estimulación de Ca^{2+} intracelular, y en consecuencia activar segundos mensajeros y la fosforilación proteínica para comunicar a genes como el *c-fos-* o *c-jun*. respuestas a largo plazo desde el punto de vista estructural y fisiológico.

El efecto tan prolongado del carbacol sobre el área PBL, se podría explicar por las características de baja solubilidad en lípidos y la dificultad en el rompimiento del enlace carbámico por la acetilcolinesterasa, lo que hace que esta sustancia permanezca insoluble en el área de aplicación hasta su degradación en el intestino. Todo esto nos sugiere al sueño como una etapa durante la cual se efectúa una regeneración y/o reestructuración proteínica y de moléculas que pertenecen a diferentes sistemas, tanto de crecimiento, metabólicos, funcionales, energéticos, etc., necesarios para el desempeño diario y constante del organismo. De esta manera la etapa del sueño es siempre esencial.

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El sueño puede definirse como un estado normal fácilmente reversible, recurrente y espontáneo, durante el cual disminuye la atención a la estimulación externa.

La vigilia y el sueño son estados fisiológicos que se suceden de manera cíclica; acompañados de fenómenos vegetativos, conductuales, neurofisiológicos y neuroquímicos diferentes. Debido a esta variedad de fenómenos, el sueño y la vigilia han sido estudiados por separado, sin embargo; se deben considerar como estados dependientes entre sí, pues la alteración de uno tiene efecto sobre el desarrollo adecuado del otro.

Los primeros estudios sobre el sueño se basaron en observaciones conductuales, de cambios posturales en sujetos sanos y en el análisis de las ensoñaciones mediante el método introspectivo. Posteriormente, se analizaron los cambios en los fenómenos vegetativos que ocurrían durante el dormir, tales como la presión arterial, la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca o el diámetro pupilar. A partir del descubrimiento del electroencefalograma, realizado por Berger (1930), el estudio del sueño se centró en la búsqueda de correlaciones entre la conducta del dormir y la actividad eléctrica cerebral.

Desde el punto de vista neurohumoral, Pieron (1913) propuso que el sueño era el resultado de la acumulación de factores humorales (hipnotoxinas) y consideraba que algunos compuestos hipnógenos acumulados en la sangre o en el líquido cefalorraquídeo, durante la vigilia, alcanzaban un nivel depresor de las zonas de integración de la vigilia. Estos estudios también demostraron que el sueño es un fenómeno activo, producto de la síntesis de factores hipnógenos.

Posteriormente con la ayuda de la electroencefalografía, se hicieron intentos por clasificar las diferentes etapas del sueño, según la proporción de ondas lentas que aparecían, denominándolas como etapas A, B, C, D del sueño (Loomis et al., 1937).

Por otra parte, Hess (1944) logró inducir sueño mediante la estimulación eléctrica del tálamo y el hipotálamo posterior, demostrando así que el sueño era el producto de la activación de regiones cerebrales específicas, es decir, un proceso activo.

Moruzzi y Magoun (1949) demostraron que al estimular la formación reticular de animales experimentales, con pulsos eléctricos de alta frecuencia y bajo voltaje, hay un incremento del nivel

de activación cerebral . Los estudios de Moruzzi y Magoun permitieron considerar al sueño como un proceso pasivo, resultante de una disminución de la vigilia, producto de la desaferentación sensorial. Actualmente, considerar al sueño como un fenómeno pasivo no es correcto, sin embargo una aportación valiosa de estos autores, fue la demostración de que la región comprendida entre los colículos y el bulbo es importante para la integración de la vigilia y el sueño.

Posteriormente, la investigación del sueño fue abordada desde dos puntos de vista: el neurofisiológico y el neurohumoral. El estudio neurofisiológico tuvo su origen en las observaciones de Bremer (1935), sobre las preparaciones *encéphale isolé* (encéfalo aislado), que consiste en una sección total practicada a nivel cervical alto, con la que se separa la médula espinal del encéfalo y *cerveau isolé* (cerebro aislado) en la que se separa el tallo cerebral del resto del cerebro . Bremer observó que la preparación encéfalo aislado produce una oscilación entre la vigilia y el sueño, pero con una tendencia marcada hacia la sincronización electroencefalográfica y los signos oculares del sueño: en la preparación de cerebro aislado la actividad eléctrica del animal permanece siempre sincrónica, salvo breves períodos de alertamiento.

Aserinsky y Kleitmann (1953) observaron que las diferentes fases del sueño de ondas lentas son interrumpidas periódicamente por una etapa de sueño caracterizada por actividad electroencefalográfica (EEG) rápida y de bajo voltaje, acompañada de movimientos oculares rápidos (MOR). A esta etapa la denominaron sueño con movimientos oculares rápidos o sueño REM (del inglés *rapid eye movements*). Este descubrimiento impulsó la búsqueda de las relaciones entre el sueño REM y diversos cambios cerebrales y periféricos. Dement y Kleitman (1957) observaron que los MOR del sueño aparecen conjuntamente con las ensoñaciones. Estos trabajos fueron de gran relevancia, pues por primera vez se estableció la relación entre las ensoñaciones y un estado fisiológico cerebral.

El descubrimiento del sueño REM hizo necesaria una nueva clasificación de las fases de sueño. Gracias a un comité internacional encabezado por Rechtschaffen y Kales (1968), las fases del sueño en el hombre se clasifican de acuerdo a sus características poligráficas en fase de vigilia, fase I, II, III, y IV del sueño en ondas lentas y sueño REM. Actualmente las fases III y IV del sueño en ondas se consideran como una sola, denominada sueño delta.

Los estudios sobre sueño han tenido como principal objetivo el delimitar las estructuras

cerebrales que participan en la integración y modulación de cada una de las fases de éste, e identificar a través de qué neurotransmisor o factor humoral pueden ser moduladas. Todo esto ha sido posible debido a los estudios experimentales en animales, pues la mayoría de las aves y mamíferos estudiados hasta el momento, presentan las diferentes etapas de sueño de ondas lentas (SOL) y episodios de sueño REM (Jouvet, 1972).

Un animal ampliamente utilizado en estas investigaciones ha sido el gato. Además de presentar las diferentes fases del sueño; se ha demostrado que una lesión en la región caudal del *locus coeruleus* (LC) y el tegmento pontino, provoca la aparición del tono muscular durante el sueño REM, lo que le permite desplegar conductas elaboradas de origen instintivo, como huida, furia, agresión, predación y reacciones de orientación, mientras permanece con los ojos cerrados (Jouvet y Michel, 1959). Este fenómeno ha sido corroborado por varios investigadores y se le ha denominado como "conducta onírica del gato" (Jouvet y Delorme, 1965; Henley y Morrison, 1969; Sastre y Jouvet, 1979; Hendriks et al., 1982). Estas características, validan la utilización de esta especie animal en la investigación de los mecanismos de las diferentes fases del sueño y de las bases biológicas de las ensoñaciones.

Jouvet y Michel (1959) encontraron que al registrar la formación reticular durante el sueño REM, aparecen unos potenciales monofásicos de alto voltaje (200 a 300 microvoltios) y de corta duración (150 milisegundos), que ocurren de manera aislada o en salvas. Posteriormente se demostró que estos potenciales también pueden registrarse en estructuras de la vía visual, como en el cuerpo geniculado lateral (CGL) (Mikiten et al., 1961) y en la corteza occipital (Michel et al., 1963; Mouret et al., 1963). Debido a la distribución anatómica de estos potenciales, se les dió el nombre de la actividad fásica ponto-genículo occipital (PGO) (Jeannerod, 1965). Más tarde se demostró que los potenciales PGO no aparecen de manera aleatoria en la vía visual, sino que estos se generan en la región pontina y se propagan a las estructuras visuales (Bizzi y Brooks, 1963).

En el gato, el número de potenciales PGO en 24 hrs. es constante ($13,000 \pm 1,500$). Esta "cantidad diaria" de potenciales PGO aparentemente es una constante biológica controlada por mecanismos regulatorios a largo plazo, ya que si un animal es privado de sueño REM durante 3 días, durante el SOL aparecen pocos potenciales PGO (700 cada 24 horas) y durante la recuperación del sueño REM, en los dos días siguientes a la privación, los potenciales PGO

aparecen durante el SOL y el sueño REM con una frecuencia mayor. Además el déficit de potenciales PGO es recuperado en un 75-90% (Dusan-Peyrethon et al., 1967). Esto les confiere al sueño REM y a sus fenómenos fásicos (MORs y potenciales PGO) la característica de ser fenómenos necesarios para el cerebro. Es de interés hacer notar que la recuperación del sueño REM en el hombre, se acompaña de un aumento de los MORs y de las ensoñaciones con un contenido emocional más intenso y más vívidas que en las situaciones normales (Hobson, 1988).

Nelson (1983) encontró que al estimular eléctricamente el cuerpo geniculado lateral (CGL) de un hemisferio, se pueden evocar potenciales PGO en el CGL contralateral. Con base en estos resultados, se ha propuesto que la estimulación del CGL provoca la excitación de las neuronas generadoras en el puente, ya que algunas células del tallo cerebral descargan en salvas procediendo a la actividad PGO.

Por otro lado, se ha demostrado que la lesión de los núcleos tegmentales laterodorsales, de la región PBL, de la parte rostral del locus coeruleus-alfa y principalmente la lesión de una región situada por arriba del braquium conjuntivo y por debajo del núcleo cuneiforme, denominada "area X", suprime los potenciales PGO en el cuerpo geniculado lateral.

En varios estudios se muestra que las neuronas de la porción caudal de la región PBL participan en la generación de la actividad PGO, pues se ha encontrado que: 1). Comienzan a descargar e incrementar su frecuencia de disparo unos segundos antes de dichos potenciales (Sakai et al., 1976, 1985).

2). La lesión electrolítica de la porción caudal de la región PBL provoca la desaparición de los potenciales PGO en el CGL ipsilateral a la lesión, durante el sueño REM (Datta y Hobson, 1994).

3). La estimulación colinérgica de la región PBL provoca la pronta aparición (5 a 6 minutos) de potenciales PGO en el CGL ipsilateral a la región PBL estimulada colinérgicamente y un aumento en la densidad de estos potenciales durante el sueño REM (Datta et al., 1991, 1992; Hobson et al., 1993).

Las neuronas alrededor del braquim conjuntivo (BC), también incrementan su frecuencia de disparo antes de que se presente el potencial PGO en el CGL; lo que sugiere que estas neuronas forman parte del generador de la actividad PGO (Sakai et al., 1985).

Se ha mostrado que los potenciales PGO son los responsables de generar los MORs, ya que se

propagan hacia los núcleos oculomotores (VI, IV y III par craneal) para provocar contracciones fásicas de los músculos intrínsecos del globo ocular (Michel et al., 1963; Cespuglio et al., 1975; Cespuglio et al., 1976).

Desde el punto de vista neuroquímico, se ha descrito que las monoaminas, incluyendo la 5-Hidroxitriptamina, la norepinefrina (NE) y la acetilcolina alteran la distribución temporal y amplitud de la actividad PGO. Esto sugiere que ambos sistemas de neurotransmisión están involucrados en la generación de la actividad PGO (Jouvet, 1972).

El papel de las monoaminas en los mecanismos que generan la actividad PGO, es apoyado por los trabajos de Neal et al. (1979), quienes administraron por vía intravenosa fluoxetina (inhibidor específico de la captura de 5-hidroxotriptamina) y nosoxectina (inhibidor de la recaptura de NE), provocando una disminución significativa en la frecuencia de la actividad PGO inducida por la reserpina. Estos resultados sugieren que la instalación del sueño REM y la aparición de la actividad PGO, son debidas a la recaptura de 5-hidroxitriptamina.

La administración de agentes colinomiméticos en diferentes estructuras del puente ha permitido identificar aquellas estructuras que participan en la generación de los potenciales PGO, a través de un mecanismo colinérgico. Vivaldi et al. (1980), reportaron que la aplicación de carbacol en el campo tegmental gigantocelular (CTG), provoca la aparición de episodios de sueño REM y de actividad PGO, y que la lesión de esta región elimina el sueño REM. Así mismo, se ha descrito que la aplicación de carbacol en la región PBL provoca la ocurrencia inmediata de salvas de potenciales PGO (Datta et al., 1991, 1992; Hobson et al., 1993);

Estos resultados muestran que la generación de la actividad PGO, puede incrementarse colinérgicamente tanto en la región PBL como en diferentes regiones del tallo cerebral. Pero cabe distinguir que la inyección de colinomiméticos en la región PBL activa predominantemente a las neuronas generadoras de la actividad PGO, mientras que si se aplican en el tegmento pontino dorsolateral, también se activan indirectamente las neuronas responsables de la generación del sueño REM.

I.1 Fundamentación del tema.

La amígdala (AMG) está relacionada anatómicamente con diversas regiones del sistema nervioso central, a través de dos sistemas de fibras: el sistema aferente y el sistema eferente. El sistema eferente lo constituyen la estria terminalis y el haz amigdalofungal ventral. La primera conecta a la AMG con el área septal, el área preóptica, el hipotálamo anterior y con la habénula, mientras que el haz amigdalofungal ventral la conecta con el septum, el área preóptica, el núcleo ventromedial del hipotálamo anterior, el tegmento mesencefálico y con el tubérculo olfatorio. Es importante hacer notar, que la AMG tiene abundantes conexiones monosinápticas y recíprocas con los núcleos responsables del sueño REM, principalmente con los núcleos generadores de potenciales PGO.

El núcleo central amigdalino (NC) contiene neuronas colinérgicas (Amaral , 1992) y proyecta fibras a través del haz amigdalofungal ventral hacia la región PBL, al "área X" , al campo tegmental lateral, al campo tegmental gigantocelular, al núcleo tegmental laterodorsal, al braquium conjuntivo, al locus coeruleus y al locus coeruleus-alfa (Hopkins y Holstege, 1978; Price y Amaral, 1981; Kawai et al., 1982; Takeuchi et al., 1982; Veening et al., 1984). A su vez, el locus coeruleus, el "área X" y la región PBL proyectan fibras hacia el NC amigdalino (Norgren, 1976; Jones y Moore, 1977; Ottersen y Ben-Ari, 1978; Mehler, 1980; Saper y Loewy, 1980; Voshart y Vander Kooy, 1981; Takeuchi et al., 1982; Veening et al., 1984).

En 1992 Calvo, Datta, Quattrochi y Hobson, para investigar la posibilidad de que los impulsos colinérgicos que inducen el sueño REM se originan en la región PBL, llevaron a cabo un mapeo del efecto de microinyecciones de carbacol en esta región. Estos autores encontraron que una sola microinyección provoca durante 20 a 24 horas un estado de activación EEG y la ocurrencia ininterrumpida de salvas de potenciales PGO, de manera independiente de las fases de sueño y de manera ipsilateral al sitio de la microinyección. También encontraron que este fenómeno va seguido del aumento duradero (6 a 8 días) y significativo de los episodios de sueño fásico en ondas lentas SFOL y del sueño REM. En estos días , los potenciales PGO se restringen progresivamente a los episodios de SPHOL y del sueño REM, pero su densidad (número de potenciales PGO/minuto) continua significativamente aumentada (Datta et al., 1991; Calvo et al., 1992; Datta et al., 1992; Hobson et al., 1993).

La localización de los sitios de inyección con mayor efecto, mediante la microinyección de microesferas fluorescentes de rodamina cargadas de carbacol y el análisis histológico, mostraron que los cúmulos de células colinérgicas del núcleo marginal de la región PBL fueron los puntos de mayor efecto (Quattrochi et al., 1989). Estos resultados muestran que la activación colinérgica de la región PBL semeja la secuencia de eventos que ocurre normalmente durante la instalación del sueño REM, un período de actividad PGO, que precede al establecimiento de esta fase del sueño. Por lo tanto, apoyan la hipótesis de que a partir de la región PBL, se originan los impulsos colinérgicos hacia la región dorsolateral del tegmento pontino, que es una zona colinoceptiva para la inducción del sueño REM (Yamamoto et al., 1990).

Por otra parte, estos resultados permiten el análisis del papel que juegan en la inducción del sueño REM, las estructuras proencefálicas que están relacionadas anatómica y fisiológicamente con la región PBL.

La aplicación de carbacol en la región PBL provoca un aumento significativo del sueño REM. La localización autoradiográfica de los receptores muscarínicos M1 y M2 en el cerebro, muestran que la región PBL está libre de receptores muscarínicos M1 y contiene receptores muscarínicos M2 (Mash y Potter, 1986; Spencer et al., 1986).

Datta et al. (1993), demostraron que el efecto del carbacol en la región PBL desaparece al bloquear previamente a los receptores M2 con metoctramina, lo que apoya la hipótesis de que el efecto del carbacol se debe a la activación de estos receptores.

Las neuronas del campo tegmental gigantocelular (CTG) no sintetizan acetilcolina, la entrada colinérgica proviene del núcleo temental laterodorsal y del núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT), que están comprendidos en la región PBL. La relevancia funcional de estas vías se ha demostrado mediante la estimulación eléctrica de estas estructuras, ya que provoca un incremento en la liberación de acetilcolina en el CTG. Durante el sueño REM, las neuronas de la región PBL incrementan su frecuencia de disparo (células REM-on) o la decremantan (células REM-off), este patrón de disparo también se presenta cuando se aplica carbacol en el campo tegmental gigantocelular CTG.

Los receptores M1 juegan un papel importante en el mantenimiento del sueño REM, los receptores M2 participan en la inducción y mantenimiento de esta fase de sueño, aunque también regulan la vigilia y el sueño de ondas lentas (SOL); los receptores M3 no están involucrados en la

regulación del sueño REM, pero si afectan al SOL y sus correlatos electrocorticales. Es importante señalar que en la regulación de la vigilia y el SOL participan diferentes cantidades de receptores M1 y M3, en el caso de la vigilia son más los M3 mientras que durante el SOL son iguales (Simón, A. K., 1996).

Una de las estructuras del tegmento pontino que juega un papel principal en la generación de los potenciales PGO y por lo tanto en la inducción del sueño MOR, es la región PBL. Además, se ha propuesto que para generar a los potenciales PGO e inducir al sueño MOR, la región PBL utiliza un mecanismo colinérgico. Pero aún no se ha logrado determinar con precisión, si son las neuronas colinérgicas de esta región o si son las neuronas vecinas a ellas las responsables de dichos fenómenos.

Por otro lado, el hecho de que una sola microinyección de carbacol aplicada en la región PBL aumente significativamente la fase de sueño MOR durante 6 a 8 días, no puede ser explicado por el tiempo de acción farmacológica de este fármaco. Esto implica que puede haber un cambio a largo plazo en el metabolismo, que posiblemente se acompañe de cambios morfológicos finos en las neuronas de la región PBL. Los cambios metabólicos de la región PBL podrían explorarse desde el punto de vista farmacológico, sin embargo, con las herramientas farmacológicas existentes, aun es difícil determinar con precisión a que nivel del metabolismo neuronal se está produciendo el cambio, por lo tanto, otra alternativa sería el análisis de los cambios morfológicos de las neuronas, mediante **microscopia electrónica**; pues se ha demostrado que algunos fármacos, incluyendo al **carbacol**, producen cambios en el área de contacto sináptico, en los organelos de las células o en las vesículas sinápticas. Además, la observación por microscopia electrónica se puede combinar con técnicas de inmunocitoquímica, que serían útiles para determinar la naturaleza bioquímica de las neuronas que presentan los cambios.

II. GENERALIDADES

II.1 La acetilcolina

El sistema nervioso autónomo está dividido en el sistema simpático (adrenérgico) y el sistema parasimpático (colinérgico) y estos ejercen, por lo general acción opuesta sobre los diversos órganos del cuerpo. (Daniel P. Stites, H Hugh Fudenberg, John D. Stobo, J. Vivian Wells, 1985).

La acetilcolina es un compuesto de amonio cuaternario que contiene tres sitios activos de importancia para su actividad biológica separados espacialmente (figura 2); el nitrógeno con carga positiva, el oxígeno del carbonilo que lleva una carga relativamente negativa y el oxígeno esteárico relativamente pobre en electrones

Aun cuando la acetilcolina tiene tres lugares de reacción, sólo dos de ellos son necesarios para la actividad de este compuesto. El nitrógeno cuaternario es necesario para la activación de todos los receptores colinérgicos, pero éste debe estar unido con oxígeno cargado ya sea positiva o negativamente.

Para la actividad muscarínica es necesaria la combinación del nitrógeno cuaternario y el oxígeno positivo, separados a una distancia específica; dicha distancia ha sido obtenida por estudios de la órbita molecular. Este tipo de enlace y orientación espacial se presenta en el alcaloide muscarina cuyos efectos se utilizaron originalmente para distinguir las acciones de la acetilcolina. Otra combinación de sitios activos se encuentran en la nicotina. Cuando la acetilcolina está en su configuración espacial, puede activar los receptores nicotínicos (ganglios autónomos y sinapsis neuromusculares), fig. 2 (Thomas C. Westfall, 1976).

Los mecanismos colinérgicos en los desórdenes afectivos resumidos de investigaciones realizadas en estudios de animales y humanos sugieren que el mecanismo central muscarínico y posiblemente nicotínico contribuyen probablemente a la psicopatología de los desórdenes afectivos.

Berger et al., 1989; sugirió que el RS86, un agonista muscarínico (M_1) relativamente específico tiene significantes efectos antimaniacos. Hay una considerable evidencia de que la acción central de las drogas colinérgicas pueden disminuir efectivamente los síntomas maniacos. Una medida de

tal función puede estar reflejada en la medida de la actividad de la colina en el eritrocito. Los niveles de colina en el eritrocito se han investigado como un marcador bioquímico de la actividad de la acetilcolina desde que la colina es el mayor precursor, como también el mayor metabolito de la acetilcolina. Cambios en la acetilcolina central han mostrado afectar la neurotransmisión colinérgica. Se ha notado una ligera elevación de la colina en el eritrocito en pacientes con desórdenes bipolares, y también se ha observado en esquizofrénicos y depresivos.

Si bien la mayoría de observaciones ligadas al sistema nervioso colinérgico con los desórdenes afectivos, se han enfocado sobre mecanismos muscarínicos, hay también evidencias de que mecanismos nicotínicos colinérgicos pueden estar ligados a la depresión (David S. Janowsky y David H. Overstreet, 1995).

II.2 CAMPO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS COLINOMIMÉTICOS

En algunos de los primeros estudios del sistema nervioso parasimpático, Sir Henry Dale en 1914; observó que el alcaloide muscarina simulaba los efectos de la descarga de los nervios parasimpáticos, es decir, tenía efectos parasimpaticomiméticos. La aplicación directa de muscarina a ganglios y tejidos efectores autonómicos (músculo liso, corazón, glandulas exócrinas) demostró, que la acción parasimpaticomimética del alcaloide era mediada por receptores en las células efectoras, y no en los ganglios. En consecuencia, por consenso general los efectos de la propia acetilcolina y de otros colinomiméticos en las sinapsis neuroefectoras autonómicas se denominan efectos parasimpaticomiméticos, mediados por receptores muscarínicos.

Los fármacos parasimpaticomiméticos se conocen también con varios sinónimos: parasimpaticomiméticos, colinomiméticos, agonistas colinérgicos y vagomiméticos, que hacen referencia a su acción similar a la acetilcolina y a la del estímulo vagal o parasimpático.

Comprende los ésteres de colina, como acetilcolina, **carbacol**, arecolina y metacolina, que estimulan receptores muscarínicos además de nicotínicos, y el betanecol, aceclidina, pilocarpina, muscarina y oxotremorina, que estimulan sólo los receptores muscarínicos.

Cuando se demostró que la acetilcolina es la sustancia transmisora fisiológica tanto en los receptores muscarínicos como nicotínicos, se reconoció que ambos receptores son subtipos de los

colinoceptores.

Los receptores muscarínicos se localizan en la membrana plasmática de las células de órganos inervados por nervios parasimpáticos, también en algunos tejidos que no lo están, como por ejemplo las células del endotelio.

II.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS COLINOMIMÉTICOS

Los medicamentos que estimulan los colinoceptores se dividen en dos categorías principales, las cuales se basan en su tipo de acción, clasificándoseles como directos e indirectos (figura 1). Las sustancias de acción directa se enlazan a los receptores muscarínicos o nicotínicos y los activan.

Las sustancias de acción indirecta producen sus efectos primarios por inhibición de la acción de la acetilcolinesterasa, la cual hidroliza la acetilcolina a colina e ion acetato. Al inhibir la acetilcolinesterasa, los medicamentos de acción indirecta aumentan la concentración de acetilcolina endógena, en las hendiduras sinápticas y uniones neuroefectoras, y el exceso de acetilcolina a su vez, estimula a los colinoceptores para provocar un aumento en las respuestas.

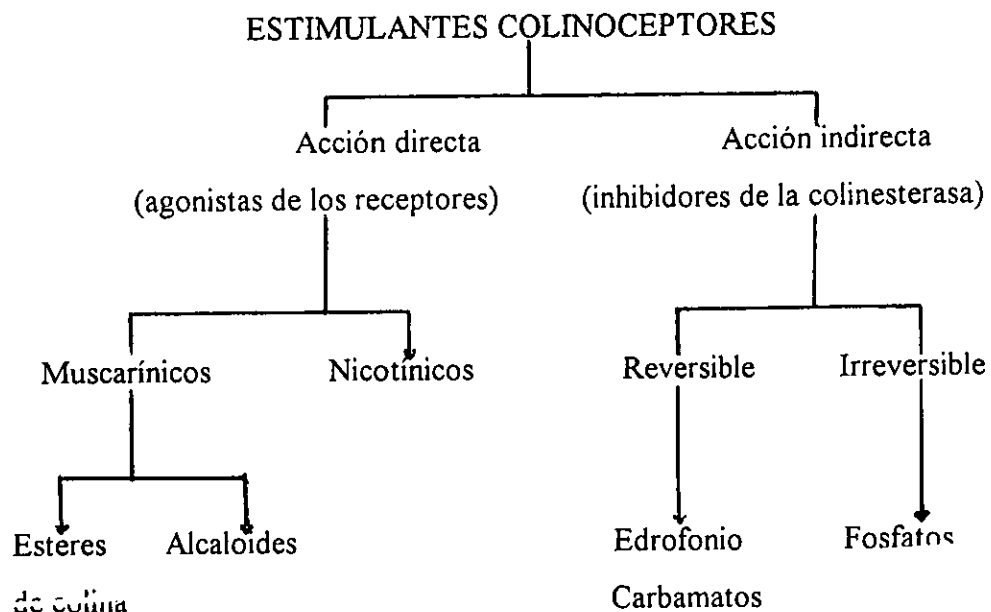


Figura 1. Clases principales de fármacos que activan a los colinoceptores.

II.2.2 FARMACOLOGÍA BÁSICA DE LOS ESTIMULANTES COLINOCEPTORES DE ACCIÓN DIRECTA

Los colinomiméticos de acción directa pueden dividirse según su estructura química en ésteres de colina (incluyendo la acetilcolina) y alcaloides (como la muscarina y la nicotina).

II.2.2.1 Química y farmacocinética

II.2.2.1.1 Estructura

La acetilcolina puede adoptar diversas conformaciones, pues se trata de una molécula flexible. Se ha sugerido que en conformación "transoide" estimula los receptores muscarínicos, y en conformación "cisoide" estimula los receptores nicotínicos. Sin embargo, es más probable que la acetilcolina actúe en la misma conformación preferida en su interacción con ambos tipos de receptores, y que las dos interacciones incluyan grupos diferentes de la molécula.

Los grupos importantes para actividad muscarínica son la cabeza catiónica, el oxígeno etéreo y el grupo metilo terminal; los grupos importantes para la actividad nicotínica son la cabeza catiónica y el átomo de oxígeno del carbonilo.

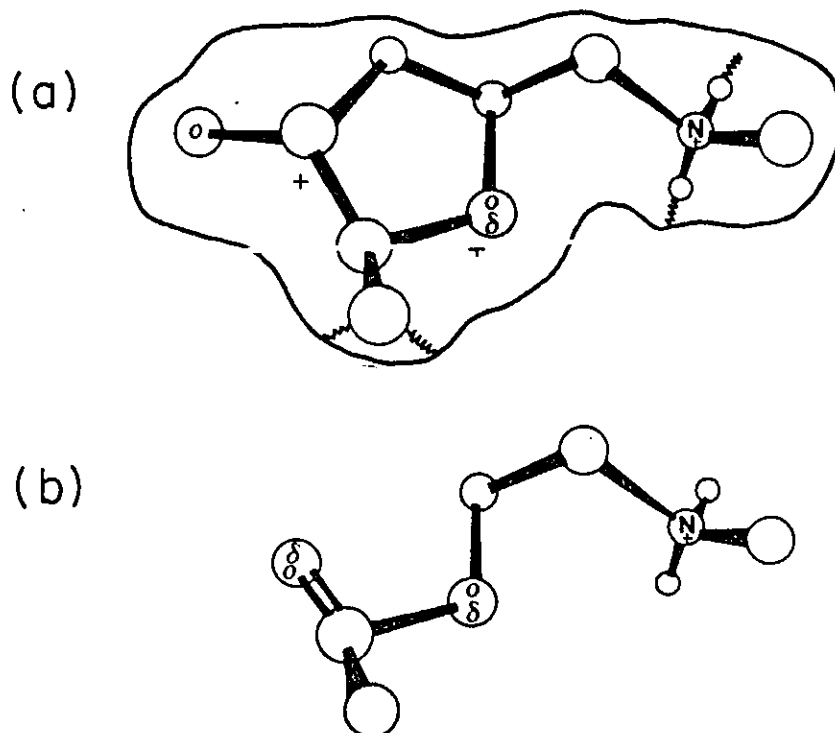
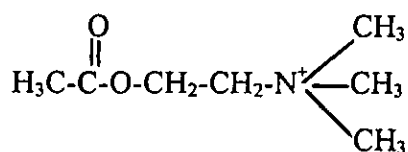


Figura 2. (a) una molécula de (+)2S:3R:5S-muscarina superpuesta a una imagen plana del receptor muscarínico hipotético. Los círculos con signos positivos representan lugares de fijación cargados a nivel del receptor. Las líneas en zig-zag indican enlaces de Van der Waals. Los lugares de fijación importantes para la muscarina son la zona aniónica que atrae el nitrógeno con carga positiva, un lugar cargado positivamente que se combina con el oxígeno etéreo, y un lugar que fija el grupo metilo, probablemente por fuerzas de Van der Waals. Un lugar con carga positiva de menor importancia puede fijar el oxígeno carbonilo de la acetilcolina, pero no interviene en la fijación de la muscarina. (b) Una molécula de acetilcolina en conformación análoga preferida.

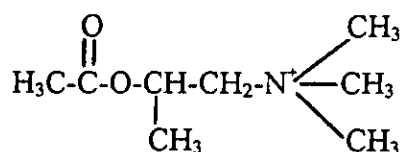
II.2.2.1.2 Absorción, distribución y metabolismo

Las características de absorción y distribución de todos los ésteres de la colina son similares, y predomina su baja solubilidad en lípidos: son mal absorbidos y se distribuyen pobremente en el sistema nervioso central. Aunque todos se hidrolizan en el aparato digestivo (y son menos activos por vía oral) difieren de manera notable con respecto a su susceptibilidad a la hidrólisis por la colinesterasa en el organismo.

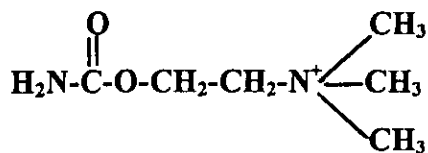
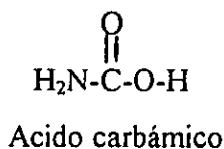
Los ésteres de ácido carbámico, **carbacol** y **betanecol**, son totalmente resistentes a la hidrólisis por colinesterasa y en consecuencia la duración de su acción es mayor.



Acetilcolina

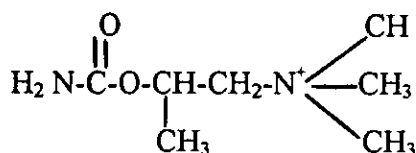


Metacolina

(acetil- β -metilcolina)

Carbacol

(carbamoilcolina)



Betanecol

(carbamoil- β -metilcolina)

Figura 2.1. Estructuras moleculares de cuatro ésteres de colina y del ácido carbámico. La acetilcolina y la metacolina son ésteres del ácido acético formados por colina y β -metilcolina, respectivamente. El carbacol y el betanecol son ésteres del ácido carbámico unido al mismo alcohol.

Cuadro 1. Propiedades de los ésteres de colina

Esteres de colina	Susceptibilidad a la colinesterasa	Acción muscarínica	Acción nicotínica
Acetilcolina	++++	+++	+++
cloruro de Betanecol	No	++	No
cloruro de Carbacol	No	+++	++
cloruro de Metacolina	+	++++	+
cloruro de			

II.2.2.2 Carbamilcolina (Carbacol)

Este fármaco es uno de los más potentes de los ésteres de colina. El componente ácido es carbámico en vez de acético y el enlace del éster no es fácilmente susceptible a la hidrólisis por acetilcolinesterasa o butiricolinesterasa. El carbacol tiene acciones tanto muscarínicas como nicotínicas, pero las acciones muscarínicas predominan. Sus acciones farmacológicas son similares a las de la acetilcolina.

II.2.2.2.1 Propiedades y usos

A). 2-[(Amonocarbonil) oxy]-N,N,N-trimetiletanaminio cloruro; (2-hidroxyetil) trimetilamonio cloruro carbamato; carbocolina; Carcholina; Miostat; Moryl; Doryl; Coletyl; Lentin.

$C_6H_{15}ClN_2O_2$; P.M. 182.65 gr/mol.

C 39.45%, H 8.28%, Cl 19.41%, N 15.34%, O 17.52% $[NH_2COOCH_2CH_2N(CH_3)_3]^+ Cl^-$.

Cristales prismáticos duros. Higroscópico. sin olor, pero su estancia en lugares abiertos produce un olor a aminas alifáticas. 1 gr. se disuelve en 1 ml. de agua, 50 ml. de alcohol, 10 ml. de metanol, poco soluble en cloroformo, ether. La solución acuosa es inestable cuando se calienta.

Terapia para gatos (uso en veterinaria): Parasimpaticomimético, usado principalmente en animales grandes, específico para cólico simple en el caballo. Antídoto: Atropina.

Dosis y administración. Administración oral 1-4 mg., inyección subcutánea 0.25-0.5 mg., hasta tres veces al día.

Aparentemente todos los receptores muscarínicos son de tipo "acoplado a la proteína G" con siete segmentos ordenados en forma de serpentina a través de la membrana. Tal vez el resultado general y más importante del enlace de agonistas muscarínicos es la activación de inositol 1,4,5-trifosfato IP₃ y la cascada diacilglicerol (DAG). Los agonistas muscarínicos también incrementan la concentración celular de GMPc. La activación de los receptores muscarínicos también aumentan el flujo de potasio a través de las membranas celulares. Este efecto es mediado por una proteína G activada que se enlaza directamente al conducto.

El principal efecto de la activación del receptor nicotínico es la despolarización de la célula nerviosa o de la placa terminal neuromuscular en donde se encuentra el receptor.

Si la activación del receptor nicotínico se prolonga, desaparece la respuesta del efector; es decir, la neurona postgangliónica cesa de descargar y la célula del músculo esquelético se relaja. Más aún, la presencia continua del agonista nicotínico evita la recuperación eléctrica de la membrana postsináptica. En esta manera se induce un estado de "bloqueo despolarizante" que es el refractario a ser invertido por los otros agonistas.

II.2.2.3 Efectos en órganos, aparatos y sistemas

II.2.2.3.1 Ojos: Los agonistas muscarínicos instalados en el saco conjuntival producen la contracción del músculo liso del esfínter del iris (lo que resulta en miosis).

II.2.2.3.2 Sistema cardiovascular: La administración intravenosa de dosis eficaces mínimas de acetilcolina en seres humanos (por ejemplo, 20 a 50 µg/minuto) ocasionan vasodilatación,

dando como resultado la disminución de la presión arterial, acompañado con frecuencia de un aumento reflejo de la frecuencia cardíaca.

Las acciones cardíacas directas de los estimulantes muscarínicos incluyen un aumento importante en la permeabilidad de la membrana al potasio en las células del músculo auricular y probablemente en las células de los nodos senoauricular y auriculoventricular. Además, los estimulantes colinoceptores reducen la velocidad de la corriente lenta de entrada del calcio en las células auriculares y nodales. Por último se observa una reducción en la corriente del sodio que sustenta la despolarización diastólica.

En el organismo intacto, los agonistas muscarínicos producen una notable vasodilatación. Los efectos cardiovasculares de todos los ésteres de colina son similares a los de acetilcolina, y la principal diferencia reside en su potencia y duración de acción. Debido a la resistencia de la metacolina, carbacol y betamecol a la acetilcolinesterasa.

II.2.2.3.3 Aparato respiratorio: El músculo liso del árbol bronquial se contrae en presencia de estimulantes muscarínicos. Además, se estimula la secreción de las glándulas de la mucosa traqueobronquial.

II.2.2.3.4 Aparato digestivo: La administración de agonistas muscarínicos, como los que estimulan el sistema nervioso parasimpático, provoca un aumento en la actividad secretora y motora del intestino. Las glándulas salivales y gástricas se estimulan considerablemente. La actividad peristáltica aumenta en todo el intestino, y la mayor parte de los esfínteres se relajan.

II.2.2.3.5 Aparato genitourinario: Los agonistas muscarínicos estimulan al músculo destructor, y relajan a los músculos del trigono y el esfínter de la vejiga, favoreciendo su vaciamiento.

Glándulas secretoras diversas: Los agonistas muscarínicos estimulan la actividad secretora de las glándulas sudoríparas, lacrimales y nasofaríngeas.

II.2.2.3.6 Sistema nervioso periférico: La nicotina en sí tiene afinidad ligeramente superior hacia los receptores neuronales en comparación con los receptores nicotínicos del músculo esquelético. Cuando se inyecta nicotina por vía parenteral se produce hipertensión dramática; la taquicardia simpática puede alterar con bradicardia mediada por el vago. En el aparato digestivo y el urinario, los efectos principalmente parasimpaticomiméticos: náusea, vómito, diarrea e incontinencia urinaria son los que observan con mayor frecuencia.

Unión neuromuscular: Los receptores nicotínicos en la placa terminal neuromuscular son similares, aunque no idénticos a los receptores en los ganglios autonómicos. Cuando se aplican directamente (por iontoforesis o inyección intrarterial) se observa despolarización inmediata de la placa terminal, ocasionada por aumento en la permeabilidad a los iones sodio y potasio.

II.2.2.3.7 Sistema nervioso central: El sistema nervioso central contiene receptores tanto de tipo muscarínico como nicotínico, el encéfalo es relativamente más rico en sitios muscarínicos, mientras que la médula espinal manifiesta preponderancia de sitios nicotínicos.

La nicotina y la lobelina ejercen efectos importantes en el tallo encefálico y la corteza. De estos efectos, el mejor conocido es la leve acción alertante de la nicotina que se inhala proveniente del humo del tabaco. A concentraciones mayores la nicotina induce temblores, emesis y estimulación del centro respiratorio. A niveles mayores, la nicotina ocasiona convulsiones que pueden terminar en coma mortal.

Cuadro 2. Características diferenciales de los agentes parasimpaticomiméticos

	Actividad intrínseca	Inhibición por AChI	Especificidad	Efectos Muscarínicos	Efectos Nicotínicos
Acetilcolina	++++	+++	No	Sí	Sí
Anticolinesterásicos	+	-	No	Indirectos	Indirectos
Betanecol	+	No	GL,CV	Sí	No
<i>Carbacol</i>	++	No	GL,CV	Sí	Sí
Edrofonio y Neostigmina	+	-	No	Sí	Directos PM
Mecolil	+++	+	CV	Sí	No
Muscarina	++	No	No	Sí	No
Pilocarpina	+	No	Ojo, Secreciones	Sí	No

GL: Tracto gastrointestinal, CV: Cardiovascular, PM: placa motora, AChI: acetilcolinesterasa

II.2.3 Farmacodinámia

II.2.3.1 Mecanismo de acción. La acetilcolinesterasa es una enzima sumamente activa. En el paso inicial, la acetilcolina se enlaza al sitio activo de la enzima y experimenta hidrólisis, produciendo colina libre y la enzima **acetilada**. En el segundo paso, se rompe el enlace covalente acetilo-enzima, por la adición de agua. Todo el proceso se lleva a cabo en aproximadamente 150 microsegundos.

II.3 FARMACOLOGÍA CLÍNICA DE LOS ESTIMULANTES DE LOS COLINOCEPTORES

Debido al bloqueo despolarizante nicotínico de la placa terminal motora, las personas también pueden presentar síntomas de estimulación excesiva de los receptores muscarínicos (calambres abdominales, diarrea, aumento de la salivación, secreciones bronquiales excesivas, miosis, bradicardia).

Si los efectos muscarínicos son demasiado notables, se pueden controlar mediante la administración de medicamentos antimuscarínicos como la atropina.

II.3.1 Estimulantes muscarínicos de acción directa.

Agentes como la pilocarpina y los ésteres de la colina, causan signos predecibles de exceso muscarínico cuando se administran en dosis excesivas. Entre estos signos están: náusea, vómito, diarrea, salivación, diaforesis, vasodilatación cutánea y constricción bronquial (Watanabe, M August., Bertram, Katzung, G., 1994).

III. Estudios sobre acciones colinérgicas mediante la microscopia electrónica.

La aplicación de Pardoxina a bajas concentraciones sobre la estructura de sinaptosomas puramente colinérgicos del órgano eléctrico marmota torpedo, la preserva normalmente; pero a altas concentraciones presenta una perturbación a nivel de la membrana sinaptosomal, sugiriendo un efecto lítico sobre dicha membrana (Arribas, M., Blasi, J., Lazarovici, P. and Marsal, J., 1993). Se ha observado que la hipoglucemia, induce también cambios morfológicos en las terminales nerviosas de las arterias cerebrales del gato. Esto se efectuó mediante el análisis de las vesículas de centro denso relacionadas a noradrenalina y las vesículas claras relacionadas a acetilcolina. Las vesículas de centro denso fueron significativamente pequeñas y las vesículas claras fueron significativamente grandes en hipoglucemia que en normoglucemia (Isozumi, k., Fukuuchi, Y., Koto, A., Suzuki, N., Izumi, Y. and Tsuzuki, Y., 1991). También la cicloleucina un inhibidor de la metionina adenosiltransferasa presenta daño morfológico a nivel de sistema nervioso central y

periférico, donde se muestra una vacuolización intramielínica, desarrollada principalmente en la materia blanca del cerebro y en la columna del ratón, haciéndose mucho más severa en sobrevivientes a largo plazo; donde se observa que las vacuolas se van agrupando y la degeneración axonal secundaria comienza a hacerse evidente. Las lesiones axonales ocurren en las partes distales de los nervios motores de 12 a 24 hrs. resultando en degeneración de las terminales y fibras nerviosas intramusculares (Lee, C., Surtees, R. and Duchon, L. W., 1992).

El efecto del ión aziridium mostaza etilcolina (AF64A) sobre neurotransmisión colinérgica en el sexto ganglio abdominal de la cucaracha muestra, que las terminales nerviosas contienen pequeñas vesículas claras que no pueden apreciarse bien, pero aquellas vesículas granulares grandes ó que tienen centro denso, presentan ligeros cambios en la forma. Esto sugiere que el AF64A es selectivamente neurotóxico para las neuronas colinérgicas presinápticas en el sexto ganglio abdominal de la cucaracha (Morio, Y. and Yagasaki, O.).

Por otro lado se ha visto que la serotonina (5-hidroxitriptamina) y el carbacol, alteran las neuronas de la sanguijuela, la distribución elemental de las células gliales, además del contenido de agua; ya que se ha observado que el carbacol disminuye el contenido de agua neuronal alrededor del 9% independientemente de la dosis. Ambos serotonina (5-HT) y carbacol afectan además las propiedades de acumulación de K^+ en las células gliales (Foster, M.C., Castiglia, C.M. and Subermann, A.J., 1992). La acción colinomimética de carbacol y del compuesto 48/80 fué ensayada también sobre la ramificaciones de la arteria cerebral media de conejo, en presencia y ausencia de atropina; revelando que tanto el carbacol como el compuesto 48/80 reducen la cantidad de serotonina (5-HT) presente en un 50%, e inducen una marcada degranulación de las células mastocíticas (Reynier Rebuffel, A., Callebert, J., Dimitriadou, V., Mathiau, P., Launary, J., Seylaz, J. and Aubineau, P., 1992).

Se estudió por 14 días el efecto nociceptivo producido por la administración crónica de carbacol a (nivel lumbar) en 8 ratas, por inmersión de la cola y presión de una pata; observándose que el carbacol administrado a las ratas, no presentó signos de reacciones neurotóxicas de las neuronas o del tracto espinal. Sin embargo para administrarse a humanos, se considera que deben obtenerse más datos neurotóxicológicos (Svensson, B.A., Sottile, A. and Gordh, T.J., 1991).

IV. REACCIONES DE LAS NEURONAS AL DAÑO

Thomas M. Jessel et al., (1991), realizaron estudios en nervio periférico de rata y sistema nervioso central, observando que cuando se corta en dos segmentos un axón, ocurren cambios degenerativos en la neurona como son:

IV.1 Hinchamiento: Debido a los componentes que normalmente son acarreados dentro del axón para su crecimiento o comunicación. El hinchamiento proximal es muy grande debido a que el cuerpo celular continua sintetizando los componentes del citoesqueleto, neurofilamentos, microtubulos y microfilamentos, los cuales se mueven hacia el axón por flujo axoplásmico lento.

IV.2 Entrada de Ca^{2+} : Lo cual puede ser importante en la mediación de los efectos dañinos del axón dañado a través de la activación de proteasas Ca^{2+} -dependientes o generación de radicales libres, tales como superóxidos que tienen acción tóxica sobre las neuronas.

El daño del axón dispara otras alteraciones en la neurona dañada y eventualmente afecta las células que hacen contacto sináptico con la neurona dañada.

Después de unos días de haber cortado el axón los cambios morfológicos que ocurren en la degeneración de la sinapsis son: las terminales de algunas neuronas centrales comienzan a llenarse de espirales de neurofilamentos que rodean a las mitocondrias que han comenzado a hincharse y romperse. Otras comienzan eventualmente a llenarse con productos electro-densos de degeneración.

Después de la 1ª semana los contactos entre las terminales y neuronas postsinápticas o células blanco periféricas están rotas por invasión de las células gliales. Durante la 2ª semana las terminales del segmento distal se retraen completamente de las células postsinápticas. El segmento del axón distal degenera lentamente. Los compartimentos membranales del cuerpo celular se han roto.

Este fenómeno se le conoce como cromatólisis y se caracteriza porque el núcleo hinchado se mueve a una posición excéntrica, usualmente opuesta al sitio del axón.

La cromatólisis es más fácilmente vista cuando el retículo endoplásmico rugoso (sustancia de Nissl) es teñido con colorantes básicos, tales como tionina, que se enlaza a los ribosomas, y se verá como aquel que rodea el margen de la célula.

La cromatólisis es frecuentemente acompañada por un incremento en el número de polisomas

libres en la célula, por el incremento del RNA y síntesis de proteínas.

No todas las neuronas exhiben cromatólisis o cambios regenerativos después de la axotomía.

IV.3 Factores tróficos que previenen la degeneración de las neuronas después de la axotomía.

Los factores tróficos disparan cambios bioquímicos en la neurona que son importantes para su sobrevivencia y desarrollo.

El factor de crecimiento del Nervio (NGF) es el factor neurotrófico mejor caracterizado.

Tres principales clases de neuronas son sensibles a la acción trófica del NGF.

Neuronas Simpáticas

Neuronas Sensoriales primarias del ganglio dorsal

Neuronas Colinérgicas (Del septum y núcleo basal del cerebro superior)

La disponibilidad de los factores tróficos determinan si las neuronas dañadas serán conservadas.

El transporte retrógrado del NGF o un mensajero intracelular movilizado por activación del receptor NGF, es esencial si bien para su acción trófica.

El transporte retrógrado en axones intactos puede ser alterado por drogas tales como la colchicina en el nervio postgangliónico; bajo estas condiciones las terminales presinápticas se separan posiblemente por la interrupción del flujo retrógrado del factor neurotrófico o segundos mensajeros.

Una interpretación de estos hallazgos es que el NGF reprime la síntesis de proteínas que son tóxicas para la neurona, por ejemplo, proteasas y otras enzimas.

En neuronas simpáticas y sensoriales, macrófagos y células de Schwann actúan por otro camino para contribuir a la recuperación de los axones. Los macrófagos que migran al sitio del daño liberan una proteína Interleucina 1, que media la interacción linfocítica en el sistema inmune.

Las neuronas en el S.N.C. adulto limitan su capacidad para regenerar sus axones.

Utilizan sus proteínas y moléculas de crecimiento para todo el sistema y las enfocan en las áreas dañadas como las glycoproteínas, Laminina y fibronectina.

En resumen , las reacciones de las neuronas dañadas varían dramáticamente. Una neurona puede sobrevivir si es capaz de reestablecer su conexión funcional después de que su axón se ha cortado. Si su conexión con las células blanco no se reestablece, la célula se atrofiará y morirá.

(kandel, R. Eric, Schwann., H. James, Jessell., M. Thomas, 1991).

V. Hipótesis y objetivos

V.I Hipótesis:

La aplicación tópica de carbacol en la amígdala del lóbulo temporal provoca cambios morfológicos principalmente a nivel de vesículas sinápticas, su distribución y cantidad en las terminales presinápticas en el área parabraquial.

V.2 Objetivos:

- 1) Observar, identificar y clasificar los cambios morfológicos en el área parabraquial del gato, provocados por la microinyección de carbacol y compararlos con la morfología de un control.
- 2) Determinar si el carbacol provoca cambios a nivel de las áreas presináptica y postsináptica.
- 3) Determinar si el carbacol influye sobre el número de vesículas de las terminales sinápticas.
- 4) Observar si hay cambios sobre las características morfológicas de las mitocondrias provocados por carbacol.
- 5) De los cambios morfológicos provocados por carbacol, elegir aquellos que podrían representar una real diferencia y definir si existe alguna relación de estos fenómenos con el sueño MOR en el gato.

VI. Material y métodos

El proyecto se llevó a cabo utilizando 9 gatos adultos machos (*Felix domesticus*), con un peso entre 3.5 y 4.5 Kg. A estos animales se les preparó para el registro de los diferentes estados del sueño y la aplicación de carbacol en la región amigdalina, considerando que la amígdala posee conexiones aferentes y eferentes con el área parabraquial, y que ambas zonas están relacionadas con el aumento del sueño REM. Posteriormente, los animales fueron sacrificados por perfusión intracardiaca, separando el cerebro para llevar a cabo el análisis histológico de las regiones amigdalina y parabraquial; efectuando cortes continuos en un vibratomo hasta llegar a estas áreas, y obtener rebanadas homogéneas de los sitios de interés, eligiendo las secciones que después serían procesadas para su estudio, observación y análisis por microscopía electrónica (figs. 3a, 3b, 3c, y 3d).

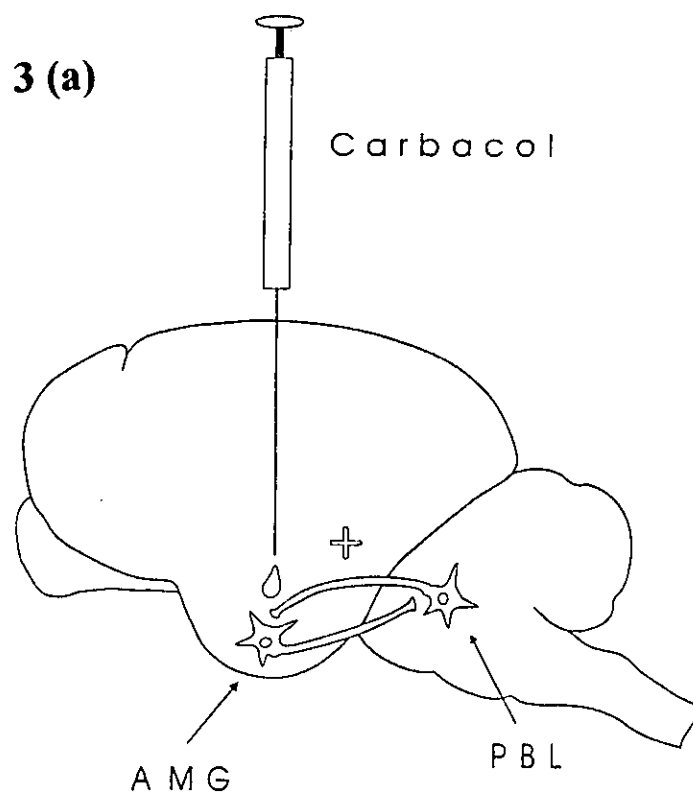


Figura 3 (a). Sitio de aplicación del carbacol y localización de las áreas amigdalina (AMG) y parabraquial (PBL); donde se muestra la relación existente entre ambas regiones, mediante las conexiones aferentes y eferentes.

Figura 3 (b). Corte sagital del cerebro de gato , tomado del atlas de Snider del cerebro del gato (1961). El cuadro muestra la localización del área parabraquial PBL; comprendida por los núcleos celulares que rodean al braquium conjuntivo (BC), como son los núcleos marginales del braquium conjuntivo (BCM).

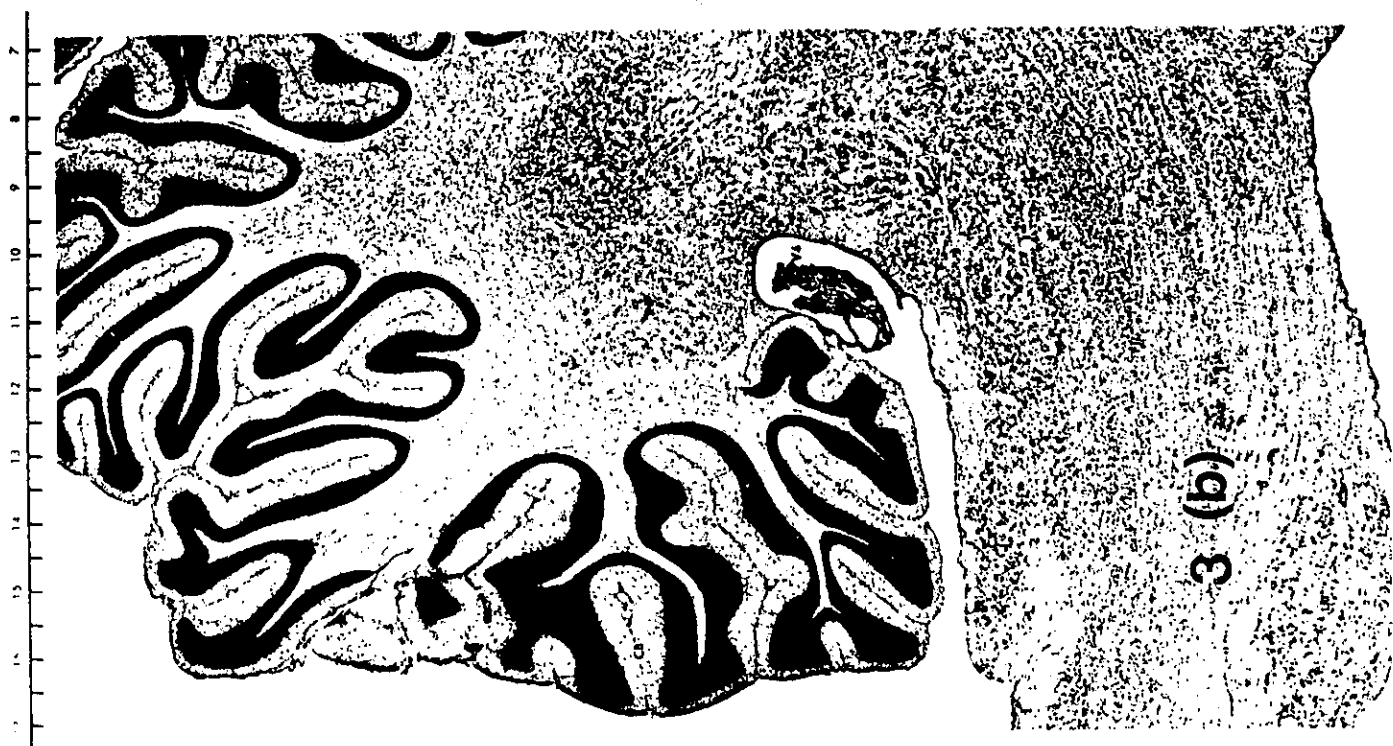
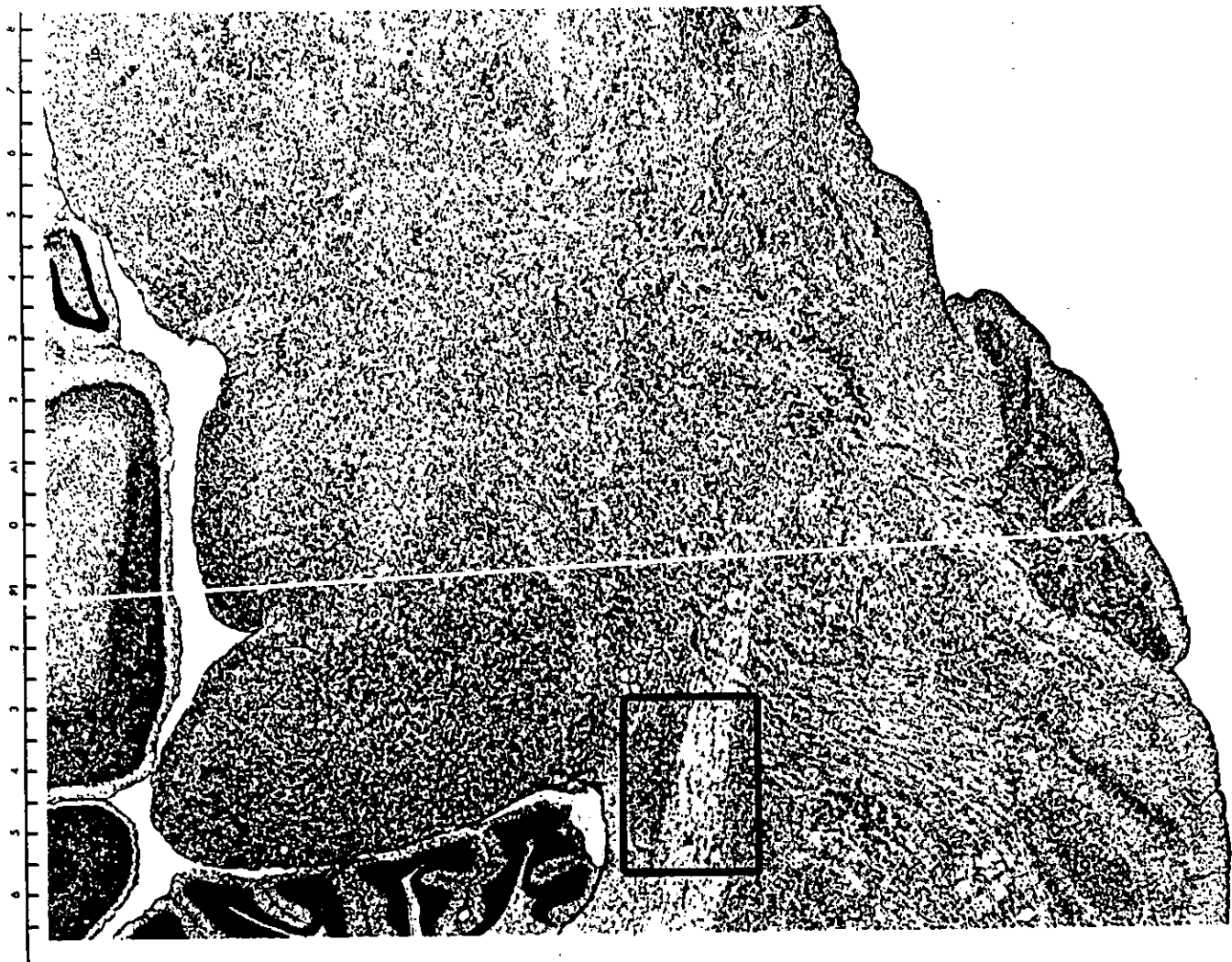
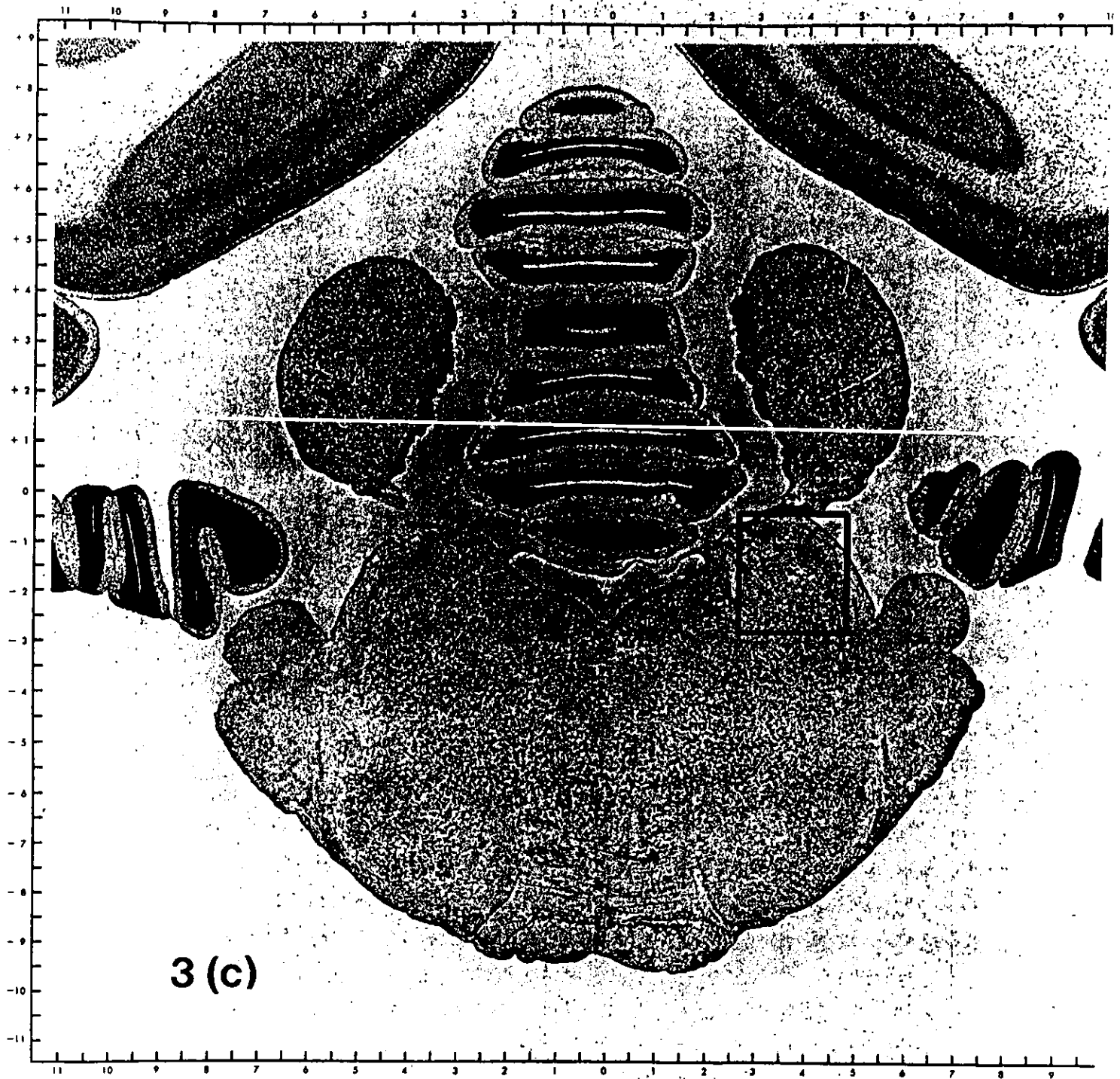


Figura 3 (c). Corte coronal del cerebro del gato, tomado del atlas del cerebro del gato de Snider (1961). El cuadro muestra la localización del área parabraquial o como los núcleos marginales del braquium conjuntivo (BCM).



3 (c)

18

P3.1

4N trochlear nerve
 BN trigeminal nerve
 BC brachium conjunctivum
 BCM marginal nucleus of the brachium conjunctivum (17)
 BP brachium pontis
 C cerebral cortex
 CAE nucleus caeruleus (19)
 CB cerebellar cortex
 CS superior central nucleus (22)
 FTG gigantocellular tegmental field (11)
 FTF paralemniscal tegmental field (20)
 ICP pericentral nucleus of the inferior colliculus (21)
 INC nucleus incertus (18)
 NF Kölliker-Fuse nucleus (17)
 LV ventral nucleus of the lateral lemniscus (19)

MLB medial longitudinal bundle
 P pyramidal tract
 PGD pontine gray, dorsolateral division (22)
 T nucleus of the trapezoid body (15)
 TAD accessory dorsal tegmental nucleus (18)
 TB trapezoid body
 TDP dorsal tegmental nucleus, pericentral division (11)
 TRC tegmental reticular nucleus, central division (20)
 V4 fourth ventricle

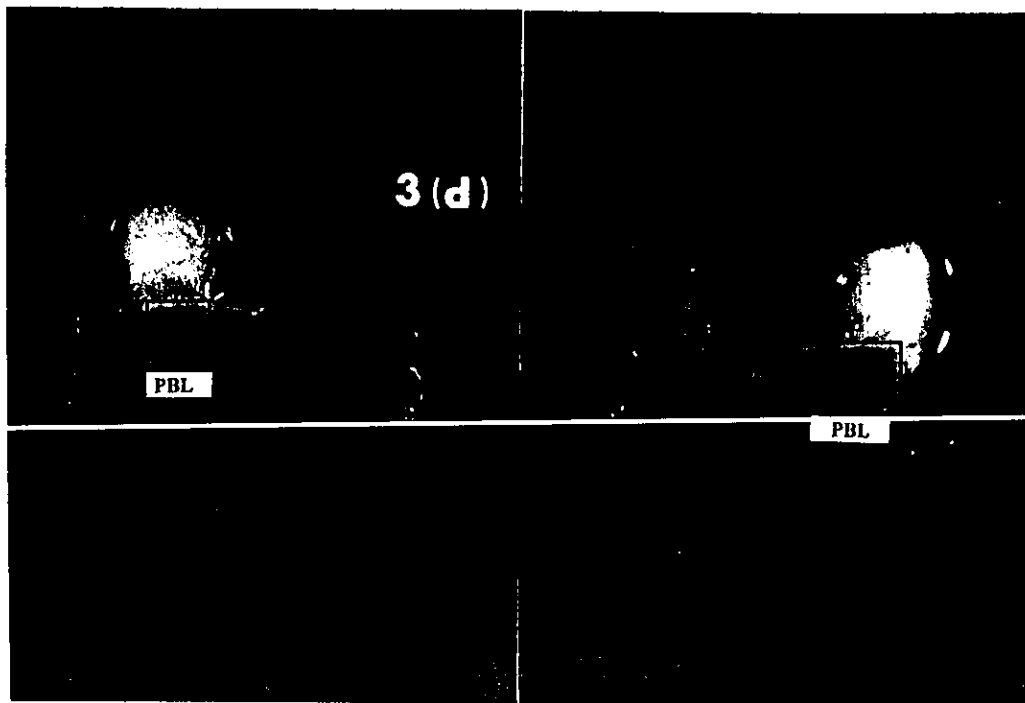


Figura 3 (d). Localización del área parabraquial (PBL) en cortes coronales del cerebro del gato, obtenidos tanto de los cerebros de los gatos tratados con carbacol como de los controles. El cuadro muestra el área parabraquial (PBL), donde se realizó el estudio de los cambios morfológicos provocados por carbacol y su análisis por microscopía electrónica.

VI.1 Análisis electrofisiológico

Los gatos fueron preparados con electrodos implantados a permanencia para el registro de los diferentes estados del sueño y la vigilia (electroencefalograma, EEG; electrooculograma, EOG; electromiograma, EMG) y con electrodos para el registro de los potenciales PGO. Los animales también fueron preparados con cánulas guía a permanencia para la microinyección de carbacol en la AMG.

VI.2 Procedimientos Quirúrgicos y Estereotáxicos

Los procedimientos quirúrgicos para la implantación de los electrodos y las cánulas, se efectuaron bajo anestesia general con pentobarbital (33 mg/kg). Una vez expuesto el cráneo, el techo del seno frontal se abrió parcialmente y se colocaron los electrodos para el registro del EOG en los límites anterior y posterior de la órbita ocular. Los electrodos para el registro EEG se colocaron superficialmente sobre la corteza sensomotora (para registro predominante de los husos del sueño) y sobre la corteza parietal (para registrar predominantemente las ondas lentas).

Para el registro de los potenciales PGO se colocaron estereotáxicamente (Snider and Niemer, 1961) electrodos constituidos por 5 alambres de acero inoxidable (de 0.25 mm. de grueso y con 0.5 mm. de separación vertical entre las puntas) en ambos cuerpos geniculados laterales coordenadas: (AP, 6.5 A; L, 9.5, V +3.0). También se colocaron electrodos en los músculos de la nuca para el registro del EMG y un electrodo más sobre el seno frontal que fué utilizado como electrodo tierra. Los alambres provenientes de todos los electrodos fueron soldados a un conector de 25 puntas y todo este arreglo fué fijado al cráneo con cemento acrílico.

Para llevar a cabo las microinyecciones de carbacol, se colocaron cánulas guía en ambas AMG, 2 mm. por arriba del límite superior del NC amigdalino (AP, 11.5 A; L, 10 ; V, -0.5). Estas cánulas tenían 2 alambres de acero inoxidable adheridos para el registro de los cambios electrofisiológicos provocados por el carbacol. Para la microinyección de carbacol en los diferentes núcleos amigdalinos central, basal, lateral o basolateral, se utilizaron cánulas inyectoras

de diferentes longitudes. Para evitar que se obstruyeran las cánulas mientras no eran utilizadas, fueron ocluidas por un mandril de acero inoxidable.

Inmediatamente después de la intervención quirúrgica, los animales fueron sometidos a un período de recuperación de 10 a 15 días, durante el cual se les administraron antibióticos por vía intramuscular (pemprocilina, 100.000 UI/Kg) cada 24 horas durante 8 días y de manera tópica (terramicina) en los bordes de la incisión del cuero cabelludo.

VI.3 Períodos de Recuperación y Habitación a las Situaciones Experimentales.

Inmediatamente después de las intervenciones quirúrgicas los animales fueron sometidos a un período de recuperación de 8 a 10 días. Durante este período los gatos permanecieron en la cámara de registro con acceso libre al agua y alimentos, y bajo un ciclo de luz-obscuridad constante (12:12 h.). Antes de comenzar cualquier serie experimental, los gatos fueron habituados a los cables de registro durante 8 horas (10:00 - 18:00 h.) en los últimos 5 días del período de habituación.

Posteriormente, se realizaron 3 registros poligráficos de sueño durante 8 horas en 3 días consecutivos, en situaciones de control. La actividad EEG de la corteza motora, corteza frontal y de ambas AMG, el EMG el EOG y la actividad PGO fueron amplificadas e inscritas en un polígrafo.

VI.4 Administración de Carbacol.

Los inyectores fueron contruidos por cánulas (calibre 31) que tenían soldada en su parte superior otro tramo de cánula más gruesa (calibre 24), a la cual se conectó un catéter (PE20) y éste, fue conectado a una jeringa Hamilton de 1µl. El inyector fue insertado en la cánula guía implantada crónicamente y se administró carbacol (4µg / 0.25 µl. salina) ó solución salina control. El tiempo de administración fue de 1 min. y el inyector se mantuvo en el sitio de inyección por 1 min. más antes de extraerlo. Después de extraerlo, se probó nuevamente el flujo de la sustancia a través del sistema de inyección.

Después de la aplicación del carbacol, se observó el comportamiento de los animales en la cámara sono-amortiguada de registro durante 30 minutos. Asimismo, después de la

microinyección y los siguientes cuatro días, se realizaron registros poligráficos durante 8 horas diarias y bajo las mismas características que los realizados en condiciones de control, para determinar el efecto del carbacol sobre la densidad y patrón de ocurrencia de los potenciales PGO, la tasa diaria de las diferentes fases de vigilia y sueño, los episodios de SPHOL y del sueño REM. El día de la microinyección y los siguientes cuatro días, la actividad PGO durante los episodios de SPHOL y del sueño REM fue grabada y analizada al igual que en la situación de control.

VI.5 Comprobación del sitio de microinyección de carbacol.

Al finalizar las series experimentales los sitios de microinyección del carbacol se verificaron histológicamente. Después de las microinyecciones, los animales fueron sacrificados mediante la aplicación de pentobarbital sódico y posteriormente perfundidos por vía intracardiaca, para efectuar posteriormente cortes histológicos seriados de 60 a 100 μm y comprobar así el sitio de la microinyección, seccionando también las áreas de interés para llevar a cabo el análisis por microscopia electrónica de la región amigdalina y PBL.

VI.6 Perfusión de los animales.

Los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca, realizando ensayos en dos de ellos, con diferentes fijadores para encontrar las condiciones de fijación y conservación tanto morfológicas como generales más adecuadas del tejido, llegando finalmente a la utilización de las siguientes soluciones y concentraciones:

Se hizo pasar inicialmente una solución buffer de fosfatos 0.16M + xilocaina al 2% (3 ml / 100 ml de soluc.) + 500 U.I. de heparina como soluc. lavadora, ajustada a un pH de 7.3.

Posteriormente se utilizó como fijador una solución de glutaraldehido al 2.5% + 4 gotas de H_2O_2 al 30% por c/20ml. de soluc., todo esto en buffer de fosfatos 0.16M pH 7.3 (Peracchia, et al.;1972), haciendo lo mismo para los animales control.

VI.7 Procesamiento de las muestras para su análisis por microscopía electrónica.

Una vez efectuada la perfusión, los cerebros fueron removidos cuidadosamente y colocados en fijador (glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfatos), para realizar los cortes de las áreas de interés, éstos trozos de tejido fueron mantenidos en el fijador por 2 horas, y las muestras tratadas con H₂O₂ fueron lavadas por 30 minutos con buffer de fosfatos, 4 lavados de 7 minutos c/u. Posteriormente se aplicó una postfijación con tetróxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos 0.1M durante 1.5 hrs. a temperatura ambiente en la mayoría de las muestras. Todas las muestras de tejido fueron deshidratadas gradualmente con alcoholes al 70, 80, 90 y 100%, realizando cambios de 15 minutos c/u, excepto el de 100%, al cual se le dieron dos periodos de 20 minutos. Las muestras de tejido fueron preincluidas en resina epon 812, 1:1 con oxido de propileno durante 24 horas, e incluidas en resina epon 812, dejando polimerizar dentro de una estufa a 60°C durante 24-36 horas.

Los cortes semifinos fueron realizados en un ultramicrotomo MT-7 de RMC, se tiñeron con azul de o-toluidina, y se observaron en un microscopio (Ernest Leitz Wetzlar Laborlux).

Los cortes finos (90 a 100 nm) se efectuaron en el mismo equipo y se recogieron en rejillas malla 200 con soporte de película de formvar, y fueron contrastadas con acetato de uranilo por 20 minutos y citrato de plomo 8 minutos . La observación de los cortes finos se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss E.M. 900).

Las micrografías electrónicas se obtuvieron de este mismo equipo, y fueron reveladas para su posterior análisis.

La medición de estructuras y organelos para el análisis cuantitativo, tanto en las muestras tratadas con carbacol como en las muestras control , se realizó con la ayuda de un programa morfológico computarizado de nombre Biocom; mediante el cual fue posible generar los datos que fueron analizados estadísticamente, para su posterior interpretación.

VII. Resultados

Se compararon las micrografías de los tejidos procesados, tanto controles como tratados; analizando en éstas los cambios u observaciones morfológicas detectables a simple vista y a diferentes aumentos; en los cuales fuese posible observar con mejor detalle algún cambio.

Se valoró la morfología en varios campos para cada una de las muestras estudiadas mediante el microscopio electrónico, las micrografías que se muestran, fueron elegidas de diferentes campos y son representativas del total de 213 micrografías analizadas.

VII.1 Aspectos Cualitativos

De las observaciones generales realizadas a las muestras tratadas con carbacol comparadas con las muestras control, se destacan por ejemplo; algunos campos celulares que presentan mitocondrias de mayor tamaño con respecto a las observadas en las muestras control, semejando un hinchamiento de éstas como se aprecia en las figuras (4c, d), y figura (8c, d) tratadas, con respecto a las muestras control (a y b) de ambas figuras.

También en la muestra tratada de la figura (4d), se puede observar que los lisosomas tienen un tamaño mayor que en las muestras control (4a y b), observándose por último en esta misma figura (4d), la presencia de vacuolas vacías dentro del citoplasma celular.

En la figura 5; podemos observar que los núcleos celulares de las muestras tratadas tienden a ser ovalados, y la membrana nuclear presenta ondulaciones, mientras que en los controles, los núcleos tienden a ser más redondos como se aprecia en las micrografías (5c, 5d) y (7h), con respecto a los controles (5a y b).

En cuanto a cambios a nivel del núcleo, no se observa el nucleolo en las muestras tratadas, pues no aparece más en el total de las células analizadas, apreciándose también cierta disposición de la cromatina nuclear desplazada hacia la periferia del núcleo, y la manifestación de puntos o agrupaciones de gránulos ribonucleoprotéicos, que se alinean al centro y a lo largo del núcleo celular, como se observa en las micrografías (5c, d, y e). Nuevamente se puede ver que los lisosomas tienen un tamaño mayor en las muestras tratadas que en las muestras control.

Uno de los fenómenos más destacados en las muestras tratadas al compararse con los

controles, es la formación abundante de vacuolas vacías; elaboradas por el aparato de Golgi y que se dispersan por completo dentro del citoplasma celular, como se muestra en las micrografías del recuadro (5c y e).

Por otro lado se observa la presencia de vesículas de centro denso rodeando a algunas de las células, donde se localizan áreas o agrupaciones de botones sinápticos con este tipo de vesículas, cercanos a los vasos sanguíneos, o en puntos no regulares en el campo de observación; mostrando que en los tejidos tratados con carbacol hay un aumento en el tamaño de los botones sinápticos y de vesículas de centro denso como se aprecia en las micrografías (6d y f), observándose también espacios vacíos, y la aparición de neurofilamentos a los alrededores de la células, junto con el desplazamiento del nucleolo hacia una de las orillas del núcleo en la micrografía (6d).

En las micrografías (6a y b) controles, se puede observar muy bien como la forma de los lisosomas se modifica cambiando de forma ovalada, a diferentes formas en las muestras tratadas; como se puede comparar de las micrografías (6c y d). De nueva cuenta se observa el aumento de tamaño en las mitocondrias de las muestras tratadas.

El engrosamiento de algunas dendritas, y la ramificación de nuevas espinas dendríticas, son observaciones que se muestran en la figura (6' b y c).

Una observación poco común pero significativa de los campos observados, fue la presencia de gránulos electrodensos en algunas terminales sinápticas y de la aparición de filamentos gliales dentro del citoplasma celular, además de un evidente hinchamiento de las mitocondrias circundantes a la célula, lo que sugiere que hay un efecto de daño celular en algunas áreas y degeneración de terminales sinápticas; en adición a la observación de desvanecimiento en la membrana de una de éstas terminales, que se muestran en las micrografías de la figura 7c, d, g, h y f, de las muestras tratadas, comparadas con las muestras control 7a, b, y e. En ésta figura se pueden apreciar las vesículas de centro denso en mayor proporción dentro de las terminales sinápticas en las micrografías de las muestras tratadas 7d, f, y h, que de las muestras control, alcanzándose a observar el efecto de degeneración de lo que parece ser una dendrita en la micrografía 8f. También se puede observar lo que posiblemente fuese un grado avanzado en la degeneración a nivel de mitocondria y del núcleo, como se muestra en la micrografía 7g. El aumento del espacio interno en algunas de las terminales sinápticas y del tamaño de las mitocondrias, se puede apreciar al comparar las muestras 8c y d, con respecto a las muestras

control 8a y b.

El desvanecimiento de la membrana nos hace ver que el contenido de los organelos se dispersa y no hay delimitaciones morfológicas, por lo que las definiciones compartamentales se pierden, observándose únicamente los restos de membranas u organelos que comienzan a desaparecer, como se muestra en la figura 9c; con respecto a la muestra control 9a, apareciendo también neurofilamentos en dendritas que sugieren degeneración de éstas, y mitocondrias electrodensas.

Una de las apreciaciones que se presentan en las muestras tratadas ; es que, la influencia del fármaco sobre esta zona, parece exigir con demasía la producción de vesículas claras tanto como de vesículas de centro denso, lo que provoca que el sistema membranal sea utilizado para la formación de vacuolas, que probablemente serán utilizadas para la formación de las vesículas requeridas, observándose una mayor cantidad de terminales sinápticas con vesículas claras como se ilustra en las micrografías 9d y g (flechas triangulares y claras), que sugieren este fenómeno.

En las siguientes micrografías se muestran algunos elementos que por lo regular están presentes en la mayoría de los campos analizados en las muestras tratadas con carbacol, como son; la presencia de cuerpos electrodensos en mitocondrias y vesículas sinápticas, como se puede apreciar en la figura 10c y e, tratadas con carbacol. También se observa en la micrografía 10d, la cercanía de dos terminales sinápticas a una dendrita donde se aprecia la falta de continuidad de la membrana, además de las ondulaciones que presenta, al compararse con las muestras control 10a y b, lo que puede ser un factor importante para que se de la sinapsis como se muestra en la micrografía 10b control de esta figura y no como se observan en algunas de las sinapsis discontinuas encontradas en las muestras tratadas con carbacol y que se ejemplifica en la micrografía 7f.

Por otro lado se muestra nuevamente en la micrografía 10d, la falta de definición compartamental debido al desvanecimiento de las membranas, que hace difícil identificar las delimitaciones de las terminales sinápticas y de los demás componentes en la micrografía. Todo lo anterior sugiere que de algún modo el carbacol produce daño celular y cambios morfológicos finos en los niveles anteriormente expuestos.

Figura 4. Micrografías electrónicas mostrando el efecto de carbacol sobre mitocondrias, lisosomas y vacuolas citoplásmicas. Las micrografías (a y b) son controles, (c y d) tratadas con carbacol. En las micrografías (c y d) se muestra un aumento en el tamaño de las mitocondrias (**m**) flechas semidelgadas, y lisosomas (**Li**) flechas curvas en (d), además de la presencia de vacuolas vacías dentro del citoplasma celular flechas delgadas, que en las muestras control (a y b) no se observan. (**N**) núcleo, (**Ci**) citoplasma, (**n**) nucleolo. Escala de la barra 2.5 μm . X3000.

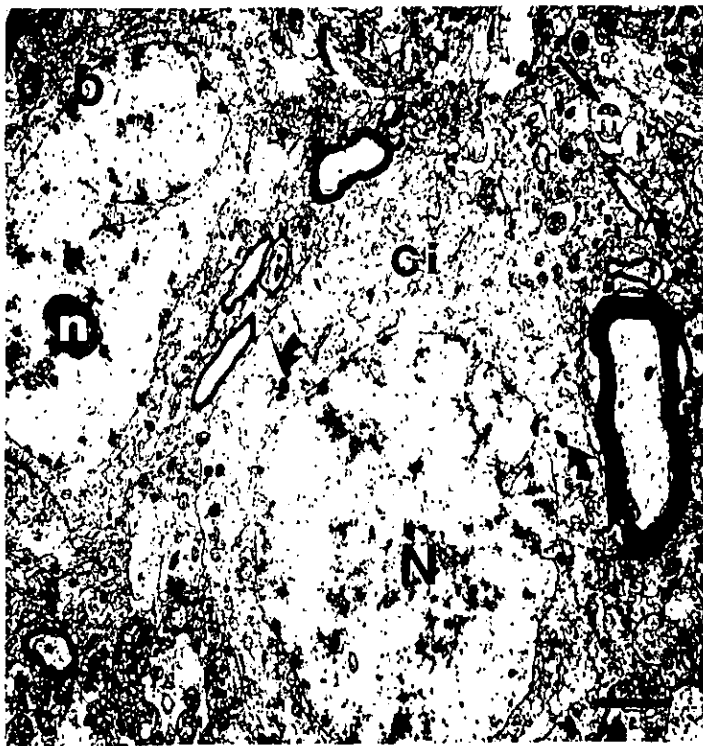
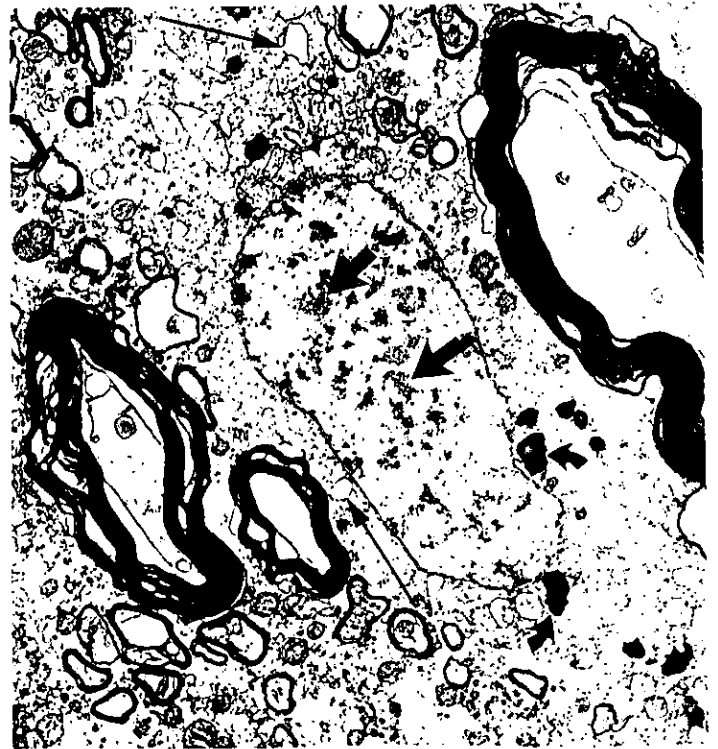
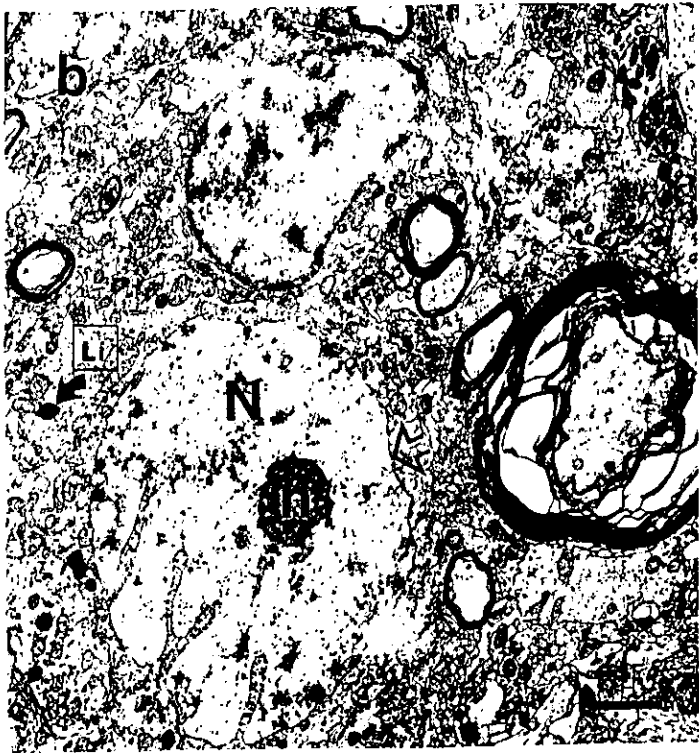
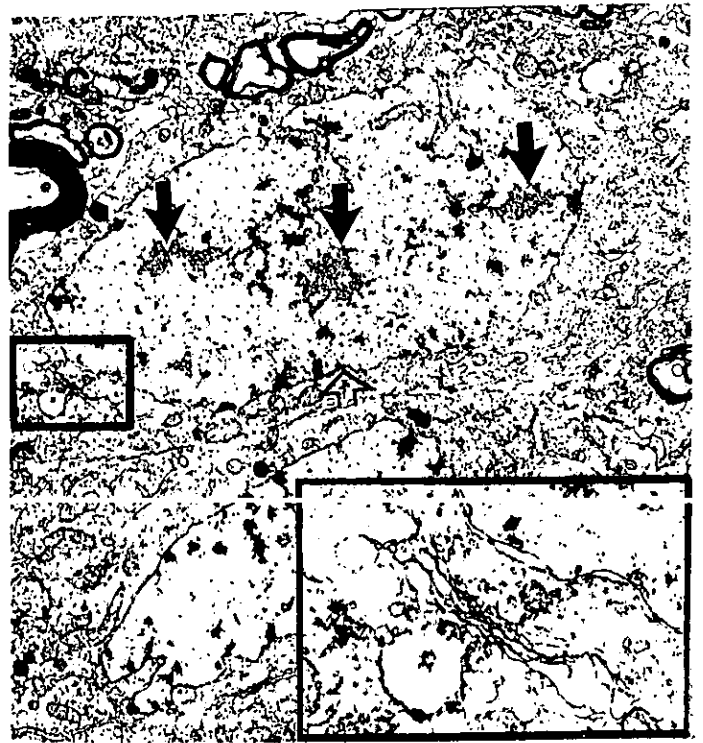
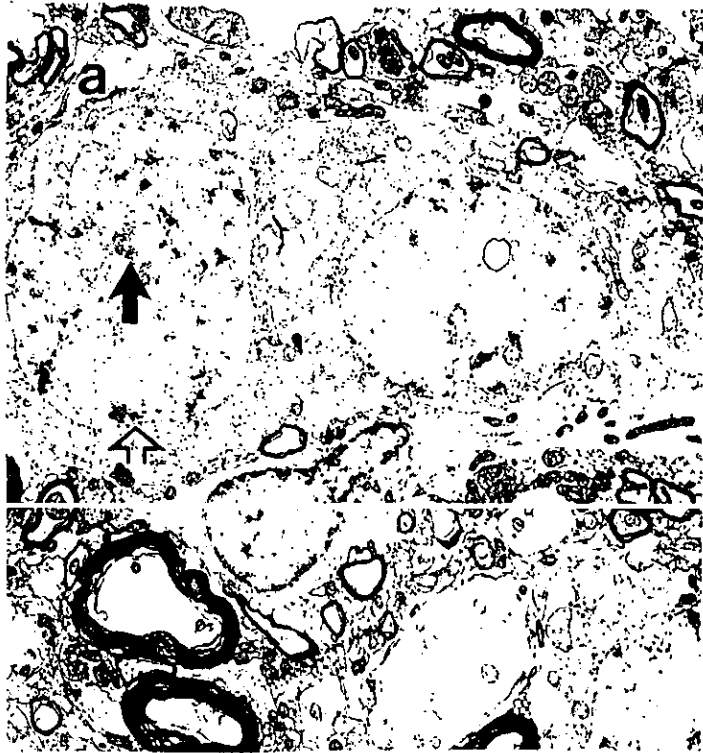


Figura 5. Efecto de carbacol sobre la cromatina nuclear y aparato de Golgi. Micrografías (a y b) controles, (c, d, y e) tratadas con carbacol. En las micrografías (c, d, y e), se muestra un alineamiento de gránulos ribonucleoprotéicos en forma de puntos a lo largo y al centro del núcleo (flechas gruesas). Se señala la presencia de vacuolas vacías en (d y e) (flechas delgadas), mostrando también la elaboración de éstas en el aparato de Golgi recuadros (c y e). También se muestra en la micrografía (c), ondulaciones en la membrana nuclear, con respecto a las muestras control (flecha abierta). La presencia de lisosomas en mayor cantidad y tamaño (d) (flechas curvas). (N) núcleo, (n) nucleolo, (Li) lisosomas y (Va) vacuolas. Escala de la barra 1.7 tanto en (b) como en (e) 1.7 μm . X 4400.



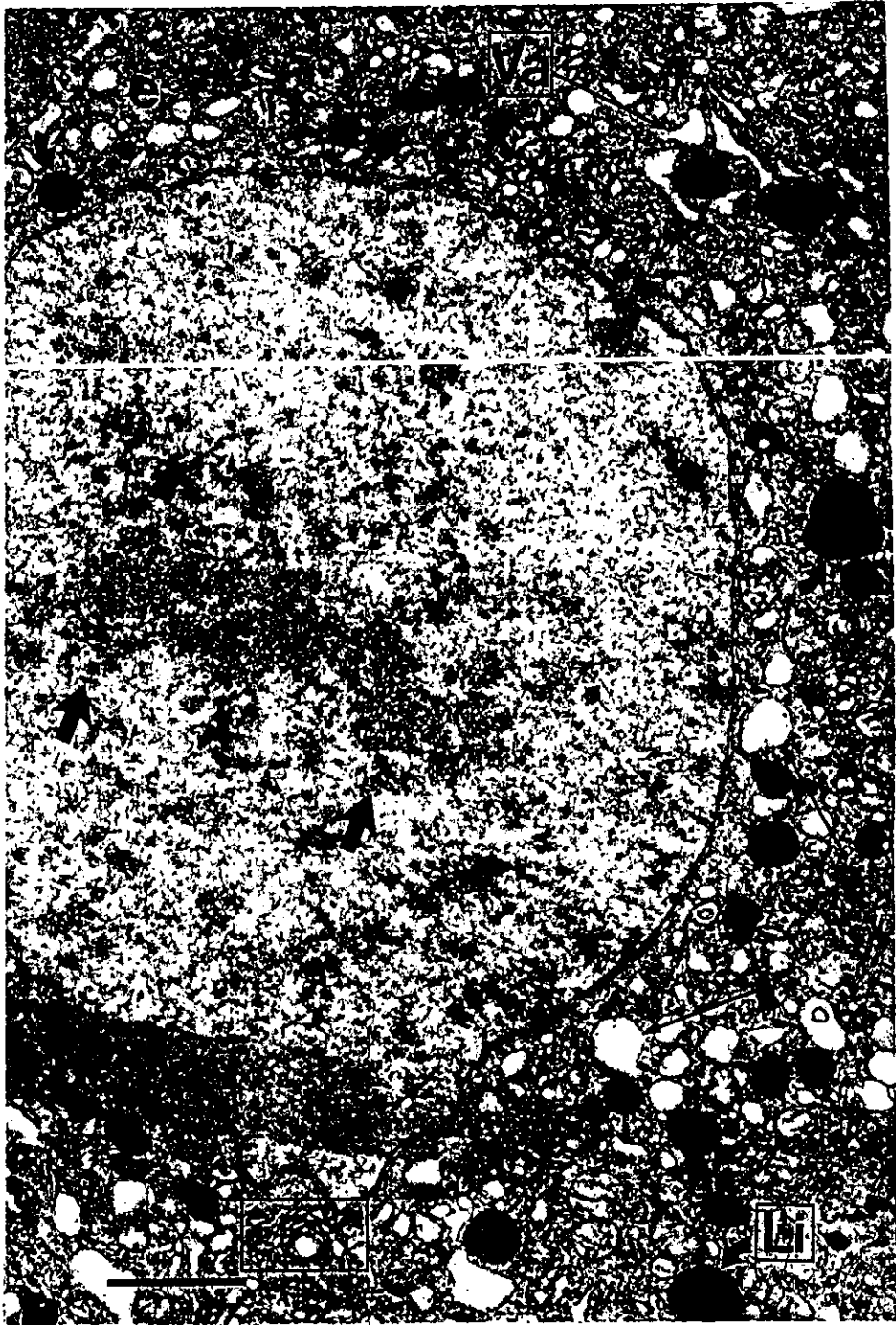


Figura 6. Efecto de carbacol sobre la cantidad de vesículas de corazón denso y posición del nucleolo. Las micrografías (a, b y e) son muestras control y las (c, d y f) con carbacol. En la micrografía (c) se puede apreciar la cantidad de lisosomas y las diversas formas que presentan éstos con respecto al control (flechas curvas y claras). En (d) se muestra como predominan las vesículas de centro denso rodeando a la célula (flechas delgadas), la posición del nucleolo hacia una de la orillas del núcleo (flecha clara). En (f) se puede observar el efecto de daño celular como la agrupación de puntos electrodensos (flecha triangular clara), también la presencia de espacios vacíos (flechas cortas y oscuras). (N) núcleo, (n) Nucleolo. Escala de la barra 1.1µm. X 7000.

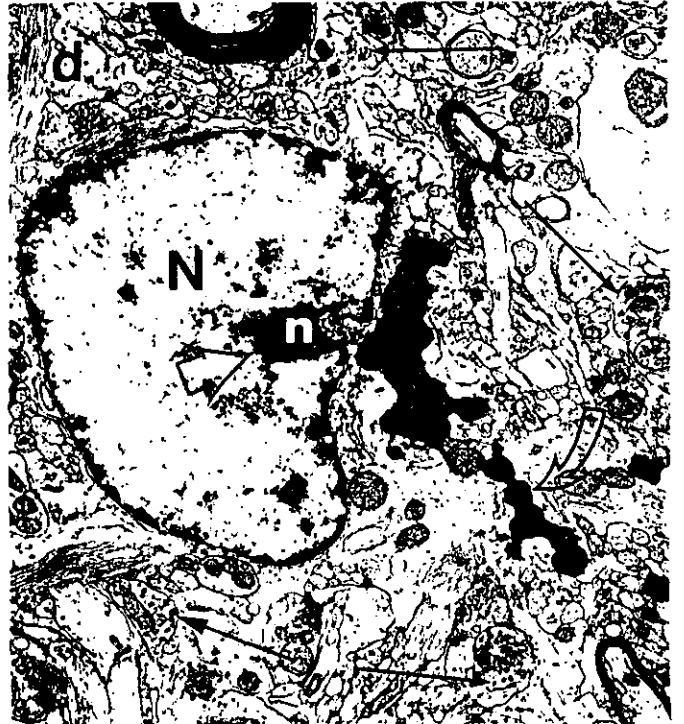
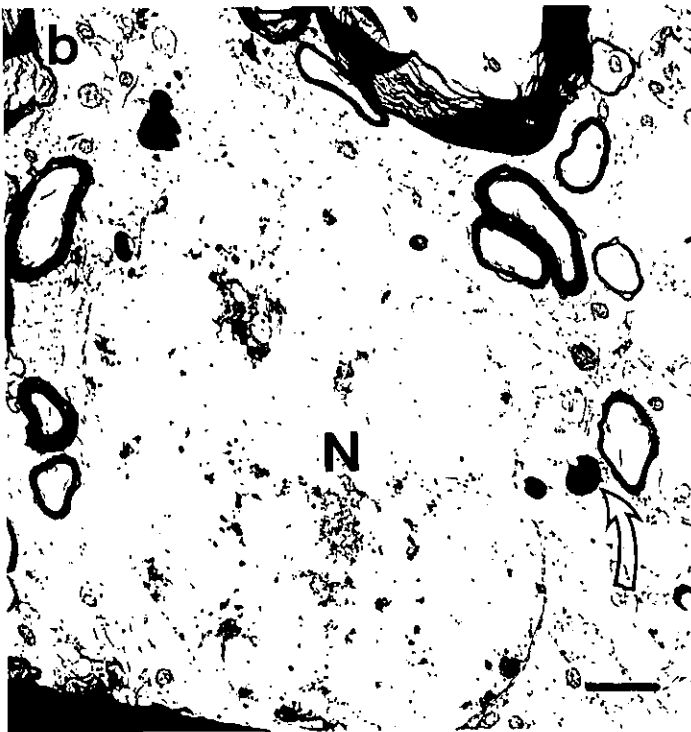




Figura 6'. Efecto del carbacol sobre dendritas. (a) control, (b y c) muestras tratadas con carbacol. En las micrografías b y c se puede apreciar como se incrementa el tamaño de las dendritas comparándolas con las de la muestra control (a) (flechas oscuras). Escala de la barra 1.1 μm . X7,000.

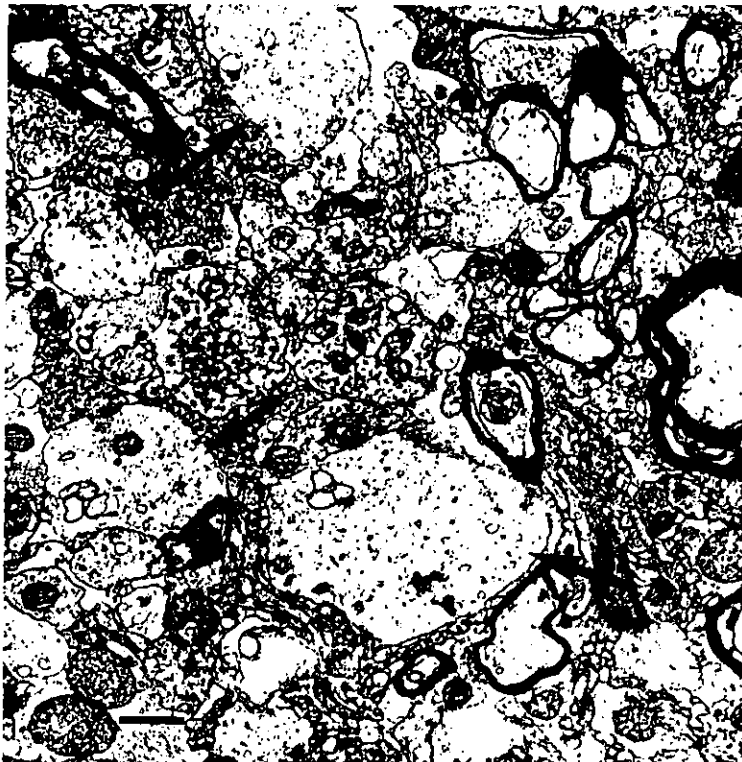
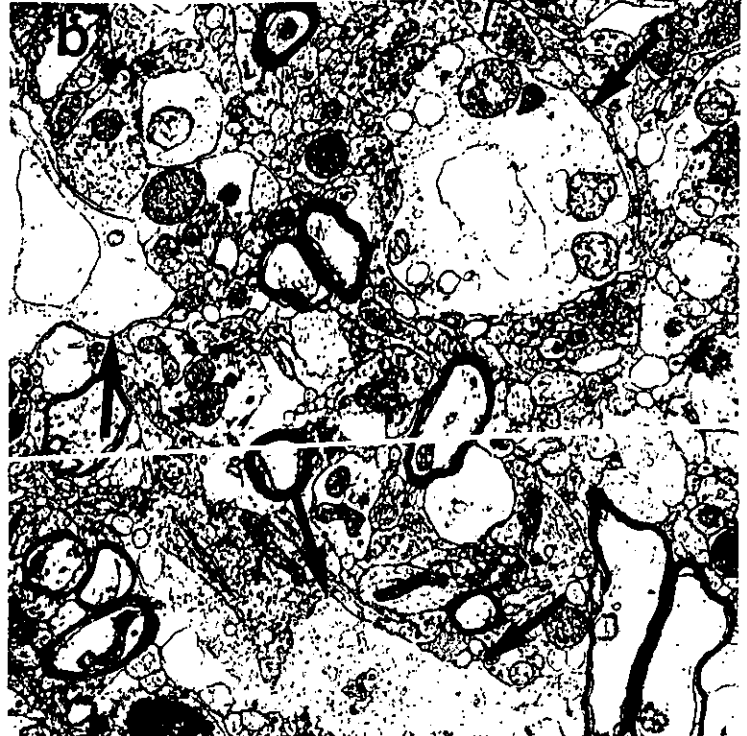
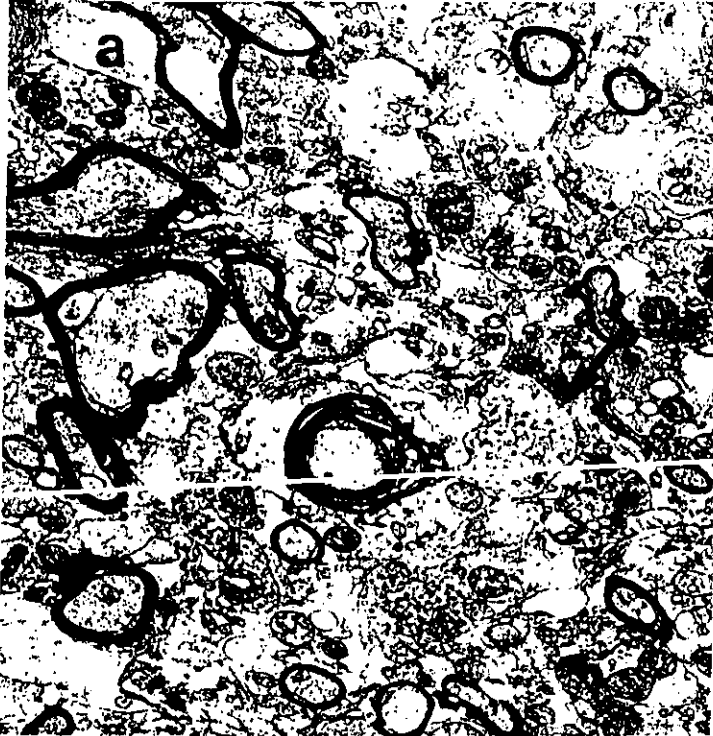


Figura 7. Micrografías electrónicas mostrando daño celular por carbacol en terminales sinápticas (d y f) (flechas grandes y oscuras), mitocondrias (c, d, f, g y h) (flechas medianas y oscuras), y citoplasma celular (c) (flechas pequeñas y oscuras); con respecto a las muestras control (a, b y e). Las muestras (c, d y h) presentan filamentos fibrosos y aumento en el tamaño de las mitocondrias, desvanecimiento de la membrana nuclear y mitocondrial (d y g) (flechas claras), al ser comparadas con las muestras control (a, b y e). Las micrografías electrónicas (f y h) con carbacol, muestran la generación de vesículas de centro denso en la mayor proporción que en las controles; observándose nuevamente en la micrografía (h), la presencia de ondulaciones en la membrana nuclear. (N) núcleo, (ts) terminal sináptica. Escala de la barra 0.6 μm . X 12,000.

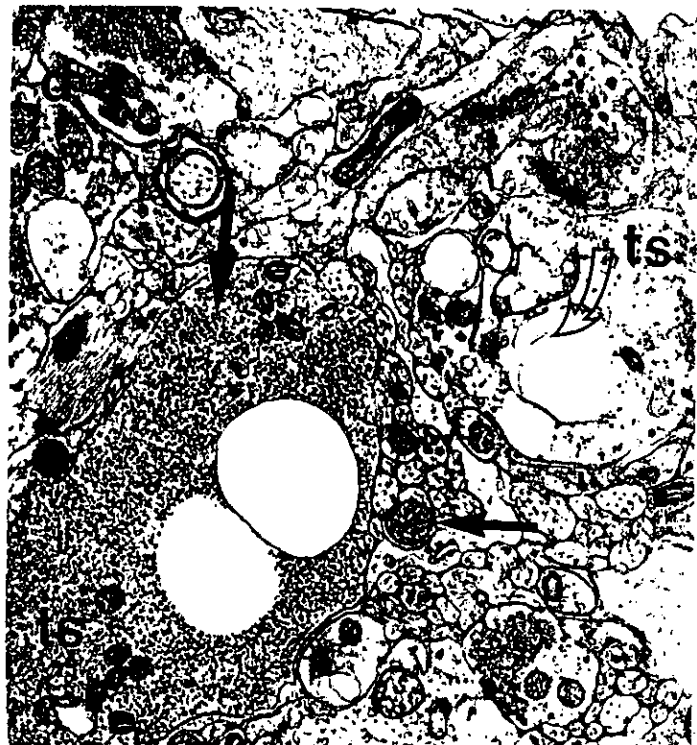
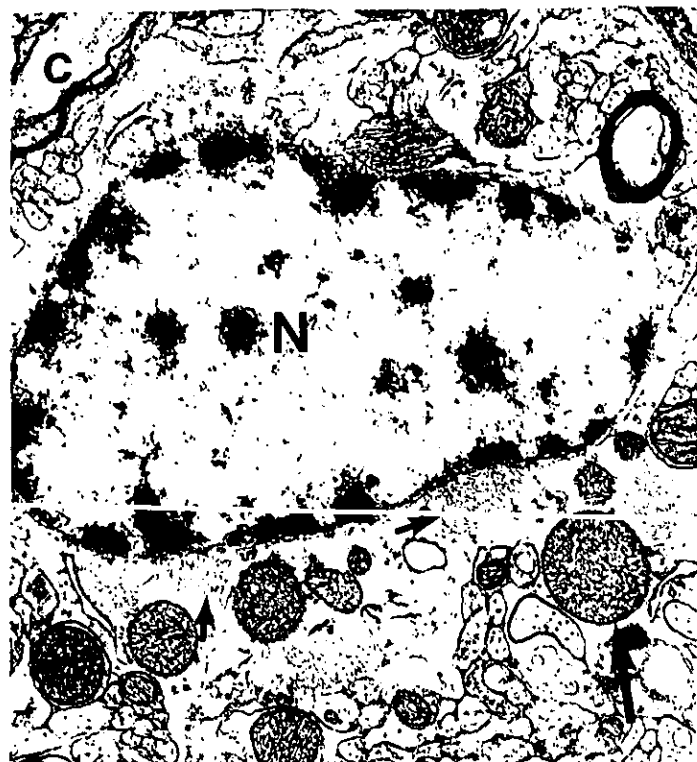
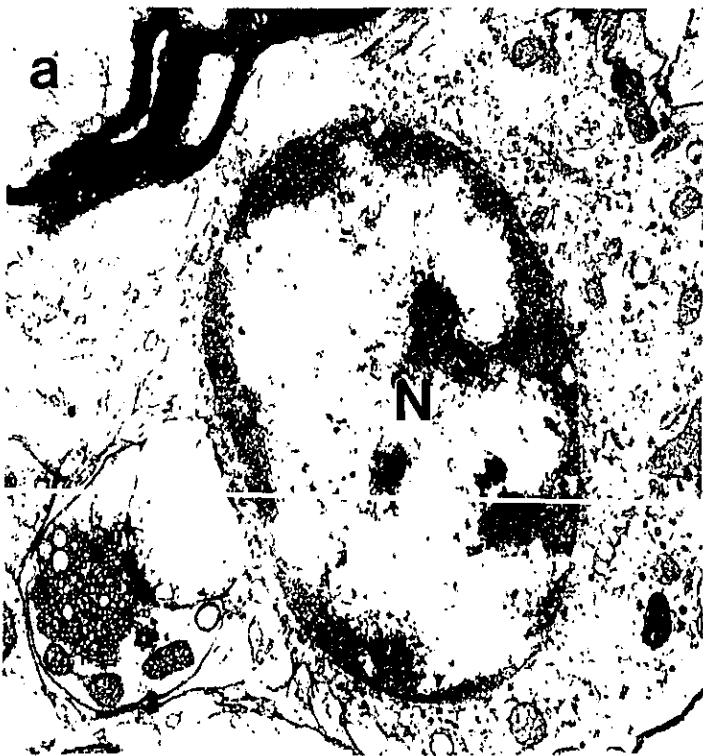




Figura 8. Efecto del carbacol sobre el tamaño de algunas terminales sinápticas. En las micrografías (c y d) con carbacol, se muestra un incremento en el área del botón terminal, observándose también el gran tamaño de las mitocondrias al ser comparadas con los controles (a y b). Escala de la barra 0.4 μm . X 20,000.



Figura 9. Efecto del carbacol sobre membranas y presencia de terminales con vesículas claras. En las micrografías electrónicas (c y g) con carbacol, se muestra como el desvanecimiento en las membranas crea confusión sobre la delimitación compartamental entre los diferentes organelos y fibras dendríticas (flechas pequeñas y oscuras), mostrando también en (c), una mitocondria electrodensa producto de degeneración (flecha clara), al compararse con las micrografías (a, b y e) controles.

Las micrografías (c, d, f y g) tratadas con carbacol, muestran la presencia de más terminales con vesículas claras que terminales con vesículas oscuras, además de la generación de una mayor proporción de vesículas de centro denso dentro de las terminales con vesículas claras que las de las muestras control (a, b y e). Por otro lado en la micrografía (g) se muestra la elaboración de vacuolas vacías a partir de la membrana (flechas triangulares y claras) para la aparente formación de vesículas (flechas grandes y oscuras). (m) mitocondria. Escala de la barra 0.4 μm . X 20,000.

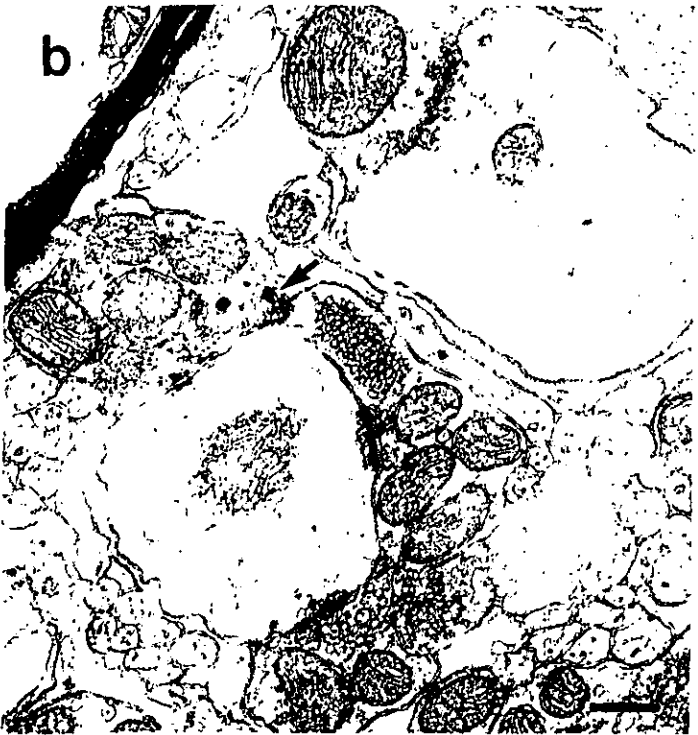
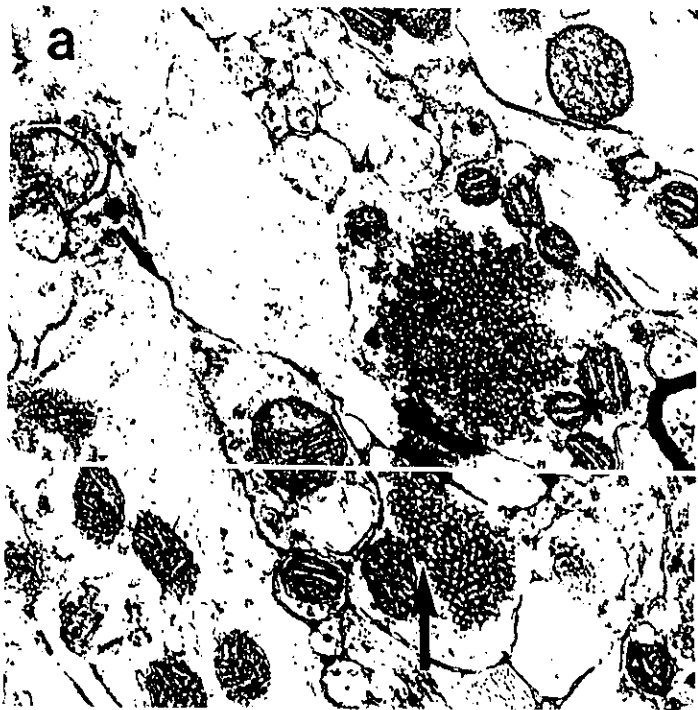
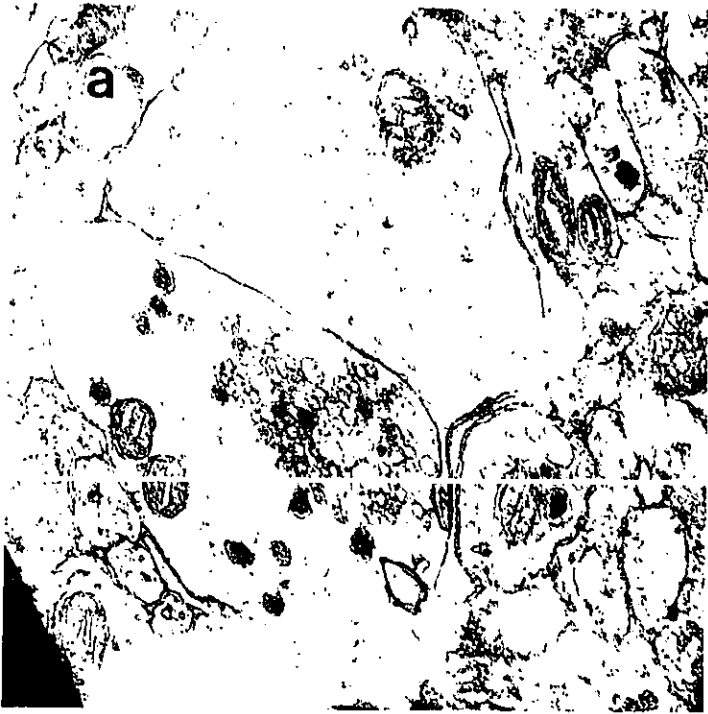




Figura 10. Presencia de cuerpos electrodensos en las muestras tratadas con carbacol. Las micrografías (a y b) son controles. Las micrografías (c y e) son muestras tratadas con carbacol, las cuales muestran la presencia de cuerpos electrodensos en mitocondria y en vesículas de centro denso (flechas grandes y oscuras).

En la micrografía (d) se aprecia el acercamiento de botones sinápticos a una dendrita; observándose que tanto las membranas de las terminales sinápticas como las de la dendrita, presentan ondulaciones que no se observan en la micrografía (b) control. Escala de la barra 0.25 μm . X 30,000.





VII.2 Aspectos Cuantitativos

Se analizaron cuantitativamente las áreas de los núcleos en las células de las muestras tratadas con carbacol y las controles, el número y tamaño de las mitocondrias, número de sinápsis, y número de vesículas de centro denso, presentes en el área PBL del gato. En este análisis se aplicó la prueba estadística t de student, con el fin de poder discernir en base a la comparación de ambos procesos la significancia entre las muestras tratadas con carbacol; respecto a las muestras control y cuyos resultados se presentan a continuación en las gráficas (1-5).

Los resultados del análisis estadístico al comparar el tamaño de los nucleos presentes en las muestras tratadas con respecto a las control, fué significativa; aplicando la prueba t de student para dos muestras. De esta manera se observa un aumento en el tamaño de los nucleos en las muestras tratadas con carbacol en relación con las controles (gráfica 1).

Se analizó también el número de sinapsis, y el resultado de las pruebas estadísticas aplicadas revelan que existe diferencia significativa; lo que quiere decir que en las muestras tratadas con carbacol hay un incremento en el número de sinapsis con respecto a las muestras control (gráfica 2).

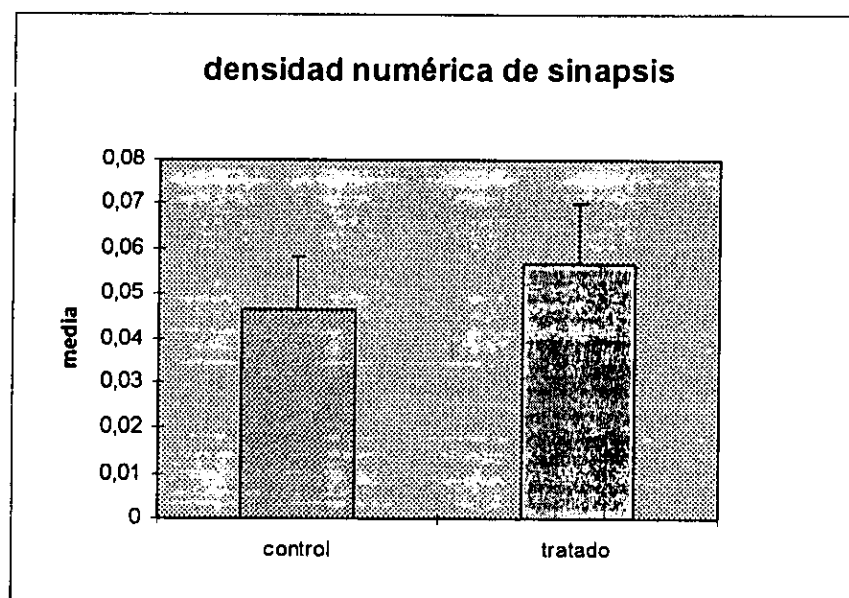
Otra de las cuantificaciones realizadas fué el número de mitocondrias, las cuales al graficarse, nos sugiere un incremento de éstas en las muestras tratadas con carbacol, resultando una de las observaciones con diferencia significativa, como se puede observar (gráfica 3).

Por consiguiente se analizó el tamaño de las mitocondrias en ambos eventos, obteniéndose, que las muestras con carbacol presentan un incremento con respecto a las muestras control, como se aprecia en la (gráfica 4), y cuya diferencia es la más significativa de todas las observaciones.

Uno de los fenómenos más sobresalientes de las observaciones cualitativas fué la presencia de vesículas de centro denso, y cuya cuantificación se realizó para definir la proporción de éstas en las muestras tratadas y controles; obteniéndose del análisis estadístico cuantitativo que no existe diferencia significativa en el número de estas vesículas de centro denso como se puede observar en la (gráfica 5).

análisis de la densidad numérica de sinapsis

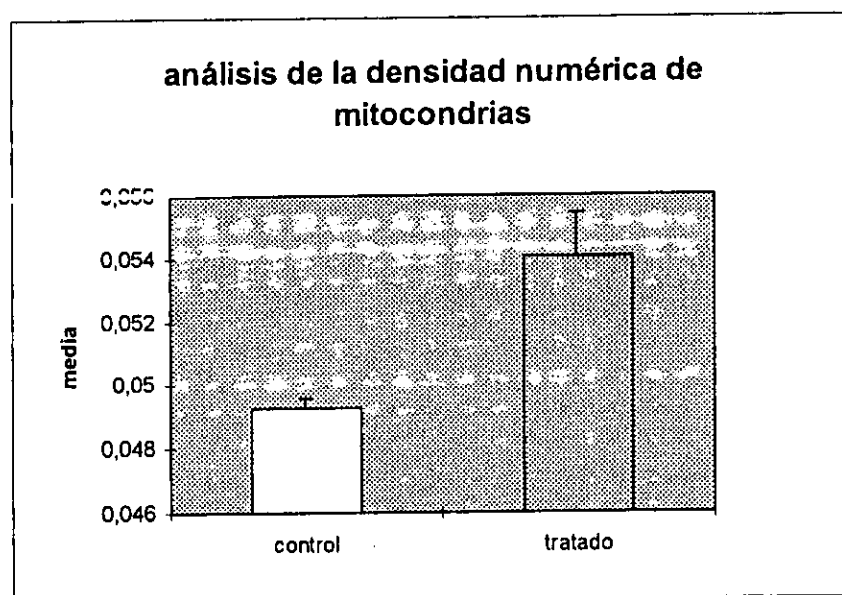
	X	D.S.	N	t	Nivel de sig	$A\phi=(Dif=\phi)$
Control	0.046646	0.0112596	36			
				-2.7434	0.0084703	se rechaza
Tratado	0.056708	0.0134724	15			



Gráfica 2. Efecto del carbacol sobre el número de sinapsis en el área PBL del gato. En este gráfico se muestra el incremento en el número de sinapsis de las muestras tratadas con carbacol.

Análisis de la densidad numérica de mitocondrias

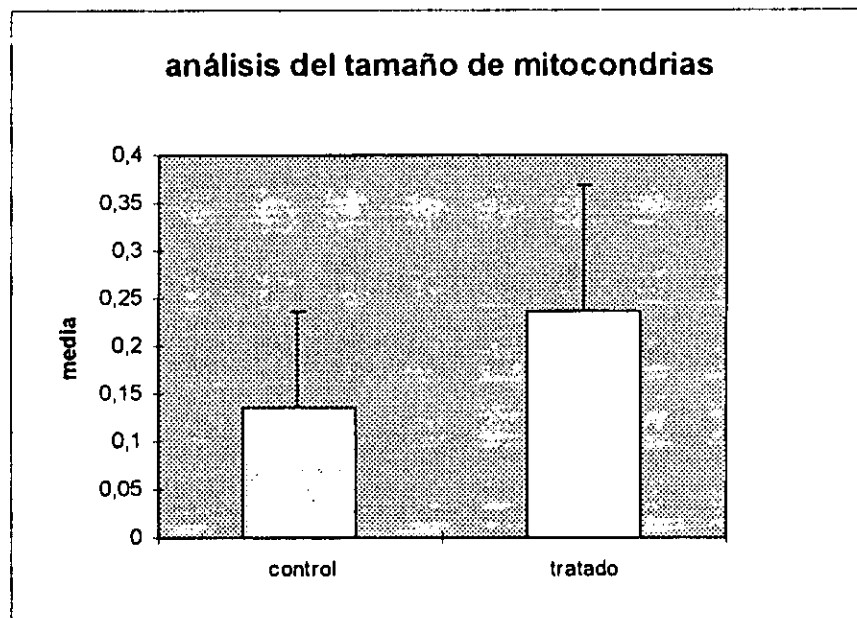
	X	D.S.	N	t	Nivel de sign	$A\phi=(Dif=\phi)$
Control	0.049242	0.00036333	31			
				-17.728	0	Rechazada
Tratado	0.054037	0.0014195	13			



Gráfica 3. Efecto del carbacol sobre el número de mitocondrias en el área PBL del gato. En este gráfico se muestra un incremento significativo del número de mitocondrias en las muestras tratadas con carbacol.

Análisis del tamaño de mitocondrias

	X	D.S.	N	t	Nivel de sig	A Φ =(Dif= Φ)
Control	0.13627	0.0997414	86			
				-5.4018	2.35031E-7	rechazada
Tratado	0.23578	0.133918	76			



Gráfica 4. Efecto del carbacol sobre el tamaño de mitocondrias en el área PBL del gato. En este gráfico se ilustra la significativa diferencia de tamaño en las mitocondrias de las muestras que fueron tratadas con carbacol, respecto a las muestras control.

VIII. DISCUSIÓN

Del análisis realizado por microscopía electrónica al área PBL del gato, se obtienen resultados completamente diferentes entre las muestras control y las tratadas con carbacol, considerándose estos resultados como un efecto del carbacol aplicado en amígdala y de forma indirecta sobre el área PBL, y descartando que las condiciones de preparación y procesamiento de las muestras hayan tenido influencia sobre estos resultados, ya que siempre se conservaron las mismas condiciones tanto de manejo como de preparación de soluciones durante su proceso.

Una precaución fue, la obtención del área PBL que se realizó con la ayuda de un vibratomo; efectuando cortes continuos hasta llegar al nivel donde se localiza esta área. Se realizaron rebanadas de 500 a 1000 μ de espesor conteniendo el área PBL, y de ahí se seccionaron los fragmentos del área, que sería siempre homogénea y semejante como se mostró en las fotografías de la figura 3d. También se consideraron las características de fijación del tejido, dureza de la resina, características generales, como son: homogeneidad del colorante en los cortes semifinos cuando fueron teñidos, condiciones generales de las mitocondrias, estado general de las células observadas tanto estructural como morfológico; no encontrando alteraciones significativas que pudieran ser atribuibles a los procedimientos de fijación y procesamiento del tejido; por lo que podemos decir: que los cambios observados mediante la comparación de las muestras control y las muestras en las que se aplicó carbacol, se deben a la influencia de éste.

Por otro lado con base a los objetivos planeados, se realizó la observación, identificación y clasificación de los cambios para su análisis, donde se hace una separación de las observaciones cualitativas, tanto morfológicas como estructurales, y cuantitativas en aquellos organelos o estructuras predominantes, cuyas características nos permitieran evaluar estadísticamente la existencia de alguna diferencia significativa entre las áreas control con respecto a las tratadas y de ésta forma definir, las áreas estructuras u organelos donde el efecto de carbacol presentó la mayor influencia.

De todo lo anterior obtenemos que en las muestras tratadas con carbacol se observan cambios como; el aumento en el tamaño de mitocondrias, lisosomas, dendritas y terminales sinápticas. La presencia de vacuolas vacías formadas por el aparato de Golgi y que se presentan distribuidas dentro del citoplasma celular, el efecto del desvanecimiento en las membranas y observaciones

sobre la acción del carbacol a nivel de áreas presinápticas, no apreciándose efecto alguno en las áreas postsinápticas.

En cuanto al aspecto cuantitativo, se aprecia la formación de terminales con vesículas claras, sin observarse incremento significativo en el número de vesículas de centro denso, pero sí, un incremento significativo en el tamaño de los núcleos, número de mitocondrias, tamaño de mitocondrias y número de sinapsis, de acuerdo con las pruebas estadísticas aplicadas e ilustradas en las gráficas. Cabe aclarar que éstos resultados se observan también en el área amigdalina, donde se aplicó el carbacol.

Para explicar los resultados obtenidos haremos alusión en algunas ocasiones a la acetilcolina, ya que el carbacol es uno de los más fuertes agonistas de esta sustancia. Esto es, posee características de acción similar a las de acetilcolina.

Se sabe que la acetilcolina se elabora a partir de colina, cuyo origen en general es la dieta, y de la acetilcoenzima A, que proviene de la glucosa a través de varios pasos metabólicos que ocurren en las mitocondrias.

Se ha relacionado a la acetilcolina con funciones amnésicas (ligadas a la memoria), así como en la transmisión del dolor, el calor y los sabores. También en la regulación de los movimientos voluntarios y el control del ciclo sueño-vigilia (Brailowsky Simón). (De la fuente R., Alvares L. F.J. 1997), (Janowsky David S., and David H. Overstreet, 1995).

En las micrografías electrónicas correspondientes a las muestras tratadas con carbacol; podemos apreciar que existen diferencias morfológicas que sugieren, que el carbacol induce cambios a diferentes niveles dentro de la célula y en consecuencia provoca también modificaciones fisiológicas que repercuten en áreas cuyas conexiones están relacionadas con mecanismos de tipo colinérgico; pues si bien se sabe que el carbacol actúa sobre receptores tipo muscarínico y nicotínico presentes en membrana celular (Westfall, Thomas C., 1976; Bevan, 1976; Fiszman, M L., Barker J.L., 1991; Frederick J. Ehlert, William R. 1995 (Chapter 10), Janowsky David S 1995), también se observan características similares entre las células estudiadas tanto en controles como tratadas con carbacol y las células de tipo colinérgico, pues según (Honda T., 1995), sus características morfológicas y generales son: un tamaño mayor que las demás células, la presencia de invaginaciones en el núcleo, su similaridad en la forma y recepción de una gran cantidad de contactos sinápticos que en las células no colinérgicas; lo que sugiere,

que el efecto del carbacol se está dando en este tipo de células del área PBL

Una modificación realizada en este trabajo; fue la aplicación tópica de carbacol sobre AMG y no en el área PBL como inicialmente se había planeado, por lo que los resultados obtenidos, no son debidos a la aplicación directa de carbacol sobre el area PBL, pero muestra el efecto indirecto de éste sobre el área PBL, ya que se sabe de conexiones de fibras aferentes y eferentes que existen entre AMG y los núcleos de esta área (Calvo J. M. (Salud mental Vol 3, Sept., 1996 pp 60)); (Simón, A. K., (spl. 1 de la Revista Salud Mental, Abril 1997)). Esto se explica tomando en consideración que la AMG en su núcleo central (NC) recibe fibras de tipo colinérgico de los generadores pontinos de los potenciales PGO (PBL, LDT,PPT); lo que sugiere que la activación de las células colinérgicas del (NC) amigdalino mediante la aplicación de carbacol, provoca también, la activación de la región PBL, donde se generan los potenciales PGO y los impulsos colinérgicos hacia la región laterodorsal del segmento pontino; apoyando de esta manera la existencia de la comunicación entre éstas dos áreas.

El carbacol es una sustancia que pertenece a los ésteres de colina y cuya acción se ha visto principalmente sobre receptores muscarínicos y nicotínicos (cuadro 1),(Watanhabe, M. August, Bertram., Katzung, G., 1994), que activan a su vez por medio de proteínas G la hidrólisis de fosfoinosítidos, tales como el PIP (fosfatidil inositol-fosfato) y el PIP₂ (fosfatidilinositol-bifosfato) que se cree están localizados esencialmente en la cara interna de la membrana plasmática, y considerados como los más importantes en la transducción de la señal y que a su vez activa a la fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos, la que degrada el (PIP₂) para producir finalmente dos segundos mensajeros de importancia , como son; el diacilglicerol que activa a su vez la proteína cinasa C y el Inositol 1, 4, 5-trifosfato (InsP₃), del cual se ha visto su efecto sobre la liberación de Ca²⁺ interno [Ca²⁺]_i; (Bruce Alberts- Dennis Bray - Julian Lewis, 1994) (Dauphin Francois, Donald G. Linville, 1994).

Se ha encontrado que la familia de las proteínas cinasas C (PKC) son un grupo de enzimas relacionadas íntima y altamente concentradas en el Sistema Nervioso Central (SNC).

También se ha visto que a la activación de la PKC en el Sistema Nervioso se le ha implicado en la regulación de la liberación de neurotransmisores, canales iónicos, crecimiento y diferenciación, además de plasticidad neural. Se ha sugerido que un incremento en la conc. intracelular de Ca²⁺, dispara la asociación de un grupo de isoenzimas PKC con la membrana donde el diacilglicerol

(DAG) interactúa con PKC para estimular la actividad enzimática.

Dentro de las funciones atribuibles a esas enzimas están; la fosforilación de proteínas celulares (Huang Kuo-Ping, 1989).

Por otro lado, se han identificado al menos 7 subespecies de PKC. La distribución en el tejido de las subespecies β_1 y β_{II} muestran que hay mucho más β_{II} que β_1 en el cerebro y en muchos otros tejidos a través del análisis citoquímico con anticuerpos policlonales. También mediante microscopía electrónica de inmunolocalización se ha demostrado que en algunas células la subespecie β_{II} está asociada con membrana de Golgi ((Tanaka, C., et al., observación no publicada) Yasutomi Nishizuka, 1988), (Tanaka, C., et al., 1992).

Esto puede explicar en nuestros resultados el efecto de la formación de vacuolas por el Golgi, sugiriendo que la activación de la PKC a éstos niveles puede estar induciendo la liberación de neurotransmisores y la fosforilación proteica, además del desencadenamiento de los fenómenos anteriormente descritos. Por la otra parte la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ se ha visto que provoca la liberación exocítica de neurotransmisores (Kennedy, B. Mary, 1989), (Feig, Sherry and Lipton, Peter 1993).

En adición, una forma reconocida de la facilitación en la transmisión sináptica puede involucrar un mecanismo Ca^{2+} -dependiente para la regulación del número de vesículas sinápticas, que se fusiona con la membrana postsináptica durante cada impulso eléctrico en la terminal. Diferentes canales iónicos que ayudan para formar la frecuencia y duración de respuestas eléctricas en neuronas, están directamente reguladas por Ca^{2+} o indirectamente por proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} o fosfatasa, lo que puede explicar en nuestros resultados la formación de vesículas claras y de centro denso, las cuales se encuentran incrementadas posiblemente por la excesiva estimulación colinérgica; pues las vesículas claras han sido relacionadas como vesículas que contienen acetilcolina y las vesículas de centro denso como las que contienen catecolaminas y en específico noradrenalina (Isozumi, Kazuo., Fukuuchi, Yasuo., Koto, Atsuo., Suzuki, Norihiro., Izumi, Yoshio and Tsuzuki, Yoko 1991). Se ha observado que los cambios transitorios en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$; pueden disparar la transcripción de genes tempranos tales como el c-fos y el c-jun en el núcleo neuronal (Morgan y Curran, 1986; Greenberg, M. E., 1986; Ding, W. Q., et al., 1998). Estos genes codifican proteínas enlazadas al DNA, que se piensa inician o modulan la expresión de otros genes, posiblemente enfocados a cambios a largo plazo en funciones

neuronales especializadas (Kennedy, B. Mary., 1989). Esto explicaría posiblemente el movimiento observado de la cromatina hacia las orillas del núcleo celular de las muestras tratadas con carbacol.

En neuronas hay dos principales disparadores de Ca^{2+} en membrana y tres en citosol. En membrana; canales de potasio, canales selectivos a cationes y canales de cloro están directamente regulados por Ca^{2+} (Marty, A., 1989). Adicionalmente dos familias de fosfolipasas son activadas por un incremento de $[Ca^{2+}]_i$; fosfolipasa C, la cual hidroliza fosfatidilinositol fosfatos (PIPs) y fosfolipasa A_2 , (segundos mensajeros), que se une a ácidos grasos, incluyendo ácido araquidónico de los glicerolipidos de la espina dorsal. El tercer principal disparador citosólico incluye la protein cinasa C, calpain (una proteasa Ca^{2+} -dependiente) y calmodulina (CaM).

Una de estas proteínas la llamada cinasa CaM tipo II (o CaM cinasa II), es la protein cinasa dependiente de Ca^{2+} , predominante en neuronas de la corteza e hipocampo del cerebro de mamíferos. La cinasa CaM tipo II está presente en todo el citosol, en los cuerpos celulares, dendritas, axones y terminales, pero parece estar concentrada especialmente en densidades postsinápticas. Esto comprende del 25 al 40% de la proteína total aislada en las fracciones de la densidad postsináptica.

Adicionalmente y para explicar el porqué de la inclinación hacia la hidrólisis de fosfoinositidos y no a la activación de la adenilato ciclasa en la generación de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) como segundo mensajero; se ha visto que mediante la localización autorradiográfica de los receptores muscarínicos M1 y M2 en el cerebro, la región PBL muestra estar libre de receptores muscarínicos M1 y contiene receptores muscarínicos M2 (Mash y Potter, 1986; Spencer et al., 1986). Por otro lado una diferencia entre los receptores M1, M3 y M5 de los receptores M2 y M4 es; que la inhibición en la actividad de la adenilato ciclasa mediada por receptores M2 y M4 es prácticamente más sensible que la hidrólisis de fosfoinositidos por M1, M3 y M5. Esto es la potencia de agonistas tales como el carbacol para inhibir la actividad de la adenilato ciclasa es usualmente mucho mayor que su respectiva potencia para estimular la hidrólisis de fosfoinositidos (Ehlert, J. Frederick., Roeske, R. William and Yamamura, I. Henry., Capitulo 10, 1995).

De todo lo anterior, podemos decir que los cambios inducidos por la aplicación de carbacol en AMG y su efecto sobre el area PBL, tienen una serie de implicaciones fisiológicas a nivel celular

que se reflejan en las micrografías electrónicas mostradas; por lo que se puede explicar así los cambios encontrados en organelos, como el hinchamiento de mitocondrias, sugiriendo un efecto que modifica la osmolaridad celular por la apertura de canales dependientes de Ca^{2+} como los canales de K^+ o de Cl^- , la formación de vesículas tanto claras como de centro denso, la ramificación de espinas dendríticas y el engrosamiento de algunas de éstas, la presencia de vacuolas vacías formadas por el aparato de Golgi, que sugieren la inducción de estos fenómenos por la activación de PKC y todas sus implicaciones. Sin embargo existen también cambios que sugieren daño celular, como son: cromatólisis, aparición de gránulos electrodensos, aparición de filamentos en los alrededores de algunas células, y partículas que se sugieren como gránulos de glucógeno (Peters A., Palay L 1991). Esto muestra que además de los cambios fisiológicos propuestos, existe un daño a nivel celular afectándose posiblemente vías de contacto sináptico o células que han sido activadas fuertemente sufriendo algún trastorno en su metabolismo, lo que ocasiona la degeneración de sus organelos y estructuras afectándose por consiguiente su función.

Por otra parte se ha observado que la aplicación de una sola microinyección de carbacol en el área PBL provoca un aumento de los potenciales Ponto Genículo Occipitales (PGO) y por consecuencia un incremento del sueño REM ((I) Datta S., J. M. Calvo, J. Quattrochi and S. Hobson, 1992), ((II) Calvo J. M., S. Datta, J. Quattrochi and Hobson, 1992). Para explicar este efecto tan prolongado del carbacol sobre el área PBL, recordaremos algunas líneas en la introducción de este trabajo donde se menciona la interacción de tipo molecular sugerida para la acetilcolina y la distribución de sus grupos funcionales electrofílicos o nucleofílicos en la molécula para unirse al receptor muscarínico. Recordando así que los grupos importantes para la actividad muscarínica son la cabeza catiónica, el oxígeno etéreo y el grupo metilo terminal; los grupos importantes para la actividad nicotínica son la cabeza catiónica y el átomo de oxígeno del carbonilo.

Del análisis de la molécula de acetilcolina podemos apreciar entonces la importancia de los grupos funcionales que sugieren su actividad sobre los receptores a los cuales se une. El carbacol es un agonista de la acetilcolina cuya molécula muy similar difiere únicamente por su enlace terminal- NH_2 , presentando efectos fisiológicos similares a los de acetilcolina, pero siendo posiblemente este enlace una razón de la pequeña inclinación del carbacol hacia receptores

nicotínicos (cuadro 1). Adicionalmente otra gran diferencia entre la acetilcolina y el carbacol es que el componente ácido es carbámico en vez de acético y el enlace del éster carbámico no es fácilmente susceptible a la hidrólisis por acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa como se muestra en el cuadro 2 (Reece, J. Laura and Shwartzkroin, A. Philip., 1991; Westfall C. Thomas., 1976).

De esta manera se puede explicar por lo tanto la prolongada duración del efecto del carbacol en el gato, ya que además de ser difícilmente hidrolizado, sus escasas características de solubilidad en lípidos; lo hacen una sustancia difícil de absorber por los tejidos, lo que sugiere una amplia permanencia en las áreas de aplicación.

Se ha propuesto también la participación de péptidos derivados de la hormona proopiomeianocortina (POMC), que son sintetizados principalmente en el hipotálamo y la hipófisis, en los mecanismos de instalación y mantenimiento del sueño MOR.

El hipotálamo a pesar de su pequeño tamaño (como el de un frijol), regula y controla funciones tan importantes como las de frecuencia cardíaca, el paso de la comida a través del estómago e intestino, además de recibir información de estas áreas. El hipotálamo es también el encargado de regular uno de los más importantes órganos endocrinos: la hipófisis. El hipotálamo elabora sustancias que estimulan o inhiben las células de la hipófisis, para que estas liberen hormonas, las cuales actúan, al verse en la sangre, y en las glándulas endocrinas de la periferia. El hipotálamo contiene también los centros del hambre y de la sed.

El hipotálamo recibe un rico suplemento de sangre, de manera que cuando un fármaco llega a sangre, esta región puede recibir rápidamente una alta concentración del mismo.

Se ha observado que los péptidos derivados de la (POMC) y a su vez de la (ACTH); como son el desacetil alfa-estimulante del melanocito (des- α -MSH) conocido como (ACTH 1-13) y el péptido corticotrófico del lóbulo intermedio de la hipófisis (CLIP) conocido como (ACTH 18-39), provocan un incremento en el SOL y en el REM. Se sabe que éstos péptidos poseen propiedades hipnógenas y se ha visto que sus efectos son mucho mejores durante el período de oscuridad (Chastrette, N., Cespluglio, R. and Jouvét, M. 1990).

Otro péptido de gran importancia en el péptido intestinal vasoactivo (VIP) cuya distribución cerebral implica al núcleo supraquiasmático, al tallo cerebral y en la terminación colinérgica existiendo como un neuropéptido cotransmisor, cuya importancia funcional es la regulación de la biosíntesis de acetilcolina y modula la transmisión colinérgica, aumentando la afinidad de los

receptores muscarínicos para la acetilcolina (Ach) (García de Jalón P. D., Serrano J. S., Capítulo 11, 1989).

Por todas éstas razones se podría explicar el papel de los péptidos y su influencia sobre el incremento del SOL y del REM, desde el punto de vista hormonal y su relación con estructuras de tipo colinérgico. Lo que sugiere que el carbacol también puede inducir estos efectos provocando concomitantemente con la participación de las diferentes estructuras relacionadas a los mecanismos de sueño-vigilia; cambios a largo plazo desde el punto de vista fisiológico (con cambios en su morfología), y desde el punto de vista hormonal. Lo que sugiere que el carbacol siendo un agonista de la acetilcolina, es capaz de inducir cambios morfológicos en áreas de tipo colinérgico, implicadas en el establecimiento y mantenimiento del sueño REM.

Si bien el área PBL después de la identificación autorradiográfica de receptores muscarínicos mostró estar libre de receptores M1 y contener receptores M2, y que éste tipo de receptores están localizados en áreas como corazón, músculo liso y ciertas áreas del cerebro; como el área PBL (Ehlert, J. Frederick., 1995); también tenemos que mencionar que a los receptores M1 y M3 presentes en las arterias y vasos sanguíneos; se les ha asociado con la constricción y dilatación de arterias y vasos sanguíneos cerebrales en el gato (Duaphin Francois, Linville, G. Donald., 1994). Por lo tanto el carbacol al estimular éstos receptores induciría cambios a nivel vascular que pudiesen ser observados. Esto explicaría posiblemente la presencia de terminales con vesículas claras encontradas en los alrededores de algunos vasos sanguíneos en nuestras muestras tratadas con carbacol, aunque no apreciándose una vasodilatación o vasoconstricción de éstos debida a alguna acción de estas terminales. Esto sugiere que el carbacol estimula los receptores muscarínicos independientemente del tipo y el área cerebral donde se está aplicando, produciendo un conjunto de fenómenos que contribuyen al establecimiento y mantenimiento del SOL y del sueño REM en el gato.

De todos estos fenómenos podemos inferir, que el sueño es una etapa durante la cual se sugiere una renovación y/o regeneración de estructuras y mecanismos fisiológicos, que son necesarios en el crecimiento, desgaste celular y consumo de energía en el desempeño diario del organismo, encontrándose implicados mecanismos de tipo colinérgico, que posiblemente estén contribuyendo en la organización y mantenimiento de esta etapa, que de alguna forma es esencial.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y del análisis de éstos. Podemos concluir que la aplicación de carbacol. en el área amigdalina y su efecto indirecto sobre el área PBL del gato, induce cambios morfológicos a nivel celular y estructural manifestándose éstos últimos principalmente en el incremento del número y tamaño de mitocondrias, del tamaño de los núcleos celulares, además de cambios metabólicos; reflejados como el incremento en el número de sinapsis y liberación de neurotransmisores al parecer acetilcolina y noradrenalina mediante la activación de mecanismos coiinérgicos que conjuntamente con la activación de factores hormonales e hipnóticos contribuyen a la instalación y mantenimiento del SOL y REM en el gato.

X. BIBLIOGRAFIA

Amaral, D. G., Price, J. L., Pitkanen, A. and Carmichael, S. T. Anatomical Organization of the Primate Amygdaloid Complex. En J. P. Aggleton (Ed.). *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction* (pp. 1-66). New York: Willey- Liss, Inc., 1992.

Arribas, M., Blasi, J. Lazarovici P., and Marsal, J. Calcium-dependent and independent acetylcholine release from electric organ synaptosomes by pardaxin: Evidence of a biphasic action of an excitatory neurotoxin. *J.Neurochem.*, 60. 552-558, 1993.

Aserinsky, E. y Kleitman, N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science*, 118, 273-274, 1953.

Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res.*, 306: 39-52, 1984.

Berger, H. über das Electroenkephalogram des Menschen. Zweite Mitteilung. *J. Psych. Neurol.*, 40, 160-179, 1930.

Berger, M., Riemann, D., Hochli, D., Spiegel R. The colinergic rapid eye movement sleep induction test with RS-86. *Arch Gen Psychiatry.*, 46:421-428, 1989.

Berman, A.L. *The brain stem of the cat*. University of Wisconsin Press. Madison, Wisconsin., pp. 1-175, 1968.

Berridge, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu.Rev.Biochem.*, 56: 159-193, 1987.

Bevan, A.John., et. al. Fundamentos de Farmacología. Introduction a los principios de acción en los fármacos. Segunda Edición. Editorial Harla. Impreso en México. Págs. 120-122, 1976.

Bizzi, E. y Brooks, D. C. Functional connections between pontine reticular formation and lateral geniculate nucleus during sleep. *Arch. Ital. Biol.*, 101, 666-680, 1963.

Bozzola, J. John., Russell, D. Lonnie., *Electron microscopy*. Edit. Jones and Bartlett

Publishers, Inc., Boston London . Printed in the U.S.A., pp 287-303, 407-494.,1992.

Bremer, F. cerveau "isole" et physiologie du sommeil C.R. Soc. Biol. (Paris), 118 1235-1241, 1935.

Bruce, Alberts., Dennis, Bray., Julian, Lewis., Martín, Raff., Keith, Roberts., James, D. Watson. *Biología Molecular de LA CELULA*. Segunda Edicion.Ediciones Omega, Impreso en Barcelona España. Págs. 744-752, 1994.

Callaway, C.W., Lydic, R., Baghdoyan, H.A. and Hobson, J.A. Pontogeniculooccipital waves: spontaneous visual system activity during rapid eye movement sleep. *Cell.Mol.Neurobiol.*, 7: 105-149, 1987.

Calvo, J. M. La neurobiología del sueño en animales experimentales y en el hombre (Salud Mental Vol. 19, N° 3, pags. 58-65, sept., 1996).

Calvo, J. M., Datta, S., Quattrochi, J. and Hobson, J.A. Cholinergic Microstimulation of the Peribrachial Nucleus in the Cat .2. Delayed and Prolonged Increases in REM Sleep. *Arch.Ital.Biol.*, 130: 285-301, 1992.

Cespuglio, R., Laurent, J.P. and Calvo, J.M. Organisation anatomique des activités phasiques provoquées par la reserpine au niveau du système oculo-moteur. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.*, 40: 12-24, 1976.

Cespuglio, R., Laurent, J.P. and Jouvet, M. Etude des relations entre l'activité ponto-geniculo-occipitale (PGO) et la motricité oculaire chez le chat sous réserpine. *Brain Res.*, 83: 319-335, 1975.

Chastrette, N., Cespuglio, R. and Jouvet, M. Proopiomelanocortin (POMC)-derived peptides and sleep in the rat. Part 1. Hypnogenic properties of ACTH derivatives. *Neuropeptides*, 15: 61-74, 1990.

Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J pharmacol Exp Ther.*, 6:147-190, 1914.

Datta, S., Calvo, J.M., Quattrochi, j. y Hobson, J.A. Long-term enhancement of REM sleep following cholinergic stimulation. *Neuroreport*, 2: 619-622, 1991

Datta, S., Calvo, J.M., Quattrochi, J. and Hobson, J.A. Cholinergic Microstimulation of the Peribrachial Nucleus in the Cat .1. Immediate and Prolonged Increases in Ponto-Geniculate-Occipital Waves. *Arch.Ital.Biol.*, 130: 263-284, 1992.

Datta, S. and Hobson, J.A. Neuronal Activity in the Caudolateral Peribrachial Pons -Relationship to Pgo Waves and Rapid Eye Movements. *J.Neurophysiol.*, 71: 95-109, 1994.

Datta, S., Paré, D., Oakson, G. and Steriade, M. Thalamic-projecting neurons in brainstem cholinergic nuclei increases their firing rates one minute in advance of EEG desynchronization associated with REM sleep. *Soc.Neurosci.Abst.*, 15: 452-45-, 1989.(Abstract)

Datta, S., Quattrochi, J. y Hobson, J. A. Effect of Specific Muscarinic M2-Receptor Antagonist on Carbachol Induced Long-Term REM Sleep. *Sleep.*, 16: 8-14, 1993.

Dauphin, Francois., G., Linville Donald, and Hamel, Edith. Cholinergic Dilatation and Constriction of Feline Cerebral Blood Vessels Are Mediated by Stimulation of Phosphoinositide Metabolism via Two Different Muscarinic Receptor Subtypes. *J. Neurochem.*, Vol 63, No. 2, pp. 544-551, 1994.

David, S. Janowsky., David, H. Overstreet. The role of Acetylcholine Mecanismos in Mood Disorders. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of progress*. Chapter 82. (Floyd E. Bloom,David J. Kupfer). Raven Press, Ltd., New York. 945-956, 1995.

De la Fuente, R., Alvarez, Leefmans F. J. *Biología de la Mente*. Primera Edición. Editorial Colegio Nacional y Fondo de Cultura Económica, México. 105-146, 245-253, 1998.

Dement, W.C. y Kleitman, N. The relation of eye movement during sleep to dream activity. *J. Exp. Psychol.*, 53, 339-346, 1957.

Ding, W. Q., Larsson, C., Alling, C. Stimulation of muscarinic receptors induces expression of individual fos and jun genes through different transduction pathways. *J. Neurochemistry.*, 70:4, 1722-1729, 1998.

Dolabela, A. and Singer, W. The brainstem projection to the lateral geniculate nucleus in the cat: identification of cholinergic monoaminergic elements. *J.Comp.Neurol.*, 259: 92-121, 1987.

Dusan-Peyrethon, J., Peyrethon, J. y Jouvét, M. Etude quantitative des phenomenes phasiques

du sommeil paradoxal pendant et apres sa deprivation instrumentale. *C. R. Soc. Biol.*, 161, 2530-2533, 1967.

Ehlert, J. Frederick, Roeske, R. William and Yamamura, I. Henry., *Molecular Biology, Pharmacology, and Brain Distribution of Subtypes of the Muscarinic Receptor*. En *Psychopharmacology. The Fourth Generation of progress* (Chapter 10), Floyd E. Bloom, David J. Kupfer. Raven Press. New York. 1995.

Feig, Sherry., and Lipton, Peter. Pairing the Cholinergic Agonist Carbachol with Patterned Schaffer Collateral Stimulation Initiates Protein Synthesis in Hippocampal CA1 Pyramidal Cell Dendrites via a Muscarinic, NMDA-Dependent Mechanism. *The Journal of Neuroscience*, 13 (3): 1010-1021, March 1993.

Fizman M. L., Barker J.L. and Jones S.V.P.. Electrophysiological responses to muscarinic receptor stimulation in cultured hippocampal neurons. *Brain Research*, 557, 1-4, 1991.

Foster, M.C., Castiglia, C.M. and Saubermann A.J. Effects of serotonin and carbachol on glial and neuronal rubidium uptake in leech CNS. *Brain Res.*, 597: 181-188, 1992.

García, de Jalon P.D., Serrano, S.J. Fármacos parasimpaticomiméticos. En *Farmacología Velázquez* (Capítulo 11). (Alfonso Velazco Martín, Pedro L. Fdez., José S. Serrano M., Fernando A. T. Décimasexta Edición. Editorial Interamericana-McGraw-Hill. Págs. 168-174, 1989.

Goodman., y Gilman. *Las bases Farmacológicas de la terapeutica*. Novena edición. McGawn-Hill-Interamericana. Impreso en Mexico, 149-154, 1996.

Greenberg, M. E., Ziff, E. B., Greene, L. A. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science.*, 234, 80-83, 1986.

Hartmann, E. The sleep-dream cycle and brain serotonin. *Psychon. Sci.*, 8, 295-296, 1967.

Hendriks, J. C., Morrison, A. R. y Mann G.L. Different behaviors during paradoxical sleep without atonia depend on pontine lesion site. *Brain Res.*, 239, 81-105, 1982.

Henley, K. and Morrison, A. R. Release of organized behavior during desynchronized sleep in cats with pontine lesion. *Psychophysiology*, 6, 245, 1969.

Hernández-Peón, R. and Chávez-Ibarra, G. Sleep induced by localized electrical or chemical stimulation of the forebrain. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.*, 24: 188-198, 1963.

Hess, W. R. Das schafsyndrom als folge dienzephaler reizung. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.*, 2, 305-344, 1944.

Hobson, J. A. The dreaming brain (Boston: Harper-Collins Pub.), 1988.

Hobson, J.A. and Steriade M. The neuronal basis of behavioral state control. In: V. Mountcastle (ed). *Handbook of Physiology*. American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 701-823, 1986.

Hobson, J A. , Datta, S., Calvo, J. M. and Quattrochi, J. Acetylcholine as a Brain State Modulator- Triggering and Long-Term Regulation of REM Sleep. *Cholinergic. Function and Dysfunction*. 98. , 1993.

Honda T. and Semba K.. An ultrastructural study of cholinergic and non-cholinergic neurons in the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei in the rat. *Neuroscience* Vol. 68, No. 3, págs. 837-853, 1995.

Hopkins, D. A. y Holstege, G. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Exp. Brain Res.*, 32, 529-547, 1978.

Houdouin, F., Cespuglio, R. and Jouvet M. Effects Induced by the Electrical Stimulation of the Nucleus Raphe Dorsalis upon Hypothalamic Release of 5- Hydroxyindole Compounds and Sleep Parameters in the Rat. *Brain Res.*, 565: 48-56, 1991.

Huang, K.P. The mechanisms of proteine kinase C activation. *Trends Neurosci.*,12:11: 425-432, 1989.

Isozumi, K., Fukuuchi, Y., Koto, A., Suzuki, N., Izumi, Y. and Tsuzuki, Y. Moderate hypoglycemia induces ultrastructural changes in perivascular nerve terminals of cat cerebral arteries. *Neurosci.Lett.*, 134: 67-70, 1991.

Jeannerod, M. Mouret, J. y Jouvet, M. Effects secondaires de la déafferentation visuelle sur l'activité électrique phasique ponto-geniculo-occipitale du sommeil paradoxal. *J. Pysiol. (Paris)*, 57, 255-256, 1965.

Jeannerod, M. Organization de l'active électrique phasique de sommeil paradoxal (Lyon,

France: These de Medicine, 1965.

Jessel, M. T., Reacciones de las neuronas al daño. En Principles of Neural Sciences. (Chapter 18), (Kandel, R. Eric, Schwann, H. James, Jessel, M. Thomas.), 3ª edition. Center for Neurobiology and Behavior College of Physician and Surgeons of Hughes Medical Institute. Appleton and Lange., Printed in the E.U.A., pp. 259-269, 1991.

Jones, B.E. and Beaudet, A. Distribution of acetylcholine and catecholamine neurons in the cat brainstem: a choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J.Comp.Neurol.*, 261: 15-35, 1987.

Jones, B. E. and Moore, R. Y. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II Autoradiographic study. *Brain Res.*, 127, 23-53, 1977.

Jones, B.E. The Organization of Central Cholinergic Systems and Their Functional Importance in Sleep-Waking States. *Cholinergic.Function.and Dysfunction.98.*, 1993.

Jouvet, M. Neuromédiateurs et facteurs hypnogènes. *Rev.Neurol.*, 140: 389-400, 1984.

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. The role of monoamines and acetylcholine containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. En M. Jouvet y G. Moruzzi (Eds). *Neurophysiology and Neurochemistry of Sleep and Wakefulness. Reviews of Physiology* (pp. 166-307). New York: Heidelberg. 1972.

Jouvet, M and Delmore, J.F. Locus coeruleus et sommeil paradoxal. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 159, 895-899, 1965.

Jouvet, M. and Michel, F. Correlations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique. *C.R.Soc.Biol.(Paris)*, 153: 422-425, 1959.

Kang, Y. and Kitai, S.T. Electrophysiological properties of pedunculopontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Res.*, 535: 79-95, 1990.

Kawai, Y., Inagaki, S., Shiosaka, S., Senba, E., Hara, Y., Sakanaka, M., Takatsuki, K. and Tohyama, M. Long descending projections from amygdaloid somatostatin-containing cells to the

lower brain stem. *Brain Res.*, 239, 603-607, 1982.

Kennedy, B. Mary. Regulation of neuronal function by calcium. *TINS*, Vol. 12 No. 11, pp. 417-424, 1989.

Lee, C., Surtees, R. and Duchen, L.W. Distal motor axonopathy and central nervous system myelin vacuolation caused by cycloleucine, an inhibitor of methionine adenosyltransferase. *Brain*, 115: 935-955, 1992.

Loomis, A., Harvey, E. y Hobart, G. Cerebral states during sleep as studied by human brain potentials. *J. Exp. Psychol.*, 21, 127-144, 1937.

Luebke, J.I., Greene, R.W., Semba, K., McCarley, R.W., Kamondi, A. and Reiner, P.B. Serotonine effects on cholinergic rat laterodorsal tegmental nucleus neurons. *Sleep Res.*, 20: 42-, 1991. (Abstract)

Marty A. The physiological role of calcium-dependent channels. *TINS*, Vol. 12, No. 11, pp. 420-424, 1989.

Mash, D. C. and Potter, L. T. Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 19, 551-564, 1986.

Mc Carley, R. W., Nelson, J: R. y Hobson, J. A.. Ponto-Geniculo-Occipital (PGO) burst neurons: correlative evidence for neuronal generator of PGO waves. *Science*, 201, 269-272, 1978.

Mehler, W. R. Subcortical afferent connections of the amygdala in the monkey. *J. Comp. Neurol.*, 190, 733-762, 1980.

Michel, F., Jeannerod, M., Mouret, J., Rechtschaffen, A. y Jouvet, M. Sur les mecanismes de l'activite de pointes au niveau de systeme visuel au cours de la phase paradoxale du sommeil. *C. R. Soc. Biol.*, 158, 103-106, 1963.

Mikiten, T., Niebyl, P. y Hendley, C. EEG desynchronization during behavioral sleep associated with spike discharges from the thalamus of the cat. *Fed, Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, 20, 327, 1961.

Mitani, A., Ito, K., Hallanger, A.E., Wainer, B.H., Katoaka, K. and McCarley, R.W. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunclopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field. *Brain Res.*, 451: 397-402, 1988.

- Morgan, J. I., and Curran, T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 322, 552-555, 1986.
- Morio, Y. and Yagasaki, O. Effects of AF64A on cholinergic neurotransmission in the sixth abdominal ganglion of the cockroach. *Comp.Biochem.Physiol.C.Comp.Pharmacol.Toxicol.*, 94: 121-127, 1989.
- Moruzzi, G. y Magoun, H. W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. clin. Neurophysiol.*, 1, 455-473, 1949.
- Morrison, A. R. y Pompeiano, O. Vestibular influences during sleep. IV. Functional relations between vestibular nuclei and lateral geniculate nucleus during desynchronized sleep. *Arch. Ital. Biol.*, 104, 425-458, 1966.
- Mouret, J. R., Jeannerod, m. y Jouvett, m. L'activite electrique du systeme visuel au cours de la phase paradoxale du sommeil chez le chat. *J. Physiol. (Paris)*, 55, 305-306, 1963.
- Nathanson, N. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Ann.Rev.Neurosci.*, 10: 195-236, 1987.
- Neal, H. y Bond, A. Modification of PGO activity by specific uptake inhibitors fluxientine, nioxentine and LR 5182. *Neuropharmacology*, 18, 818-819, 1979.
- Nelson, J.P., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. REM sleep burst neurons, PGO waves, and eye movement information. *J.Neurophysiol.*, 50: 784-797, 1983.
- Nishizuka, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665, 1988.
- Norgren, R. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J. Comp. Neurol.*, 166, 17-30, 1976.
- Ottersen, O.P. and Ben Ari, Y. Pontine and mesencephalic afferents to the central nucleus of the amygdala of the rat. *Neurisci. Lett.*, 8, 329- 334, 1978.
- Peracchia, C. and Mittler, B.S. Fixation by means of glutaraldehyde-hydrogen peroxide reaction products. *J. Cell Biol.* 53: 234-238, 1972.
- Peters, A., Palay, S. L. The fine structure of the nervous system: the neurons and their supporting cells. 3^a Edition., Oxford University Press., pp. 366-369, 1991.

Pieron, H. En le probleme physiologique du sommeil. Paris: Masson. (Pp. 1-50), 1913.

Price, J. L. and Amaral, D. G. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J. Neurosci.*, 1, 1242-1259, 1981.

Quattrochi, J., Mamelak, A.N., Macklis, J.D., Madison, R. and Hobson, J.A. Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol fluorescent microspheres. *Science*, 245: 984-986, 1989.

Rechtschaffen, A. y Kales, A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects (1st ed.) Washiington, D.C.: Public Health Service, U:S: Government Printing Office 1968

Reece, J. Laura and Schwartzkroin, A. Philip. Effects of cholinergic agonists on immature rat hippocampal neurons. *Developmental Brain Research*, 60, 29-42, 1991

Reynier, Rebuffel A., Callebert, J., Dimitriadou, V., Mathiau, P., Launay, J., Seylaz, J. and Aubineau, P. Carbachol induces granular cell exocytosis and serotonin release in rabbit cerebral arteries. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.*, 262: R105-R111, 1992.

Riou, F., Cespuglio, R. and Jouvét, M. Endogenous peptides and sleep in the rat: III the hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide. *Neuropeptides*, 2: 265-277, 1982.

Routtenberg, A. Protein kinase C activation leading to protein F1 phosphorylation may regulate synaptic plasticity by presynaptic terminal growth. *Behav.Neurol.Biol.*, 44: 186-200, 1985.

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

Sakai, K. Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. In: D.J. McGinty (ed). *Brain Mechanisms of Sleep*. Raven Press, New York, 111-137, 1985.

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.B. Brazier (eds). *The Reticular Formation Revisited*. Raven

Sakai, K. and Jouvét, M. Brain stem PGO-ON cells projecting directly to the cat dorsal lateral

geniculate nucleus. *Brain Res.*, 194: 1980.

Sakai, K., Petitjean, F. y Jouvét, M. Effects of ponto-mesencephalic lesions and electrical stimulation upon PGO waves and EMPs unanaesthetized cats. *Exp. Brain Res.*, 49, 311-314, 1976.

Saper, C. B. and Loewy, A. D. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.*, 197, 291-317, 1980.

Sastre, J. P., and Jouvét, M. Le comportement onirique du chat. *Physiol Behav.*, 22, 279-280, 1979.

Shiromani, P.J., Armstrong, D.M., Berkowitz, A., Jeste, D.V. and Gillin, J.C. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive somata in the feline brainstem: implications for REM sleep generation. *Sleep*, 11: 1-16, 1988.

Simón, A. K. "Participación de la amígdala del lóbulo temporal en la regulación del sueño y los fenómenos fásicos del sueño con movimientos oculares rápidos del gato". Tesis (Licenciatura), UNAM, Facultad de Psicología. México, D. F., 1996.

Simón, A. K., Calvo, J. M. Aumento a largo plazo del sueño REM y de los potenciales ponto-genículo-oxipitales (PGO) provocado por la activación colinérgica de la amígdala del lóbulo temporal en el gato. Suplemento de la Revista Salud Mental, 1, Vol. 20, págs. 12-22, abril 1997.

Snider, R.S. and Niemer, W.T. *A Stereotaxic Atlas of the Cat Brain*. Chicago Press. Chicago, IL., 1961.

Spencer, D. G. J., Horvath, E. y Traber, J. Direct autoradiographic determination of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: Relation to cholinergic nuclei and projections. *Brain Res.*, 380, 59-68, 1986.

Steriade, M., Paré, D., Datta, S., Oakson, G. and Curró-Dossi, R. Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-genículo-occipital waves. *J. Neurosci.*, 10: 2560-2579, 1990.

Stites, D. P., Hugh, H. F., Stobo, D. J. y Vivian, J. W. *Inmunología Básica y Clínica*. Quinta Edición. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V. Impreso en México, 263-269, 1985.

Svensson, B.A., Sottile, A. and Gordh, T.J. Studies on the development of tolerance and potential spinal neurotoxicity after chronic intrathecal carbachol-antinociception in the rat. *Acta Anaesthesiol.Scand.*, 35: 141-147, 1991.

Takeuchi, Y., McLean, J.H. and Hopkins, D. A. Reciprocal connections between the amygdala and parabrachial nuclei: ultrastructural demonstration by degeneration and axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res.* 239, 583-588, 1982.

Tanaka, C., Saito, N. Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem Int*, 21: 4, 499-512, 1992.

Thomas, J. and Benoit, O. Individualisation d'un sommeil a ondes lentes et activité phasique. *Brain Res.*, 5: 221-235, 1967.

Vanni-Mercier, G., Sakai, K. and Jouvet, M. Carbachol microinjections in the mediodorsal pontine tegmentum are unable to induce paradoxical sleep after caudal pontine and prebulbar transections in the cat. *Neurosci.Lett.*, 130: 41-45, 1991.

Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S. and Jouvet, M. Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch.Ital.Biol.*, 127: 133-164, 1989.

Veening, J. G., Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain Res.*, 303, 337-357, 1984.

Vivaldi, E., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. Evocation of desynchronized sleep signs by chemical microstimulation of the pontine brainstem. In: J.A Hobson and M.A.B. Brazier (eds). *The Reticular Formation Revisited*. Raven Press, New York, 513-529, 1980.

Voshart, K. and Van der, Kooy D. The organization of the afferent projections of the parabrachial nucleus to the forebrain in the rat: a retrograde fluorescent double-labeling study. *Brain Res.*, 212, 271-286, 1981.

Watanabe, M. August., Bertram, Katzung, G. Fármacos activadores de los receptores e inhibidores de la colinesterasa. En *Farmacología básica y Clínica*. Capítulo 7 (Bertram G.

Katzung). Quinta edición. Editorial Manual Moderno. Pags. 103-118. 1994.

Westfall, Thomas, C.. Agentes Muscarínicos. En Fundamentos de farmacología. Introducción a los principios de acción de los fármacos. Capítulo 15 (John A. Bevan, et. al.). Segunda edición. Editorial Harla. Impreso en México. Pags. 120-122. 1976.

Yamamoto, K., Mamelak, A.N., Quattrochi, J. and Hobson, J.A. A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: locus of sensitive region. *Neuroscience*, 39: 279-293, 1990.

Yasutomi, Nishizuka. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, Vol 334, pp. 661-665, 25 august 1988.