

**LA INTERACCION ENTRE LOS GANGLIOS BASALES Y
EL NUCLEO TEGMENTAL PEDUNCULO PONTINO:
POSIBLE PAPEL DEL ESTRIADO EN LA REGULACION
DEL SUEÑO**

TESIS

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M. en C. Juan Mena Segovia

Tutor:

Dra. M. Magdalena Giordano Noyola

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Octubre 2003



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.

INDICE

Abreviaciones	5
Resumen	6
Summary	7
Introducción	

CAPITULO I

RELACIÓN ANATÓMICA ENTRE LOS GANGLIOS BASALES Y EL NTPP

<i>Anatomía de los ganglios basales</i>	10
<i>Anatomía del NTPP</i>	12
<i>Citología y neuroquímica</i>	13
<i>Conectividad entre los ganglios basales y el NTPP</i>	14

CAPITULO II

EL PAPEL DEL NTPP DENTRO DEL CICLO SUEÑO VIGILIA

<i>Regulación del ciclo sueño vigilia</i>	16
<i>Papel del sistema colinérgico del tallo cerebral en la regulación del sueño</i>	18
<i>Participación del NTPP en la activación cortical</i>	19

CAPITULO III

EVIDENCIAS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO

<i>Efectos de las lesiones estriatales sobre el ciclo sueño vigilia</i>	20
<i>Enfermedades neurodegenerativas y trastornos del sueño</i>	20
<i>Activación del sistema dopaminérgico mesoestriatal y su relación con los procesos de despertamiento</i>	21
<i>Experimentos que apoyan la importancia de la aferencia GABAérgica al NTPP</i>	23

CAPITULO IV

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Hipótesis	26
Objetivos	26
Experimento I	26
Experimento II	36

CAPITULO V

RESULTADOS

Localización del NTPP por medio de la técnica de acetilcolinesterasa	42
Inmunohistoquímica	42
<u>Experimento I</u>	
Evaluación motora ante la lesión estriatal	43
Conteo de células positivas para c-Fos en relación con la lesión estriatal	
y su caracterización neuroquímica	44
Evaluación de la lesión estriatal utilizando la relación cerebro-ventricular	47
Correlación entre la dilatación ventricular y la expresión de c-Fos	48
<u>Experimento II</u>	
Expresión de células positivas para c-Fos en el NTPP en respuesta a la estimulación estriatal por anfetamina y su localización	49
Respuesta motora ante los diferentes fármacos	50
Análisis de los estados de vigilancia	51
Correlación entre actividad motora y vigilia	52
Análisis histológico de los cortes estriatales incluidos en el estudio	53

CAPITULO VI

DISCUSIÓN 54

Sustento del acercamiento inmunohistoquímico y los factores de transcripción 56

Consideraciones anatómicas 58

La población glutamatérgica como elemento decisivo en la activación talámica 61

Regulación dopaminérgica de la vigilia y su implicación en la modulación estriatal 64

Corolario 66

REFERENCIAS 67

APENDICE I

Figuras 82

ABREVIACIONES

ABC	Complejo avidina-biotina
AK	Acido kaínico
AME	Area mesencefálica extrapiramidal
ANDEVA	Análisis de varianza
ChAT	Colín acetil transferasa
CM	Núcleo centromediano del tálamo
DAB	Diaminobencidina
DM	Núcleo dorsomedial del tálamo
EcoG	Electrocorticograma
EH	Enfermedad de Huntington
EMG	Electromiograma
GABA	Acido gama-amino-butírico
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GB	Ganglios basales
GPE	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
IHQ	Inmunohistoquímica
LC	Locus coeruleus
LDT	Núcleo laterodorsal tegmental
MOR	Sueño de movimientos oculares rápidos
NADPH	Nicotinamido adenin dinucleótido fosfato
NTPP	Núcleo tegmental pedúnculo pontino
NST	Núcleo subtalámico
PBS	Búffer de fosfatos
PGO	Ponto-genículo-occipitales
RD	Núcleo del rafé dorsal
SNC	Substancia nigra compacta
SNR	Substancia nigra reticulata
SOL	Sueño de ondas lentas
TAN	Neuronas tónicamente activas
VA	Núcleo ventral anterior del tálamo
VL	Núcleo ventrolateral del tálamo
VM	Núcleo ventromedial del tálamo
VPLO	Area ventrolateral preóptica

RESUMEN

El núcleo tegmental pedúnculo pontino (NTPP) ha sido involucrado en desincronización cortical; su activación produce un incremento en vigilia y sueño MOR a través de la activación colinérgica del sistema tálamocortical. La desinhibición de los blancos de los ganglios basales como resultado de una lesión estriatal, puede resultar en una desincronización cortical debido a la sobreactivación de las neuronas del NTPP. Para probar esta hipótesis, en un primer experimento se midió la expresión de c-Fos en las células del NTPP en tres diferentes grupos de ratas Sprague-Dawley. Dos de ellos, recibieron inyecciones intraestriatales de ácido kaínico (5.0 nm/μl), y fueron sacrificadas ya sea en el día 7 postlesión o en el día 30 postlesión; el tercer grupo recibió solamente el vehículo. Los animales de cada grupo fueron perfundidos a una de tres diferentes horas del ciclo de 24 horas: al inicio o al final de la fase de luz, o a la quinta hora del comienzo de la fase de luz. Los cortes de cerebro fueron procesados para inmunohistoquímica contra c-Fos, ChAT, GAD y glutamato. Para realizar el conteo se utilizó un procedimiento estereológico para contar el número de células positivas, y se realizó una reconstrucción para determinar el grado de colocalización de los anticuerpos. Los resultados muestran un incremento importante en el número de células positivas a c-Fos en el NTPP en los animales experimentales perfundidos al día 30 postlesión en comparación con el grupo control, particularmente a la quinta hora de comenzar la fase de luz y al inicio de la fase de luz. Estos resultados sugieren que los cambios en el ciclo sueño vigilia observados después de las lesiones estriatales, pueden ser el resultado de la desinhibición del NTPP. En un segundo experimento se realizó una estimulación dopaminérgica con anfetamina aplicada intraestriatalmente y se observó un incremento en la expresión de c-Fos en el NTPP. Asimismo, mediante el uso de registros motores y electrocorticográficos, se observó un incremento en vigilia independiente de la activación motora. Estos resultados apoyan la hipótesis de una relación funcional entre los ganglios basales y el NTPP en términos del ciclo

sueño-vigilia, y sugieren una participación activa del estriado en la regulación de la actividad de las estructuras relacionadas con la activación cortical.

SUMMARY

The pedunculo pontine tegmental nucleus (PPT) has been involved in cortical desynchronization; its activation produces an increase in REM sleep and wakefulness by means of cholinergic activation of the thalamocortical system. Disinhibition of basal ganglia targets as a result of a striatal lesion, could result in increased cortical desynchronization through overactivation of the PPT neurons. To test this hypothesis, c-Fos immunoreactive cells in the PPT were quantified in three groups of male Sprague-Dawley rats. Two of them, received intrastriatal injections of kainic acid (5.0 nm/μl), and were sacrificed either on the 7th day postlesion or on the 30th day postlesion; the third group received sham lesions. Animals in each group were intracardially perfused at one of three different hours of the 24-hour cycle: at the beginning or the end of the light phase of the cycle, or 5 hours from the start of the light phase. Brain sections were processed for ChAT, GAD and glutamate immunoreactivity. A stereological procedure was used to count the number of positive cells, and a reconstruction made to determine the degree of colocalization of the antibodies. Results showed an important increase in the number of cells positive for c-Fos in the area near the PPT in the experimental animals perfused on the 30th day postlesion in comparison with the sham group, particularly at the 5th hour of the light phase. These results suggest that changes in the sleep-wake cycle observed after striatal lesions, could be the result of PPT disinhibition, however, further confirmation of the exact location of the c-Fos response is underway. In a second experiment, to test the hypothesis that the dopaminergic stimulation could also produce PPT disinhibition and non-specific cortical activation, amphetamine was infused both into the striatum of freely moving rats for motor and electrocorticographic recordings, and into the striatum of animals under deep anesthesia for c-Fos immunohistochemistry. The results show that intrastriatal amphetamine increases wakefulness independent of motor activity, and it increases c-Fos expression in the PPT and adjacent areas. They also

suggest that the striatum participates in non-specific cortical activation probably as a result of its relationship with the PPT.

INTRODUCCION

Los ganglios basales han sido considerados desde principios del siglo pasado como un conjunto de núcleos involucrados principalmente en la regulación de la conducta motora. A lo largo de los años consuetudinarios, la concepción de su funcionalidad se fue modificando y fue adoptando una serie de nuevas variantes conforme se llegaba a conocer mejor la complejidad de su funcionamiento. De esta manera, este conjunto de núcleos subcorticales, pronto se vieron involucrados en diferentes funciones principalmente de tipo cognitivas, tales como la memoria y el aprendizaje, la planeación de secuencias para el movimiento con la determinación previa de un meta, la regulación de la temporalidad entre distintas estructuras, e incluso la concepción del tiempo.

Una de las fuentes importantes de conocimiento al respecto es, sin lugar a dudas, el estudio de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso que afectan de manera particular a los ganglios basales. Derivado de este estudio, diversas anomalías se han hecho presentes sin necesariamente quedar dentro del terreno de la conducta motora. Uno de estos aspectos de particular interés para el presente trabajo es la afectación que se observa en el ciclo sueño vigilia de los pacientes aquejados por este tipo de enfermedades. La evidencia recogida hasta el momento muestra que no existe algún daño más allá del que sufren los ganglios basales, por lo que surge la interrogante de si acaso éstas estructuras puedan estar desempeñando un papel en el funcionamiento del ciclo del sueño. Evidencias experimentales apoyan estos datos. Múltiples estudios han logrado reproducir total o parcialmente las alteraciones de sueño previamente reportadas por la medicina clínica, incluyendo el realizado en nuestro laboratorio, el cual dio pie al trabajo que aquí se presenta.

Teniendo en mano toda esta evidencia, el problema que surgió fue hacer una conexión entre los ganglios basales que, hasta entonces no se tenía ninguna

explicación del porqué podría estar desempeñando esa participación en el sueño, y las estructuras que regulaban dicho ciclo. Haciendo una revisión bibliográfica acerca de la anatomía de los núcleos en cuestión, obtuvimos una primera evidencia acerca de la posibilidad de interacción funcional con un núcleo aún poco descrito que se encuentra en el tallo cerebral y tiene relación con los diferentes estados de activación cortical. Así, nuestra hipótesis de trabajo se basó en esta relación anatómica poco correlacionada aún con el grado en el cual un sistema puede afectar la actividad del segundo.

Mucha de la información obtenida apuntaba en una dirección contraria, principalmente hacia la función motora de éste núcleo ubicado en el tallo cerebral, pero que, afortunadamente para el presente trabajo, se basaban únicamente en especulaciones con poco fundamento. Así, los datos que se presentan en este trabajo, se apoyan en la evidencia consistente en cuanto a la funcionalidad de cada sistema así como en las características de sus conexiones, lo cual se tratará en los primeros dos capítulos. Posteriormente, hacia el tercer capítulo, se abordará toda la evidencia que apoya la participación de los ganglios basales en el ciclo de sueño vigilia.

En los capítulos experimentales, se tratará detalladamente la metodología y se expondrán los resultados acomodados en dos experimentos para mejor referencia. Ambos experimentos se basan en la modificación de la actividad del primer sistema para observar los cambios que se produzcan en el segundo sistema, empleando las técnicas de lesión y modificaciones farmacológicas. Finalmente se discutirán los resultados, sustentándolos con evidencia experimental ya publicada, y especulando acerca de las posibles necesidades de los ganglios basales para regular el sistema de sueño, concluyendo así en las últimas páginas de esta tesis.

CAPITULO I

RELACIÓN ANATÓMICA ENTRE LOS GANGLIOS BASALES Y EL NUCLEO TEGMENTAL PEDUNCULO PONTINO

Anatomía de los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales conformados por el estriado, el globo pálido porciones interna y externa, la sustancia nigra porciones compacta y reticulata, así como el núcleo subtalámico (NST) (Heimer et al., 1995). Su principal aferencia proviene de la corteza cerebral, la cual mantiene una proyección glutamatérgica al estriado y en segundo término al NST. El estriado mantiene proyecciones principalmente GABAérgicas con los demás núcleos de los GB a través de sus células de proyección, las neuronas espinosas medianas, las cuales además de GABA pueden expresar péptidos tales como encefalina, dinorfina y sustancia P (Graybiel & Ragsdale, 1983). El globo pálido externo (GPE) ha sido descrito como un elemento de regulación interna dentro de este grupo de núcleos debido a que mantiene un control inhibitorio sobre el NST, el globo pálido interno (GPI) y la sustancia nigra reticulata (SNR), estos dos últimos considerados como los núcleos de salida de información de los GB (Parent & Hazrati, 1995b). El NST es la única estructura de estos núcleos con proyecciones de tipo glutamatérgicas y que regula la actividad del GPI y la SNR. Finalmente, los GB proyectan a diferentes blancos a través del complejo GPI/SNR de proyección igualmente GABAérgica (Alexander & Crutcher, 1990). Dentro de las proyecciones mejor descritas se encuentra en primer lugar la eferencia talámica que hace conexión con los núcleos ventral anterior (VA), ventrolateral (VL) y dorsomedial (DM) del tálamo, cuya proyección, a su vez, será hacia la corteza cerebral (Deniau & Chevalier, 1985; Parent & Hazrati, 1995a). Esta vía ha sido relacionada con el control del movimiento, particularmente con la planeación temporal y espacial del movimiento, de las metas motoras por alcanzar y de la selección del siguiente movimiento (Graybiel, 1998). Una segunda vía de salida casi tan importante de los

GB, debido a la densidad sináptica de sus proyecciones, es la eferencia hacia el núcleo tegmental pedúnculo pontino (NTPP) en el tallo cerebral (Inglis & Winn, 1995). Esta proyección, que se ha intentado relacionar con las vías motoras descendentes, no presenta aún una clara noción acerca de su funcionalidad. Otras proyecciones de menor relevancia de los GB se dirigen hacia el colículo superior (Di Chiara et al., 1979) (Fig. 1).

El flujo de información en los GB a partir de su aferencia cortical hasta las eferencias hacia el tálamo y tallo cerebral permite situar elementos clave de control sobre algunos núcleos en particular. De esta manera, el estriado juega un papel elemental en la regulación de la actividad de los GB y por consiguiente esto se traduce en la actividad de los núcleos blanco que reciben las proyecciones de estos. Dentro del estriado existen diferentes elementos de regulación que interactúan para determinar la activación de sus proyecciones. Así, además de las neuronas de proyección, existen interneuronas tanto GABAérgicas como colinérgicas, éstas últimas denominadas neuronas tónicamente activas (TAN) (Kawaguchi et al., 1995). Las TAN han sido de particular interés en el estudio de la fisiología estriatal debido a las características de su patrón de disparo, el cual puede ser modificado después de determinado entrenamiento de forma gradual, razón por la cual han sido relacionadas con la organización motora (Graybiel, 1998). Las neuronas espinosas medianas, que pueden variar su respuesta en relación con la actividad de las TAN, poseen principalmente receptores tanto glutamatérgicos como dopaminérgicos, estos últimos debido a la aferencia de la sustancia nigra reticulata (SNR). En ambos casos, la respuesta dependerá del tipo de receptor que se esté activando (Hauber, 1998). En cuanto a los receptores glutamatérgicos se ha descrito la presencia relativamente homogénea de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, mientras que la presencia de receptores dopaminérgicos se encuentra de manera diferencial, encontrando así receptores de tipo D1 con efecto excitatorio en las neuronas que proyectan hacia la SNR y receptores D2 con efecto inhibitorio en las proyecciones hacia el GPE. Los efectos inhibitorio y excitatorio, resultado de la activación de los receptores dopaminérgicos, dependen de la activación de diferentes cascadas de segundos mensajeros que alteran la entrada de calcio a la célula (Hernandez-Lopez

et al., 1997; Hernandez-Lopez et al., 2000). Por esta razón, se han definido dos vías estriatofugales con efectos opuestos que se han denominado vía directa y vía indirecta (Alexander & Crutcher, 1990). La estimulación dopaminérgica del estriado resultaría en efectos opuestos en cada una de estas vías. La activación de los receptores D1 resultaría en la activación de las proyecciones GABAérgicas estriatonigrales, que a su vez inhibirían a la SNR, lo que daría como resultado la desinhibición de sus núcleos blanco de proyección. La activación de los receptores D2 de la vía indirecta, por su parte, resultaría en la desinhibición del GPE. De esta manera, habría una mayor inhibición del NST y este no podría estimular a la SNR y el GPI, traducándose, de igual manera, en desinhibición de los núcleos blanco (Gerfen, 2000).

Anatomía del núcleo tegmental pedúnculo pontino (NTPP)

El NTPP es un núcleo pequeño que se encuentra ubicado en la región superior del tallo cerebral. Guarda relación anatómica rostralmente con la SNR y el área retrorubral, medialmente con el pedúnculo cerebeloso superior, lateralmente con el lemnisco lateral, dorsalmente con el núcleo cuneiforme, ventralmente con el área tegmental pontina y caudalmente con el núcleo parabraquial (Rye et al., 1987). A éste núcleo se le ha relacionado con muy diversas funciones, tales como el despertamiento tálamocortical, implicado en la regulación de la vigilia y el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) (Steriade, 1992), la locomoción (Garcia-Rill et al., 1987), la cognición y la conducta de recompensa (Steininger et al., 1997b).

Se ha descrito una gran variedad de proyecciones en este núcleo, muchas de las cuales poseen un cierto grado de colateralización (Takakusaki et al., 1996). Dentro de las conexiones aferentes, la más importante proviene de los GB; ésta será revisada más adelante. Diversas estructuras de la formación reticular mantienen una relación eferente con el NTPP, tales como el núcleo del rafé dorsal (RD) y el locus coeruleus (LC), entre otras estructuras (Steininger et al., 1997a; Steininger et al., 1997b). Existen además proyecciones a partir del núcleo laterodorsal tegmental (LDT) y del NTPP contralateral (Semba & Fibiger, 1992).

Las conexiones eferentes del NTPP se dividen en ascendentes y descendentes. Las proyecciones ascendentes se dirigen hacia el tálamo, particularmente hacia los núcleos intralaminares y de la línea media, así como al núcleo reticular y otros núcleos de relevo talámicos, tanto motores como sensoriales; hacia los GB, principalmente hacia la SNC aunque también hay proyecciones hacia el globo pálido, pálido ventral y NST (ver más adelante); y hacia varias estructuras prosencefálicas, tales como el núcleo basal de Meynert, el septum lateral, el brazo vertical de la banda diagonal de Broca, la amígdala, el hipotálamo lateral, el colículo superior y la zona incierta (Hallanger et al., 1987; Sugimoto & Hattori, 1984).

En cuanto a las proyecciones descendentes, estas se dirigen hacia la protuberancia, el bulbo y la médula espinal. Mantiene una proyección hacia el bulbo mediolateral, una zona que se caracteriza como inductora de la locomoción (Spann & Grofova, 1989).

Citología y neuroquímica

Se distinguen dos porciones en el NTPP de acuerdo con su densidad celular, una porción compacta y una porción dissipata. Por otro lado, se han diferenciado dos poblaciones de acuerdo a su naturaleza neuroquímica, el área colinérgica (Sugimoto et al., 1984) y la no colinérgica, ésta última también llamada área mesencefálica extrapiramidal (AME) (Rye et al., 1987). Estas áreas difieren, además de en su neuroquímica y su morfología, en su conectividad, teniendo las células no colinérgicas una relación más directa con los núcleos de salida de los GB, la SNR, el GPI y el GPE. Según Rye y cols., las proyecciones a estos núcleos coinciden con el AME, la cual corresponde al núcleo tegmental subpeduncular, descrito por Paxinos (Paxinos & Watson, 1986).

Las células colinérgicas se caracterizan por ser de tamaño mediano a grande, de forma fusiforme a triangular, tienden acumularse en grupos de 3 a 4 y poseen sinapsis tanto simétricas como no simétricas. Se ha descrito la presencia de vesículas pleomórficas en algunas terminales haciendo sinapsis de forma simétrica, lo cual es sugestivo de inervación GABAérgica (Steininger et al., 1997b). Las

neuronas del NTPP no tienen una orientación uniforme y sus dendritas irradian en todas direcciones; de hecho, ha sido descrita una sobreposición dendrítica característica (Rye et al., 1987). Existe una colocalización para sustancia P en aproximadamente el 20% de estas células, así como para NADPH diaforasa.

Posteriormente fue descrita una población glutamatérgica como parte de las células no colinérgicas (Lavoie & Parent, 1994) que ha sido considerada de gran importancia funcional por el control que puede ejercer sobre las células colinérgicas. Estas existen principalmente en la pars dissipata del núcleo. Además de la células glutamatérgicas dentro de la estirpe no colinérgica existen también otras poblaciones: la dopaminérgica (más evidente en el humano), la noradrenérgica (en el felino) y un pequeño grupo de interneuronas GABAérgicas (Steininger et al., 1997b). Algunos trabajos reportan la existencia de otras neuronas peptidérgicas dentro de los límites del núcleo, siendo estas inmunorreactivas para galanina, dinorfina, factor liberador de corticostatina, factor atrial natriurético, péptido relacionado al gen de la calcitonina, neurotensina y péptido intestinal vasoactivo (Sutin & Jacobowitz, 1988).

Conectividad entre los ganglios basales y el NTPP

El NTPP mantiene una relación recíproca con los GB, particularmente con la SNR (Nakamura et al., 1989; Scarnati et al., 1987; Noda & Oka, 1986; Kang & Kitai, 1990; Granata & Kitai, 1991) y el globo pálido (Shink et al., 1997) de tipo aferente y con la SNC (Rohrbacher et al., 2000; Scarnati et al., 1986; Clarke et al., 1987; Gould et al., 1989) y el NST (Lavoie & Parent, 1994; Nomura et al., 1980) de tipo eferente.

En cuanto a las proyecciones aferentes, diversos autores han coincidido en que las células no colinérgicas son el blanco principal de la sustancia nigra y el globo pálido; sin embargo, existen evidencias de que las células colinérgicas son también reguladas por las proyecciones inhibitorias de estos núcleos aunque en menor grado. En este sentido, se ha comprobado la existencia de terminales GABAérgicas provenientes de la SNR tanto en células de naturaleza glutamatérgica como en células colinérgicas mediante el empleo de microscopía electrónica (Grofova & Zhou, 1998). Por otro lado, en un experimento realizado en rebanadas

longitudinales de cerebro de rata, se registró intracelularmente la actividad espontánea de las células colinérgicas para posteriormente inhibirlas mediante la estimulación de la SNR. En dicho trabajo se concluye que la inhibición producida por la estimulación de la SNR pudo inhibir directamente la respuesta colinérgica, lo cual fue comprobado mediante el uso de inmunohistoquímica para marcar las células registradas, previamente marcadas con biocitina (Kang & Kitai, 1990). Este experimento se replicó posteriormente con el propósito de identificar las características electrofisiológicas de las células del NTPP y clasificarlas así en dos diferentes grupos, tipo I y tipo II, de las cuales sólo en el tipo II fueron identificadas neuronas colinérgicas (Granata & Kitai, 1991). Esto mismo sirvió para identificar tiempo después que las células glutamatérgicas del mismo núcleo comparten ciertas características electrofisiológicas así como de conexión con las neuronas colinérgicas (Takakusaki et al., 1996).

Por otro lado, la relación eferente que guarda el NTPP con la SNC ha sido extensamente estudiada; el NTPP manda una proyección colinérgica que es capaz de estimular la liberación de dopamina en el estriado. En un estudio realizado en ratas se observó que la administración sistémica o *in situ* de escopolamina produce un aumento en la oxidación de dopamina en el estriado, implicando una mayor liberación, que incluso puede ser aumentada por la estimulación no específica del NTPP (Chapman et al., 1997).

Finalmente, se habla también de una relación recíproca con el estriado que no ha sido estudiada a fondo. Se ha reportado que el estriado manda proyecciones de la región ventrolateral hacia el NTPP, sin especificar alguna región en particular de este. Se cree que estas proyecciones funcionan como una interfase entre el estriado y el sistema límbico (Groenewegen et al., 1993; Berendse et al., 1992; Inglis & Winn, 1995).

CAPITULO II

EL PAPEL DEL NTPP DENTRO DEL CICLO SUEÑO VIGILIA

Regulación del ciclo sueño vigilia

El inicio del sueño a partir de la vigilia está determinado por una serie de factores que conllevan la sincronización de la actividad eléctrica cerebral. Diferentes estructuras nerviosas superiores entran en un modo oscilatorio funcional, producido por potenciales rítmicos inhibitorios y excitatorios dentro de amplios conjuntos neuronales que se unen en ondas cerebrales con grandes amplitudes y bajas frecuencias. El cerebro pasa de un estado alerta, capaz de integrar señales externas, a un estado en el cual permanece relativamente aislado del ambiente exterior (Hobson et al., 1986).

Las células talámicas, siendo las intermediarias entre la llegada de las entradas sensoriales y la corteza cerebral, sufren influencias inhibitorias, permaneciendo en un estado de baja respuesta y por lo tanto queda reducida su función de transferencia hacia las células piramidales de la corteza, que adoptan el patrón de actividad de las células tálamo-corticales (Steriade & McCarley, 1990).

Existen muchas hipótesis acerca de la generación del sueño de ondas lentas. Estas se basan principalmente en la argumentación de la existencia de algún sistema que aumenta su actividad e inhibe las estructuras encargadas de mantener el estado de vigilancia (teoría activa), o en que el sueño es producto de la sincronización de las ondas cerebrales (teoría pasiva). La primera se sustenta en la evidencia de la implicación del hipotálamo anterior y posterior en la generación de SOL. Recientemente se ha demostrado que un núcleo en el área ventrolateral preóptica (VLPO) aumenta su actividad metabólica durante el sueño no MOR (evidenciado por la expresión del gen temprano c-Fos). El VLPO contiene neuronas GABAérgicas que inhiben al núcleo tuberomamilar del hipotálamo posterior, cuya proyección es principalmente histaminérgica hacia la corteza y el tálamo (Hobson, 1999). Algunos grupos celulares dentro del área preóptica, la

banda diagonal de Broca, la sustancia *innominata* y el globo pálido descargan con mayor frecuencia durante el SOL, y se han relacionado principalmente con la sincronización electroencefalográfica (Prospero-Garcia et al., 1999).

El circuito tálamocortical ha sido identificado como blanco de muchos sistemas relacionados con los diferentes estados de activación. Durante la vigilia, las células tálamocorticales son moduladas por aferencias noradrenérgicas, serotoninérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas (estas últimas también presentes durante el sueño MOR). En las fases tempranas del sueño, sufren una inhibición GABAérgica a partir de las neuronas del núcleo reticular del tálamo, lo que ocasionará en ellas una hiperpolarización por potenciales postsinápticos inhibitorios. La actividad de disparo en ráfaga por parte de las células reticulotalámicas producirá despolarizaciones mediadas por calcio en las tálamocorticales, lo que se traducirá en husos de sueño. La inhibición mayor sobre ellas produce su inactivación, por lo que las células piramidales de la corteza oscilan de manera espontánea en un ritmo de 1 a 4 cps (Hobson, 1999). Las mismas neuronas tálamocorticales son las que posteriormente modificarán su patrón de descarga, aumentando progresivamente su frecuencia de disparo hasta llegar a su máxima actividad durante el sueño MOR (Prospero-Garcia et al., 1999).

En el sueño MOR la actividad neuronal produce una excitabilidad cerebral tan alta como en la vigilia, lo cual ha sido demostrado por los registros de la actividad de las neuronas del tallo cerebral que proyectan al tálamo, las tálamocorticales y otras neuronas corticales de axón largo. Los sistemas monoaminérgicos y colinérgicos del tallo cerebral han sido identificados como los responsables de los cambios en estas células durante la vigilia y el sueño MOR (Steriade, 1992). La proyección noradrenérgica del *locus coeruleus* (LC) está íntimamente relacionada con la activación durante la vigilia: disminuye su actividad durante el SOL e incluso desaparece en MOR (Steriade, 1992; Prospero-Garcia et al., 1999).

Papel del sistema colinérgico del tallo cerebral en la regulación del sueño

El sistema colinérgico del tallo cerebral está formado principalmente por los núcleos tegmental pedúnculo pontino (NTPP) y lateral dorsal (LDT). Estos núcleos, mediante su proyección a tálamo, inducen y mantienen el sueño MOR. Sus conexiones excitan de manera directa a las células tálamocorticales en las cuales producen despolarizaciones de corta y larga duración (mediados por receptores nicotínicos y muscarínicos, respectivamente). Posteriormente, las células tálamocorticales estimulan a las células corticales mediante sus proyecciones glutamatérgicas (Steriade, 1992).

Estos núcleos colinérgicos también incrementan su patrón de disparo durante la vigilia. Su actividad suele preceder por 20 a 60 segundos a los primeros signos electroencefalográficos de desincronización. El nivel de activación y de excitabilidad en el cerebro es muy similar en ambos estados, e incluso la posibilidad de respuesta de las células colinérgicas del tallo y de las tálamocorticales es mayor durante sueño MOR. La diferencia radica en la imposibilidad de procesar estímulos sensoriales durante este tipo de sueño (Steriade, 1992).

El sueño MOR es generado a partir de la interacción de diversas estructuras del tallo cerebral. Los núcleos monoaminérgicos reducen su actividad de manera importante, y esto da lugar a la desinhibición de las neuronas colinérgicas del NTPP y el tegmento laterodorsal. Estas, involucradas en la generación, transducción y mantenimiento de las ondas ponto-genículo-occipitales (PGO), actúan sobre las neuronas tálamocorticales de los núcleos centrolateral y ventromedial (Steriade, 1992). El grupo de las neuronas colinérgicas del tallo cerebral constituye un sistema que induce y mantiene el sueño MOR. La proyección colinérgica puede también tener un papel importante en la elevación rápida y transitoria del nivel de vigilancia por su respuesta fásica a un estímulo nuevo y desconocido (Kayama & Koyama, 1998). Se ha observado que tanto la liberación de acetilcolina como de glutamato a partir de las células del NTPP aumentan durante la vigilia, mientras que durante el SOL la liberación está

significativamente reducida (Kodama & Honda, 1999). Finalmente, la población colinérgica también está involucrada en la generación de la atonía muscular, funcionando en conjunto con la formación reticular pontina y ventral medular (Rye, 1997). La modulación de estos procesos, principalmente sobre el NTPP, está dada por su relación con algunas estructuras, como el núcleo del rafé dorsalis a través de sus proyecciones serotoninérgicas y de los ganglios basales, antes descrita, de tipo GABAérgicas.

Participación del NTPP en la activación cortical

Por otra parte, existe cierta evidencia de que la actividad del NTPP, y por lo tanto de la modulación del sueño, depende de neuronas glutamatérgicas y la alternancia de distintos neurotransmisores aferentes (Rye, 1997). Experimentos recientes han mostrado que las microinyecciones de glutamato en NTPP son capaces de estimular el sueño MOR a expensas de sueño de ondas lentas (SOL), pero no de vigilia (Datta & Siwek, 1997). Esto, por un lado, confirma la hipótesis de que la estimulación de las neuronas colinérgicas del NTPP causa la generación de vigilia y sueño MOR. De la misma manera, las células colinérgicas mesopontinas que liberan acetilcolina en sus estructuras blanco para controlar el ciclo sueño vigilia también sintetizan óxido nítrico al espacio extracelular, el cual actúa como mensajero neuronal. Algunos estudios han demostrado que los donadores de óxido nítrico generan un incremento en SOL y MOR, mientras que los inhibidores los disminuyen (Datta & Siwek, 1997; Hars, 1999). Las neuronas colinérgicas del NTPP son moduladas por células aminérgicas, colinérgicas, nitroxérgicas, GABAérgicas y glicinérgicas del tallo cerebral (Datta & Siwek, 1997). Existe además la posibilidad de que las neuronas peptidérgicas desempeñen también un papel de modulación (Sutin & Jacobowitz, 1988).

CAPITULO III

EVIDENCIAS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES EN LA REGULACIÓN DEL SUEÑO

Efectos de las lesiones estriatales sobre el ciclo sueño vigilia

Existen pocos trabajos que describan la relación entre los ganglios basales y el sueño. Entre estos pueden mencionarse los trabajos de Villablanca (Villablanca, 1972) y Corsi y cols. ((Corsi-Cabrera et al., 1975), en los cuales producen lesiones en el estriado y observan cómo se modifica el ciclo de sueño, encontrando una disminución en SOL y sueño MOR en el caso del primero, y un aumento en el sueño MOR en el caso del segundo. Posteriormente se publicó otro trabajo en el cual se realizan lesiones en el estriado con agentes excitotóxicos y se observan a partir del primer día postlesión los cambios en el ciclo sueño vigilia (Vataev & Oganessian, 2000). Estos autores encuentran aumento en la vigilia y lo explican como un posible efecto excitatorio tardío del mismo agente con el cual fue causada la lesión.

Enfermedades neurodegenerativas y trastornos del sueño

Por otro lado, ha sido descrito que diversas enfermedades neurodegenerativas que afectan a los GB producen alteraciones en el patrón de sueño vigilia (Fish et al., 1991). La enfermedad de Huntington (EH), cuya patología se centra en la degeneración del estriado afectando sus proyecciones GABAérgicas hacia los núcleos de salida de los GB, involucra como parte de su sintomatología, además de las alteraciones psiquiátricas, el deterioro en el intelecto con disminución de la atención y la concentración y las anormalidades en el movimiento (coreoatetosis), cambios en el ciclo de sueño vigilia. Estos cambios incluyen el aumento significativo de husos de sueño así como una disminución en el sueño de ondas lentas .

Existe toda una serie de patologías caracterizadas por una salida anormal de los sistemas motores que se traduce finalmente en movimientos anormales que únicamente ceden durante las fases de sueño profundas (Silvestri et al., 1990; Fish et al., 1991; Autret et al., 1994; Silvestri et al., 1995). En el caso de la EH, la salida inhibitoria del estriado está alterada, lo cual puede producir una desinhibición del tálamo para responder a cualquier estímulo y generar una entrada excitatoria aumentada en corteza, la cual dará mayor respuesta motora de salida (Reiner et al., 1988).

Las alteraciones del sueño observadas en la enfermedad de Parkinson comparten algunas características con aquellas observadas en la EH, tales como problemas para iniciar el sueño y mantenerlo, presencia de temblores durante las primeras fases del sueño y desaparición de estos en el SOL (Fish et al., 1991; Chokroverty, 1996), así como otras alteraciones particulares como un aumento en la latencia de sueño MOR y reducción en los husos de sueño y en la cantidad de sueño MOR (Wiegand et al., 1991). Otras enfermedades que afectan a los GB y tienen efectos sobre el sueño son: el síndrome de Gilles de la Tourette, la distonía de torsión (Fish et al., 1991; Autret et al., 1994), síndrome de Meige, el blefaroespasma, la coreoacantocitosis amiotrófica, el síndrome de Marinesco-Sjogren, el hemibalismo vascular, el síndrome del pie tónico, la disquinesia familiar orobucal idiopática, la distonía nocturna paroxística, el mioclonus nocturno, el síndrome de las piernas inquietas (Silvestri et al., 1990) y la neuroacantocitosis (Silvestri et al., 1995).

Activación del sistema dopaminérgico mesoestriatal y su relación con los procesos de despertamiento

Dentro de la fisiología de los ganglios basales, el sistema dopaminérgico mesoestriatal ha mostrado desempeñar un papel determinante en la modulación de la salida estriatal. La segregación de los receptores dopaminérgicos ha establecido dos vías funcionales de salida, una dependiente de receptores D1, con efecto excitatorio, y otra dependiente de receptores D2, con efecto inhibitorio

(Gerfen et al., 1990). La liberación de dopamina a partir de las terminales presinápticas de la SNC produce efectos complementarios en ambas vías que se traducen en la inhibición de los núcleos de salida de los ganglios basales, la SNR y el GPI (Wooten, 1997). Así, mientras que los receptores D1 producen la activación de las células estriatonigrales y por consiguiente la inhibición de la SNR, los receptores D2 producen la inhibición de las células estriatopallidales, por lo que el GPE mantiene una inhibición tónica sobre el NST, el cual es incapaz de estimular a la SNR.

Los cambios en la actividad estriatal inducidos a partir de la manipulación dopaminérgica producen diferentes respuestas conductuales, particularmente reflejadas en cambios en la conducta motora (Canales & Iversen, 1998; Smith et al., 1997). Diferentes estudios han mostrado que la afectación de la función dopaminérgica produce también cambios en procesos de tipo despertamiento, radicalmente distintos a aquellos producidos por la proyección noradrenérgica a partir del locus coeruleus hacia la corteza cerebral. Algunos de estos trabajos han propuesto la participación de este sistema en la activación conductual en respuesta a claves que muestran la disponibilidad de incentivos o reforzadores (Robbins, 1997).

A nivel sistémico, la dopamina ha mostrado tener efectos sobre la activación inespecífica de la corteza cerebral. Diferentes experimentos utilizando agonistas específicos para los receptores D1 han mostrado que la administración intraperitoneal de dicho agente produce desincronización del EEG y despertamiento conductual (Ongini et al., 1985; Ongini & Caporali, 1987; Kropf & Kuschinsky, 1993), mientras que el bloqueo de los mismos receptores produce sedación e inducción de sueño (Gessa et al., 1985). Apoyando estos datos, los reportes clínicos de pacientes que reciben tratamientos antipsicóticos, fármacos que bloquean la función dopaminérgica, han mostrado que existe una correlación entre la dosis y el nivel de alerta. Así, las dosis más altas provocaron disminución en el nivel diurno de alerta así como un mayor nivel de somnolencia. Incluso ha sido posible correlacionar con el uso de estos fármacos la disminución de los síntomas extrapiramidales (Martin et al., 2001).

De forma complementaria al uso experimental de agonistas dopaminérgicos específicos, han sido utilizados diversos estimulantes del sistema nervioso central que producen efectos sobre la vigilia, y se ha determinado que su efecto es producido a través de los sistemas dopaminérgicos (Nishino et al., 1998; Kanbayashi et al., 2000). Este es el caso de la anfetamina, la cual ha sido relacionada con la inducción de la vigilia: trabajos recientes han mostrado que la administración de anfetamina con el propósito de inducir vigilia produce activación neuronal (medida por el número de células inmunorreactivas a c-Fos) en distintas estructuras del cerebro; entre estas estructuras se encuentra el estriado (Lin et al., 1996).

Finalmente, ha sido reportada también la participación directa de los receptores D1 estriatales en la activación de la corteza cerebral, utilizando igualmente c-Fos, y zif 268, como marcadores de actividad neuronal. Este trabajo, sin embargo, está orientado al funcionamiento de las conexiones del circuito motor que involucra al tálamo y la corteza cerebral (Steiner & Kitai, 2000). Por otro lado, más recientemente ha sido publicado un artículo realizado en ratones en los cuales se ha suprimido el gen del transportador de dopamina (cuya función es la recaptura de la dopamina liberada), y se ha observado que estos animales tienen menor cantidad de sueño lento y mayor vigilia, sin observar ningún efecto sobre la conducta locomotora (Wisor et al., 2001). De esta manera, este trabajo establece una clara independencia entre la locomoción y los efectos de vigilia inducida producidos por los cambios en la fisiología dopaminérgica.

En conclusión, diversos estudios apoyan la teoría de la implicación de los sistemas dopaminérgicos en los procesos de activación cortical y desincronización del EEG, dando como resultado la inducción de vigilia. Uno de estos sistemas, el mesoestriatal, que ha sido identificado como responsable de la activación conductual, parece estar involucrado en la respuesta a fármacos estimuladores del sistema nervioso central que producen efectos sobre el nivel de alerta y vigilancia.

Experimentos que apoyan la importancia de la aferencia GABAérgica al NTPP

Existe evidencia experimental, aunque en ocasiones llegue a ser contradictoria, que apoya la hipótesis de que el estriado de alguna manera está relacionado con las estructuras generadoras del sueño. Como ya se ha descrito, los ganglios basales están anatómicamente relacionados con el NTPP, el cual podría ser el eslabón entre el estriado y las estructuras que regulan el sueño. Es posible también que la relación aferente que guarda el NTPP con los ganglios basales mediante proyecciones GABAérgicas (Parent & Hazrati, 1995a; Rye, 1997) comparta ciertas características funcionales con aquella entre los ganglios basales y el tálamo.

La evidencia acerca de la relación funcional entre los ganglios basales y el NTPP se basa en estudios como el de Kang y cols. (Kang & Kitai, 1990), y posteriormente Takakusaki y cols. (Takakusaki et al., 1996), quienes describieron que las proyecciones GABAérgicas del GPI y la SNR al NTPP tienen la capacidad de inhibir la respuesta colinérgica. Otros trabajos han mostrado que la administración tanto de agonistas como de antagonistas GABAérgicos en el NTPP tiene consecuencias funcionales en términos de cambios en la actividad locomotora (Garcia-Rill et al., 1990; Steckler et al., 1994). Más adelante, Strecker y cols. (Strecker et al., 1998) realizaron un trabajo en el cual observaron que las neuronas colinérgicas del NTPP aumentan su patrón de disparo después de la administración de un antagonista GABAérgico y que esto resulta en la inhibición de SOL y el aumento de vigilia. Tomando en consideración estos resultados, así como las relaciones anatómicas y funcionales entre el estriado, la SNR y el NTPP, una lesión en el estriado podría alterar la entrada GABAérgica al NTPP y resultar en alteraciones en su patrón de actividad, lo que a su vez redundaría en cambios en el ciclo sueño vigilia.

Así como la proyección eferente GABAérgica de la vía indirecta de los GB podría determinar la actividad del NTPP, este núcleo a través de su eferente colinérgica hacia la SNC puede estimular la liberación de dopamina en el estriado

(Chapman et al., 1997). De manera semejante, la privación de sueño MOR incrementa los niveles de dopamina en el estriado (Farooqui et al., 1996), condición bajo la cual se ha reportado una actividad incrementada de las células colinérgicas del NTPP (Maloney et al., 1999). Asimismo, en una enfermedad neurodegenerativa en la cual existe una afectación en el sueño MOR (trastorno conductual del sueño MOR), ha sido reportada una disminución en la inervación dopaminérgica estriatal (Albin et al., 2000.)

La dopamina en el estriado reduce el disparo de las células de la SNR a través de la activación de los receptores D1, entre otros mecanismos (Murer et al., 1997), lo que puede resultar en la desinhibición de las células del NTPP y permitir su activación aumentando así la vigilia. Como ya se describió en el apartado anterior, existe la hipótesis acerca de la participación de la dopamina en la regulación de la vigilia, más allá de sus efectos sobre la actividad locomotora (Wisor et al., 2001). Esta hipótesis se fundamenta en los efectos descritos sobre la disminución en la alerta durante el día, así como la somnolencia y la mayor cantidad de sueño con el uso de antipsicóticos (Martin et al., 2001). Esta evidencia indica que la interacción entre los GB y el NTPP puede darse a través de estos dos sistemas de neurotransmisores, el colinérgico y el dopaminérgico, e incidir en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

CAPITULO IV

SECCION EXPERIMENTAL

IV.1. *Hipótesis*

La lesión y las manipulaciones farmacológicas en el estriado modificarán la actividad del NTPP; esto traerá como consecuencia un cambio en los patrones de sueño vigilia.

IV.2. *Objetivos*

IV.2.1. *Objetivo General*

Describir la interacción funcional entre el NTPP y el estriado, así como el papel de este último en la regulación del ciclo sueño vigilia.

IV.3. Metodología.

IV.3.1. Experimento I.

Hipótesis I

La lesión estriatal excitotóxica producirá un incremento en la expresión de c-Fos en el NTPP.

Objetivos particulares I

Describir la actividad de c-Fos en el NTPP a lo largo del ciclo circádico, así como el efecto que produzca sobre dicha actividad una lesión en el estriado.

Definir qué tipo de población en el NTPP expresa c-Fos.

IV.3.1.1. *Animales.*

Se utilizaron 60 ratas macho Sprague-Dawley (de 250 a 300 g de peso), con comida y bebida de acceso libre, en ciclo luz oscuridad 12:12 (la luz permaneció encendida de las 8:00 a las 20:00hs), alojados en cajas individuales.

IV.3.1.2. *Grupos.*

Se formaron tres grupos de animales, un grupo control (grupo A) y dos grupos experimentales (grupos B y C) que recibieron una inyección intraestriatal de ácido kaínico (AK). El grupo control (n=20) siguió el mismo procedimiento quirúrgico que los grupos B y C, a diferencia que fue inyectado solamente con el vehículo del agente excitotóxico, búffer de fosfatos (PBS). Los grupos B y C fueron lesionados bajo el mismo procedimiento; sin embargo, el grupo B (n=20) fue estudiado al séptimo día después de la lesión mientras que el grupo C (n=20) fue estudiado hasta haber cumplido 30 días a partir del día de la lesión.

IV.3.1.3. *Cirugías.*

Todos los animales fueron colocados en el aparato estereotáxico previa anestesia (mezcla de 70mg/kg de ketamina y 6mg/kg de xilazina) y antisepsia del área quirúrgica. Una vez localizada la sutura de bregma, se procedió a trepanar el cráneo e introducir una cánula de acero inoxidable en las coordenadas AP +1.5mm, ML +/- 2.6mm y DV -4.5mm, que corresponden con el estriado anterodorsal de acuerdo al atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 1986). Una vez ubicada la cánula en el sitio correcto, se administraron 5 nmols en 0.5µl de AK durante 5 minutos en los grupos B y C mediante una bomba de infusión (Kd Scientific), mientras que al grupo A se le administraron 0.5µl de PBS (0.1 M pH 7.4) de la misma manera que a los otros dos grupos. La cánula permaneció en el mismo sitio un minuto adicional para permitir la difusión de la solución administrada.

IV.3.1.4. *Evaluación motora.*

El día anterior a ser perfundidos, los animales fueron evaluados en conducta motora utilizando esta variable como indicadora de la lesión estriatal (Fibiger, 1978). Con tal propósito, los animales fueron habituados a las cajas de registro en tres ocasiones en días no consecutivos. El sistema utilizado para la evaluación motora fue el sistema DigiScan (AccuScan Electronics, Columbus, OH) que consta de cuatro cajas de acrílico (40 x 40 x 30 cm) rodeadas por dos niveles de celdas de rayos infrarrojos. Las celdas detectan las interrupciones de dichos rayos ocasionadas por el movimiento del animal dentro de la caja de acrílico y mandan la información a una computadora que captura los datos (Sanberg et al., 1985).

El parámetro de medición fue la distancia total recorrida, la cual se refiere al número total de centímetros recorridos durante las 25 horas que duró el registro. Todos los registros comenzaron al inicio de la fase de oscuridad y se capturaron los datos en segmentos de 15 minutos. En todos los registros se descartó la primera hora de registro para desechar los datos de la hiperactividad ocasionada por la exploración de la caja.

IV.3.1.5. *Perfusiones.*

En todos los animales se realizaron las perfusiones con PBS (0.1M pH 7.4) y una mezcla de paraformaldehído al 4% con glutaraldehído al 0.25% a 4 grados centígrados de temperatura. Las perfusiones se llevaron a cabo a tres diferentes tiempos del ciclo luz oscuridad: las 8 horas (correspondiente al inicio de la fase de luz), las 13 horas (correspondientes a la quinta hora a partir del inicio de la fase de luz) y las 20 horas (correspondientes al inicio de la fase de oscuridad). Los animales se asignaron a cada horario de manera aleatoria, de tal manera que en cada uno quedaran por lo menos 6 animales de cada grupo. Aproximadamente 15 minutos antes de la hora de perfusión, los animales fueron inyectados con una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal. Una vez que los animales estuvieron

profundamente anestesiados, se les realizó una toracotomía y se les insertó una aguja a través del ventrículo izquierdo hasta la aorta ascendente. Una vez ahí se comenzó a pasar el PBS a temperatura ambiente por medio de una bomba de perfusión (Masterflex, Cole Parmer Instrument Co.) hasta que el hígado, los pulmones y los miembros inferiores se hubiesen blanqueado, para posteriormente dar paso a la perfusión del fijador. La cantidad de fijador utilizada fue de 250 a 300ml, dependiendo de la calidad de la fijación.

Una vez extraídos los cerebros del cráneo, permanecieron en un frasco con paraformaldehído al 4% sólo durante una hora y finalmente en sacarosa al 25% en PBS hasta que el cerebro tocara el fondo del frasco. Posteriormente se congeló el cerebro y se hicieron cortes de 35 μm a nivel de estriado y del NTPP. De cada cerebro salieron 5 series completas de cortes para quedar repartidos entre las distintas técnicas histológicas que a continuación se describen.

IV.3.1.6. *Histoquímica enzimática para Acetilcolinesterasa.*

Con el objeto de ubicar anatómicamente al núcleo tegmental pedúnculo pontino en una fase preliminar al presente trabajo, se desarrolló esta técnica con cerebros de animales intactos que fueron perfundidos de la misma manera que se ha señalado. Una vez obtenidos los cortes, estos fueron incubados por flotación en una solución base con 0.1g de sulfato de cobre, 0.1525g de glicina, 1.36g de acetato de sodio y 200ml de agua destilada, a la cual se añadió 0.0144g de etopropazina como inhibidor de colinesterasas no específicas y 1.24g de acetiltiocolina iodada, el sustrato de la enzima degradadora de acetilcolina. Esta solución se ajustó a un pH de 5.25 con ácido acético. Después de una noche de incubación a temperatura ambiente (o en su defecto 2 horas a 37°C), los cortes presentaron un precipitado blanco en las zonas en donde se encontraba la enzima. Dicho precipitado se forma a partir de la tiocolina liberada en unión al cobre con el que contaba la solución base. Los cortes se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada para posteriormente inducir una reacción con sulfito de sodio (6.9g en 200ml de agua destilada, con pH de 7.8), con lo cual se hicieron visibles los precipitados. Esta reacción tarda de 30

segundos a un minuto y se debe cuidar de no sobreexponer los tejidos, ya que se pueden oscurecer en exceso (deben quedar color café ocre). Inmediatamente después se retiraron los restos del sulfito mediante al menos tres lavados con agua destilada para finalmente montarlos en portaobjetos, dejarlos secar, deshidratarlos mediante alcoholes a diferentes concentraciones y xilol y cubrirlos con resina.

IV.3.1.7. *Inmunohistoquímica para c-Fos.*

Al realizar este procedimiento inmunohistoquímico (IHQ), al igual que en los que se describen posteriormente, se procesaron simultáneamente cerebros de cada uno de los grupos incluidos en este experimento, al igual que cortes control negativos, los cuales no fueron expuestos al anticuerpo primario o secundario. Para la IHQ contra c-Fos, se lavaron los cortes en PBS (0.1M pH 7.4) en dos ocasiones antes de comenzar la técnica. El siguiente paso fue un lavado en una solución de H₂O₂ al 1% en PBS en la que permanecieron durante 30 minutos, para posteriormente ser lavados con PBS en cuatro ocasiones durante 60 minutos en total. Una vez concluida esta fase, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario (c-Fos IgG Rabbit, Santa Cruz Biotechnology) en una solución de PBS con Tritón X100 al 0.52%, y permanecieron a 4°C en agitación constante durante 48 horas. La dilución empleada para el anticuerpo primario fue de 1:5000. Al terminar el periodo de incubación los tejidos se lavaron en PBS con Tritón X100 al 0.02% cuatro veces en una hora, y posteriormente fueron incubados con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG biotilylated, Vector) en una solución de PBS con Tritón X100 al 0.52% durante dos horas, a temperatura ambiente y en agitación constante. De la misma manera se deben lavar los tejidos una vez concluida la incubación, para pasarlos ahora a una solución con el complejo avidina-biotina (ABC) (Vector) en PBS con Tritón X100 al 0.52%. Esta solución debe ser preparada 30 minutos antes para permitir la formación del complejo. En ella permanecieron los tejidos durante 90 minutos, también a temperatura ambiente y en agitación constante, para volver a lavarlos concluido el tiempo requerido, pero ahora únicamente en PBS (cuatro ocasiones en 60 minutos). Finalmente, se generó la reacción con diaminobencidina

(DAB), la cual fue disuelta en agua destilada y puesta en contacto con los tejidos en un tiempo que osciló entre los 10 y 15 minutos, dependiendo de la coloración que fueron adquiriendo los tejidos; cuando estos hubieron adquirido un tono marrón, fueron lavados en PBS por lo menos 3 veces en 30 minutos para detener la reacción. Los cortes fueron montados entonces sobre los portaobjetos y fueron cubiertos con resina previa deshidratación.

IV.3.1.8. *Inmunohistoquímica para ChAT.*

Con el objeto de localizar las células colinérgicas dentro del NTPP de una manera más específica que la tinción para colinesterasas, se realizó esta técnica IHQ para la enzima colín acetiltransferasa utilizando una de las series de tejidos de cada cerebro incluido en este estudio. De la misma manera que en la técnica anterior, los cortes deben lavarse en PBS (0.1M pH 7.4) en dos ocasiones previamente. Posteriormente, los tejidos deben incubarse con PBS + tritón X 100 al 0.4% durante 30 minutos y con H₂O₂ al 1% en PBS en otros 30 minutos. Una vez realizado esto, se lavan con PBS y se incuban con diluyente (PBS + 0.1% de tritón X100 + 3% suero normal) a 4°C en agitación constante por una hora. (modificado de (Kimura et al., 1981)). Se deben lavar los cortes con PBS al igual que al final de cada incubación. Posteriormente se incuban con el anticuerpo primario (Goat anti-Choline Acetyltransferase, Chemicon AB144P) diluido con el diluyente a 4°C en agitación constante por 24 a 36 horas. Concluida dicha incubación, los cortes permanecen con el anticuerpo secundario (Rabbit anti-Goat IgG, Stemberger 502) en diluyente a 4°C por dos horas y finalmente con el complejo peroxidasa antiperoxidasa (Goat PAP, Stemberger 402) en las mismas condiciones que con la incubación anterior. Los tejidos entonces se incuban con la solución de DAB y se sigue el mismo protocolo que en la técnica arriba descrita.

IV.3.1.9. *Inmunocitoquímica para GABA.*

Otra de las series de tejidos de cada animal fueron utilizados para IHQ contra el neurotransmisor GABA, con el propósito de observar si la aferencia de dicho transmisor se encontraba disminuida en la región del NTPP. Con tal propósito, los tejidos fueron lavados y expuestos a peróxido de hidrógeno como en las técnicas anteriores y a borohidrato de sodio al 0.5%. Una vez que los tejidos estuvieron bien lavados, se incubaron con el anticuerpo primario (Mouse anti-GABA, Chemicon MAB316) en una dilución 1:200 durante 24 a 36 horas, y con el anticuerpo secundario (Anti-Mouse IgG biotilylated, Vector) y el complejo ABC (Vector) por dos horas cada uno, lavando los tejidos al menos 4 veces entre cada incubación. Finalmente, al igual que con las técnicas anteriores, los tejidos se incubaron con DAB para revelar el sitio de unión de los anticuerpos. En otra serie de tejidos, el anticuerpo secundario utilizado estuvo unido a un fluoróforo (rodamina). De esta manera, una vez concluida la incubación del anticuerpo secundario, los cortes fueron analizados por microscopía de fluorescencia.

IV.3.1.10. *Inmunohistoquímica para GAD.*

En algunos animales una serie más fue utilizada para realizar IHQ contra la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), la enzima sintetizadora de GABA. Los tejidos se lavaron con TBS y se incubaron con peróxido de hidrógeno al 1% por 30 minutos, con dimetilsulfóxido al 1% por 10 minutos y con suero de caballo al 30% por 30 minutos, cada uno de ellos en TBS. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-GAD 67 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución de 1:1000 durante 48 horas y, al salir, fueron lavados nuevamente para ser incubados con el anticuerpo secundario biotinilado (antirabbit IgG, Jackson Immunoresearch; dilución 1:200) por 2 horas. Finalmente los cortes fueron lavados nuevamente, incubados con el complejo ABC por 90 minutos y expuestos a la reacción con DAB. Los cortes se montaron en portaobjetos y fueron deshidratados antes de cubrirlos.

IV.3.1.11. *Inmunohistoquímica para glutamato.*

Finalmente, en otros animales fue empleada la técnica IHQ para glutamato. Con tal propósito los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (anti-glutamato IgG, Chemicon) en dilución 1:1000 durante 48 horas después de haber sido sometidos a la inhibición de reacciones inespecíficas. La incubación con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG biotilylated, Vector; dilución 1:200) se llevó a cabo durante dos horas, se lavaron los tejidos y se incubaron durante 90 minutos con el complejo ABC, para finalizar la reacción exponiendo los tejidos a DAB (Liu et al., 1997).

IV.3.1.12. *Doble inmunohistoquímica para c-Fos y ChAT*

Algunos tejidos fueron seleccionados para realizar en ellos un doble marcaje con anticuerpos para c-Fos y ChAT, con el objeto de observar si las células que expresan c-Fos en el NTPP son colinérgicas. Para realizar esta técnica se siguió el mismo procedimiento de incubación de los anticuerpos primarios, pero ahora los anticuerpos secundarios se encontraban unidos a fluoresceína en el caso de ChAT, o a rodamina en el caso de c-Fos. Los cortes fueron montados mientras permanecían en una cámara húmeda y fueron cubiertos con una resina a base de glicerol. Finalmente fueron observados en el microscopio de fluorescencia.

IV.3.1.13. *Conteo de células.*

El conteo de las células que resultaron positivas para c-Fos se llevó a cabo con un microscopio de luz utilizando los objetivos de 10x y 40x. El criterio para el conteo de células residió en la localización del sitio anatómico correspondiente al NTPP, basado en los datos reportado por diversos autores (Jones, 1995; Maloney et al., 1999; Paxinos & Watson, 1986). Una vez hecha la localización del núcleo, ésta se trazó en un esquema que representaba todos los niveles de los cortes coronales en los cuales se realizó el conteo. En dichos esquemas se marcaron los puntos correspondientes a cada una de las células que mostraron inmunorreactividad

positiva para c-Fos, para finalmente realizar un conteo corte por corte y sacar el total de células positivas por cada núcleo, obteniendo un total de dos conteos por cada cerebro. Adicionalmente se correlacionó el sitio de expresión de c-Fos con el área colinérgica obtenida a partir de la técnica de IHQ para ChAT; sin embargo, el hecho de que el área de expresión de las células positivas a c-Fos no se encontrara dentro del área de expresión para ChAT, no fue un criterio para descartar el conteo. Ya con el número total de células positivas en cada corte, se aplicó la fórmula de Abercrombie para análisis estereológico (Mukhida et al., 2001): $P=(1/f)AM/(D+M)$, donde P es el número total de células por núcleo de células, f es la frecuencia de las secciones seleccionadas para IHQ, A es el conteo celular crudo, M es el grosor de los cortes en micrómetros, y D es el promedio del diámetro de los núcleos celulares en micrómetros.

IV.3.1.14. *Evaluación del área de la lesión.*

Para evaluar el grado de lesión estriatal se midieron las áreas ventriculares y el área total cerebral para obtener una relación que sería considerada como el grado de dilatación ventricular debida a la retracción del tejido estriatal y su consecuencia sobre el área ventricular (Giordano et al., 1988). Con éste propósito, se capturaron las imágenes en un microscopio Nikon E600 utilizando un objetivo 2x y una cámara Photometrix CoolPix. Cada rebanada fue capturada en varias tomas (de dos a cuatro, dependiendo de su tamaño). Estas partes se unieron manualmente formando un mosaico que representa a la rebanada completa, utilizando Adobe Photoshop 6.5 . La mezcla de colores se hizo colocando en distintas capas cada una de las partes del mosaico y seleccionando el pixel más claro de todos. Las imágenes fueron analizadas en IPLAB 3.5 . La segmentación se hizo mediante selección de los pixeles mas oscuros, realizando manualmente correcciones en caso de ser necesario. Primero se midió el área total (sin incluir los ventrículos), después los ventrículos (cada uno por separado) y finalmente el hemisferio izquierdo (el derecho se obtuvo restando el izquierdo del total). Se tomó un posible aumento en la relación ventrículo/área cerebral como indicador de daño cerebral.

IV.3.1.15. *Análisis estadístico.*

Los datos de actividad motora se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) de tres vías (grupo, día y hora) con medidas repetidas en los factores día y hora.

Para el análisis estadístico de los conteos de células inmunorreactivas para c-Fos, se realizó una prueba ANDEVA de tres vías (grupo, hora del día y lado) con medidas repetidas en el factor lado, seguido de una prueba de dos vías (grupo y hora del día). Con el propósito de evaluar qué grupos mostraban las mayores diferencias, se utilizó una prueba *post hoc* de Tukey.

Para la dilatación ventricular, se aplicó un ANDEVA de una vía a los datos. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para averiguar entre qué grupos existía diferencia.

Se realizó finalmente una prueba de correlación entre el número total de células positivas para c-Fos a determinada hora con el grado de dilatación ventricular observada en el estriado de los mismos animales.

En todos los casos que fue utilizada la prueba ANDEVA, se consideró como significativo un valor de una p menor a 0.05.

IV.3.2. Experimento II.

Hipótesis II

La vía nigroestriatal dopaminérgica modula la salida GABAérgica del estriado hacia SNR, por lo que su activación se manifiesta en desinhibición de los núcleos blanco de proyección de los ganglios basales, en particular el NTPP.

Objetivo particular II

Describir los cambios producidos en la expresión de c-Fos en el NTPP ipsilateral al sitio de estimulación dopaminérgica en el estriado, así como los cambios producidos en la actividad motora y los estados de vigilancia.

IV.3.2.1. *Animales.*

Se utilizaron 18 ratas macho Sprague-Dawley (de 250 a 300 g de peso), con comida y bebida de acceso libre, en ciclo luz oscuridad 12:12 (la luz permaneció encendida de las 8:00 a las 20:00hs), alojados en cajas individuales.

IV.3.2.2. *Grupos.*

Para los experimentos de IHQ se formaron tres grupos de animales: un grupo control (n=6), un grupo testigo (n=6) y un grupo experimental (n=6). Tanto el grupo testigo como el grupo experimental fueron sometidos a una cirugía estereotáxica en la cual recibieron la administración ya sea de amfetamina o de solución salina; el grupo control no se sometió a ningún tipo de procedimiento quirúrgico. Los tres grupos fueron sometidos al procedimiento IHQ para evaluar la expresión de c-Fos.

Para los experimentos de actividad motora y registro ECoG se utilizó un grupo de 8 animales implantados con cánulas al estriado y con electrodos de registro cortical y muscular. Cada sujeto de este grupo fue rotando en un diseño de cuadro latino con el objeto de que cada animal recibiera cada uno de los tres tratamientos empleados, esto es, la administración por medio de cánulas ya sea de amfetamina,

de lidocaína o de solución salina. Posteriormente a la administración, fueron evaluados los cambios en actividad motora y ECoG.

IV.3.2.3. Valoración inmunohistoquímica.

IV.3.2.3.1. *Inyección intraestriatal de fármacos.*

Cada uno de los animales en este experimento fue anestesiado con una mezcla de 70mg/kg de ketamina y 6mg/kg de xilazina intraperitoneal y mantenidos en ese estado con dosis menores intramusculares durante una hora a partir de haber concluido el procedimiento quirúrgico o, en el caso del grupo control, durante el tiempo equivalente en que los otros grupos se mantuvieron bajo anestesia. El grupo experimental recibió una inyección intraestriatal unilateral de 15µg de anfetamina disueltos en 1µl de solución salina, lo cual fue administrado en un periodo de cinco minutos. Las coordenadas estereotáxicas para la administración en el estriado fueron: AP +1.5mm, ML +2.6mm y DV -4.5mm. En el lado contralateral a la estimulación fue administrada la misma cantidad del vehículo. El grupo testigo recibió una inyección intraestriatal unilateral del vehículo en el mismo lado en que el grupo experimental recibió la estimulación, mientras que el otro lado permaneció intacto. El grupo intacto no fue sometido a ningún procedimiento quirúrgico. Una vez concluido el tiempo postestimulación de una hora, los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal y fueron perfundidos para someterlos al procedimiento IHQ.

IV.3.2.3.2. *Inmunohistoquímica para c-Fos y doble inmunohistoquímica para c-Fos y ChAT.*

El procedimiento empleado para procesar los cortes de este experimento mediante IHQ fue el mismo que el descrito en el experimento anterior. Brevemente, se perfundieron los animales con una mezcla de fijadores (paraformaldehído 4% y glutaraldehído 0.25%), se extrajo el cerebro y fue postfijado con paraformaldehído a la misma concentración por una hora después de la perfusión, para finalmente ser sumergido en una solución a base de PBS con sacarosa al 25%. Una vez que los cerebros tocaran el fondo del frasco, éstos fueron rebanados con un microtomo por congelación en cortes de 35 μm . Los cortes fueron procesados posteriormente para inhibir reacciones inespecíficas que pudieran alterar la interpretación de los resultados. Los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios correspondientes a las técnicas empleadas anteriormente (ver apartados IV.3.1.7, IV.3.1.8 y IV.3.1.12), al igual que los anticuerpos secundarios, ya sea biotinilados o unidos a fluoróforos, así como el complejo ABC y la reacción con DAB. Los cortes fueron observados al microscopio una vez que estuvieron montados y cubiertos con resina, y se realizó el conteo de células inmunorreactivas a c-Fos en los cortes revelados con DAB, tal como está descrito en el apartado IV.3.1.13.

IV.3.2.4. Valoración motora y electrofisiológica.

IV.3.2.4.1. *Implantación de los electrodos y las cánulas.*

En otro grupo de animales distintos a los utilizados para realizar la IHQ (n=8), se implantaron cánulas dirigidas al estriado así como un electrodo de registro para actividad cortical y dos electrodos para actividad muscular. Bajo anestesia a base de una mezcla de ketamina (70mg/kg) y xilazina (6mg/kg), se realizaron trepanaciones para la implantación bilateral de cánulas en las mismas coordenadas que se describen en el apartado anterior (AP= +1.5mm a partir de bregma, ML= +/- 2.6mm, DV= -4.5mm), utilizando un microscopio estereoscópico para evitar dañar la corteza cerebral . Las cánulas de metal inoxidable se fijaron al cráneo con acrílico dental.

Para la implantación de electrodos bipolares se trepanó el hueso occipital en las coordenadas: AP 0 a partir de lambda y ML +3.0mm. Además se colocaron electrodos bipolares flexibles en los músculos dorsales del cuello y otro electrodo en el cráneo como tierra. Adicionalmente a éste último, fueron fijados otros tres tornillos para asegurar el casco de acrílico. A todos los animales se les permitió por lo menos una semana de recuperación después de la cirugía antes de comenzar el primer registro.

IV.3.2.4.2. *Procedimiento.*

El día anterior a cada experimento, los animales fueron introducidos a las cámaras de registro con agua y alimento a libre demanda y temperatura controlada. En ese momento se conectó un cable proveniente del polígrafo a los electrodos previamente implantados en el cráneo de los animales. Todos los registros se llevaron a cabo tres horas después del inicio de la fase de luz. Cinco minutos antes del inicio del registro se conectaron los inyectores a través de los cuales se administraron los fármacos, que a su vez estaban conectados a una bomba de infusión mediante sondas de bajo calibre. El volumen en cada administración fue de 1µl durante 1 minuto, dejando posteriormente 3 minutos de reposo para permitir que los fármacos difundieran en el estriado antes de sacar los inyectores. Cada animal recibió una administración bilateral de un fármaco por registro, nunca se combinaron dos fármacos en un sólo animal. La dosis de anfetamina fue la misma que en los animales utilizados para IHQ (15µg), mientras que en los otros grupos se empleó ya sea 1µl de lidocaína al 2% o 1µl de solución salina. Una vez que concluyó el tiempo de difusión, se retiraron los inyectores y comenzaron los registros tanto de actividad motora como ECoG.

IV.3.2.4.2. *Evaluación motora.*

Los animales fueron habituados previamente a las cajas de registro y los electrodos implantados se mantuvieron conectados al polígrafo desde un día antes y durante el desarrollo del experimento. La evaluación de la actividad motora se llevó a cabo en el sistema DigiScan descrito en el apartado IV.3.1.4. Los parámetros empleados para tal evaluación fueron los de distancia total recorrida (previamente descrito) y el tiempo total de movimiento, el cual evalúa la cantidad de tiempo que los animales se encuentran en movimiento en cada uno de los segmentos capturados de 15 minutos.

IV.3.2.4.3. *Registros electrofisiológicos.*

Se registraron tres animales de forma simultánea dentro de cajas de acrílico de 40 x 40 x 30 cm, con iluminación general del cuarto de registro. Los cables del polígrafo se conectaron a los electrodos de cada animal desde el día anterior al registro. El agua y alimento se proporcionó *ad libitum*, con temperatura ambiente de 22-24°C. Los registros tuvieron una duración de 4 horas a partir del final de la administración de los fármacos. Se utilizó un polígrafo GRASS Modelo 7D de 8 canales, conectado a un selector de electrodos (GRASS, modelo 78ES36-16). Cada animal se conectó mediante los electrodos implantados a un dispositivo SlipRing (Plastic One, Inc.), que permitió su libre giro, y de ahí al selector de electrodos. Los registros se obtuvieron en hojas de papel poligráfico que avanzaba a una velocidad de 2.5 mm por segundo.

IV.3.2.4.4. *Evaluación de los estados de vigilancia.*

El criterio para calificar los estados de vigilancia fue el siguiente: se consideró como vigilia a la actividad electroencefalográfica desincronizada, de alta frecuencia y baja amplitud, con la presencia de actividad tónica muscular en el EMG; se consideró como sueño de ondas lentas la actividad predominantemente de baja frecuencia y

mayor amplitud, con una disminución de la actividad tónica muscular; y se calificó como sueño MOR aquella actividad de alta frecuencia y baja amplitud, acompañado por la supresión de la actividad EMG. De esta manera, se contabilizó el número de épocas resultantes en cada estado (cada época tuvo 12 segundos de duración) y con dichos datos se hicieron las comparaciones entre los tratamientos y entre los distintos estados, tomando como parámetros el tiempo invertido en cada etapa expresado en minutos y el porcentaje de tiempo de cada una con respecto al 100% del registro. Una vez obtenidos estos datos, también se analizaron por segmentos de 15 minutos a lo largo de todo el registro. Posteriormente, se realizó el conteo del número de episodios totales de cada estado de vigilancia, la duración promedio de los episodios (expresada en segundos) y la latencia para el inicio de cada estado de vigilancia.

IV.3.2.5. *Análisis estadístico.*

Se utilizó la prueba ANDEVA de una vía para el total de minutos en cada estado de vigilancia, así como para el número de episodios, la duración promedio de los episodios y la latencia para el inicio de cada estado de vigilancia.

Para las pruebas motoras, se aplicó un ANDEVA de medidas repetidas de dos vías (fármaco y segmento de tiempo). En todos los casos se consideró como significativo un valor de una p menor a 0.05.

Para el conteo de células positivas para c-Fos, se llevó a cabo un ANDEVA de dos vías (grupo x hemisferios) con medidas repetidas en un factor (hemisferio), seguido de comparaciones planeadas para cada factor por separado.

CAPITULO V

RESULTADOS

V.1. Localización del NTPP por medio de la técnica de acetilcolinesterasa.

Previamente al inicio de estos experimentos, se realizaron pruebas de las tinciones y técnicas histológicas para delimitar el sitio anatómico en donde se encuentra ubicado el NTPP. Para tal efecto, fue necesario hacer un mapeo del tallo cerebral con la técnica de acetilcolinesterasa al mismo tiempo que las primeras pruebas de IHQ para c-Fos. Con los datos obtenidos fue posible delimitar el área de corte por microtomo para así localizar al NTPP en toda su extensión y llevar un control preciso del número de rebanadas que se podían extraer de cada cerebro para el posterior conteo de células. En la figura 2 se muestran los resultados de esta técnica comparados con las figuras del atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 1986).

V.2. Inmunohistoquímica.

Todos los cerebros fueron procesados para las diferentes técnicas antes descritas. En los experimentos preliminares para el marcaje contra c-Fos, se corrieron diferentes pruebas para establecer las diluciones del anticuerpo así como las variables dentro del procesos IHQ. Adicionalmente, se procesaron cortes utilizados como controles positivos y controles negativos. Los controles positivos fueron producidos mediante la inyección intraperitoneal de 1.5mg de anfetamina, lo cual produce una inducción de c-Fos generalizada en todo el cerebro, principalmente en corteza cerebral. Los controles negativos fueron cortes en los cuales no se incubó el anticuerpo primario.

Con la técnica inmuncitoquímica para ChAT se marcó el citoplasma de las células colinérgicas en el sitio de interés observándose la morfología característica de estas neuronas ya descrita en el primer capítulo. Con esta técnica específica es

posible asegurar con un bajo margen de error que las células observadas son de naturaleza colinérgica. Al realizar la técnica para c-Fos en cortes seriados del mismo cerebro y conociendo la distancia entre cada corte fue posible verificar si la marca de c-Fos se encontraba dentro de los límites del núcleo colinérgico; sin embargo, no fue posible asegurar si correspondía a la misma célula. Este fue el propósito de realizar un doble marcaje de dicha señal.

Por otro lado, en cuanto a la técnica de inmunohistoquímica para GABA, fue difícil la identificación de una señal positiva siguiendo el procedimiento de revelado para DAB; por esta razón, se decidió completar el marcaje mediante un anticuerpo secundario unido a rodamina y analizarlo mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados entonces mostraron una amplia señal para GABA, incluido el área correspondiente al NTPP. De esta manera, mediante esta modificación técnica, se pudo observar la presencia de GABA dentro de los límites del NTPP. Adicionalmente, decidimos hacer un marcaje contra la enzima GAD, empleando anticuerpos tanto anti-GAD 67 como anti-GAD 65, los cuales marcan cuerpos celulares y fibras nerviosas respectivamente, con el propósito de observar también la situación anatómica de las interneuronas GABAérgicas dentro del NTPP.

Finalmente, el marcaje para las células glutamatérgicas fue el último en incorporarse al protocolo. La hipótesis inicial del presente trabajo consideraba la posibilidad de la participación de las células colinérgicas en los procesos de desinhibición producida por los GB. Después de haber descartado su participación como únicos responsables de ésta activación neuronal evidente por la expresión de c-Fos, fue necesario considerar a las demás poblaciones celulares dentro del núcleo.

V.3. Experimento I.

V.3.1. *Evaluación motora ante la lesión estriatal.*

Los registros motores mostraron un efecto significativo de grupo ($F(2,47)=9.58$, $p<0.001$), de hora de prueba ($F(23,1081)=16.6$, $p<0.001$) y de

interacción grupo/hora ($F(46,1081)=2.72$, $p<0.001$). Como ha sido reportado en trabajos previos, se encontró un aumento en la actividad motora en los animales lesionados en el estriado con AK 7 días después de la cirugía cuando éstos fueron comparados con el grupo control, usando una prueba de Tukey ($p<0.001$). La actividad, como se muestra en la figura 3, es significativamente mayor durante la fase de oscuridad, periodo de actividad de la rata, que durante la fase de luz, en la cual no muestra diferencias con los demás grupos. Sin embargo, al día 30 postlesión, esta hiperactividad ha disminuido, tendiendo a regresar a los valores basales. Se observa en la gráfica que si bien la curva de actividad de este grupo durante la fase de oscuridad no llega a ser como la del grupo control, ésta sí tiende a disminuir en comparación con los valores observados al día 7 postlesión ($p<0.051$). Al día 30 postlesión la actividad de estos animales no resulta ser significativamente diferente de la actividad de los animales control.

La relevancia de estos datos recae en el poco o nulo efecto que tiene la lesión sobre la actividad motora en los momentos del ciclo circádico en los cuales se realizan las perfusiones. Es posible interpretar a partir de estos datos que la actividad motora es similar tanto en los animales del grupo control como en los animales de ambos grupos experimentales, y que cualquier efecto observado en torno a la actividad del NTPP no estaría relacionado con la locomoción.

V.3.2. Conteo de células positivas para c-Fos en relación con la lesión estriatal y su caracterización IHQ.

Con el propósito de definir el sitio anatómico en el cual se realizó el conteo de células inmunorreactivas a c-Fos, se utilizó como referencia un mapa publicado por el grupo de Maloney y cols. en 1999 en un experimento con fines similares, para definir la situación de los núcleos tegmentales mesopontinos. En la figura 4 se puede observar el sitio del conteo en relación con el mapa publicado y los límites anatómicos del NTPP. Adicionalmente, se realizó una IHQ contra ChAT en cada cerebro incluido en el estudio con el propósito de ubicar la población colinérgica del NTPP y así elegir el sitio de conteo para cada animal.

Los resultados del conteo de células positivas a c-Fos en el NTPP se muestran en las gráficas 5A y 5B. En la primera gráfica se presenta la variación en la expresión de c-Fos a lo largo del ciclo, en cada grupo. Los datos que se muestran en esta gráfica obtenidos a las 13, 20 y 8 horas, fueron duplicados con el propósito de mostrar la variación periódica en la actividad del NTPP. La figura 5B representa el número promedio de células positivas a c-Fos en el NTPP en cada uno de los grupos, a las tres diferentes horas del día. Se presentan los conteos en cada uno de los lados del núcleo, el izquierdo en las barras negras y el derecho en las barras blancas.

El análisis estadístico de los datos que se inició con un ANDEVA de tres vías (grupo, hora y lado) con medidas repetidas en el factor lado, mostró un efecto significativo de la interacción entre grupo x hora ($F(4,41)=2.88$, $p<0.05$) y un efecto significativo de grupo ($F(2,41)=9.05$, $p<0.001$). Dado que no hubo un efecto significativo de lado, se procedió a un análisis de dos vías (grupo y hora) usando solamente los datos de uno de los lados. La tabla 1 muestra la estadística descriptiva de todos los datos.

El análisis de dos vías mostró un efecto significativo de la interacción grupo x hora ($F(4,41)=5.20$, $p<0.01$), un efecto significativo de grupo ($F(2,44)=13.99$, $p<0.001$) y un efecto significativo de hora ($F(2, 44)=5.29$, $p<0.01$). El grupo con mayor número de células positivas fue el grupo 30 días (150 ± 8), seguido del grupo 7 días (82 ± 13) y del grupo control (52 ± 8). La mayor expresión se observó a las 8 horas (138 ± 26), pero ese efecto se debió principalmente al grupo 30 días como es evidente en la gráfica. El análisis *post hoc* (prueba de Tukey) mostró que hubo un aumento significativo ($p<0.05$) en la expresión de c-Fos en el grupo 30 días, en particular a las 8 horas del día, pero también a las 13 horas en comparación con el grupo control respectivo. Asimismo mostró que el número de células positivas es mayor a las 8 horas que a las 13 o a las 20 horas, en este grupo de 30 días. En los otros grupos, aunque hay una variación a lo largo del ciclo, no hay variaciones estadísticamente significativas.

Estos datos muestran que la lesión estriatal modifica la expresión basal de c-Fos en el NTPP y que estos cambios se dan predominantemente en el grupo 30 días postlesión, particularmente a las 8 y 13 horas. En contraste, es particularmente notable el hecho de que la expresión de c-Fos en el NTPP en el grupo 7 días postlesión no sea significativamente mayor que la del grupo control, dada la implicación de este núcleo en la conducta motora.

El análisis del conteo de células positivas a c-Fos en las tres diferentes condiciones experimentales y a las tres diferentes horas del ciclo circádico no aseguran que se trata de la población colinérgica del NTPP, aunque por su situación anatómica, la cual ha sido comparada con otros trabajos antes mencionados, sugiere que el conteo de células para c-Fos sí se encuentra dentro de los límites anatómicos del mencionado núcleo. En la figura 6 es posible apreciar la reconstrucción tridimensional del NTPP a partir de los cortes seriales intercalados tanto de c-Fos como de ChAT en un cerebro representativo del grupo de 30 días sacrificado a la quinta hora del inicio de la fase de luz. Es posible observar en este gráfico que la población celular positiva a c-Fos se encuentra en un nivel más dorsal y medial con respecto a la población colinérgica perteneciente al NTPP.

Adicionalmente a la tinción colinérgica, se realizó la caracterización neuroquímica de la región mesopontina en la cual se ubica el NTPP y en la cual se localizan las células positivas a c-Fos incluidas en el análisis estadístico. Inicialmente se realizó una tinción con violeta de Cresilo para teñir los núcleos de las neuronas del NTPP, con el propósito de ubicar al conjunto de sus poblaciones sin importar su naturaleza neuroquímica (Fig. 7A). Se realizó también una tinción histoquímica contra la enzima NADPH-diaforasa, la cual se sabe que coexpresa con las células colinérgicas del NTPP (Fig. 7B). De igual forma se realizaron pruebas IHQ contra las dos isoformas de la enzima sintetizadora de GABA, GAD-65 y GAD-67 las cuales tiñeron tanto terminales sinápticas y fibras nerviosas (Fig. 7C) como cuerpos celulares GABAérgicos (Fig. 7D), respectivamente.

En la figura 8 se muestran cuatro cortes subsecuentes del NTPP procesados con distintas técnicas IHQ. Así, en los recuadros 8A y 8D, encerrando a las otras dos

técnicas, se muestran los cortes procesados contra ChAT, definiendo los límites colinérgicos del núcleo. En la figura 8B se muestra el área de inmunorreactividad positiva para c-Fos, la cual se encuentra en el límite dorsal de la población colinérgica. Finalmente, en la figura 8C, se muestran las células positivas para glutamato en toda la región mesopontina. Basándose en la posición de las células con respecto a la muesca en el tejido, es posible afirmar que, por un lado, existen células glutamatérgicas dentro de los límites colinérgicos del NTPP, y por otro, que en el sitio de mayor expresión de c-Fos también existe inmunorreactividad para glutamato.

Finalmente, en la figura 9 se muestra un corte del tallo cerebral a nivel del NTPP procesado con las técnicas IHQ contra c-Fos y contra ChAT con el propósito de observar el marcaje de ambos anticuerpos en el mismo corte. Así, es posible observar tal como anticipó la reconstrucción tridimensional, que la población inmunorreactiva a c-Fos se encuentra dorsal a la población colinérgica, aunque es evidente que aún se encuentra dentro de sus límites debido a la presencia de las fibras colinérgicas. De hecho, es posible identificar doble marcaje en algunas de las células de este núcleo.

Del análisis de estas figuras es posible concluir que, a) los límites del núcleo establecidos por la morfología de las células teñidas con violeta de Cresilo no coincide exactamente con los límites de la población colinérgica; b) la población que expresa NADPH corresponde con la población colinérgica en la cual la expresión de c-Fos es mínima; c) es posible ubicar tanto células GABAérgicas como fibras del mismo tipo dentro del NTPP; d) la población inmunorreactiva a c-Fos permanece, de manera consistente, dorsal a la población colinérgica de dicho núcleo; y e) se encuentran células positivas a c-Fos dentro de áreas glutamatérgicas del NTPP.

V.3.3. Evaluación de la lesión estriatal utilizando la relación cerebro-ventricular.

En todos los animales incluidos en el conteo de células positivas a c-Fos se recolectaron los cortes correspondientes al estriado anterior, adyacente al sitio de la lesión. Las mediciones de la relación entre el área de los ventrículos laterales y el área total cerebral mostraron diferencias significativas entre grupos (ANDEVA $F(2,111)=42.12$, $p<0.05$); cualquier aumento de esta relación observado en los grupos experimentales, en comparación con el grupo control, fue considerado como un índice de dilatación ventricular. El número total de animales evaluados fue de 60, 20 en cada grupo; en cada cerebro se midieron los ventrículos de cada hemisferio por separado, dando así un total de 120 mediciones. De esta manera, en la figura 10 se puede observar que la dilatación ventricular tiende a aumentar con el paso del tiempo posterior a la lesión. Los animales perfundidos al día 7 postlesión muestran una dilatación ventricular significativamente mayor que los animales del grupo control. En el caso de los animales del grupo 30 días postlesión, existe una mayor dilatación incluso que el grupo 7 días postlesión, siendo ésta significativamente diferente de los otros dos grupos. Con esto se demuestra que aún después de los 7 días, ya cuando se pensaba que todos los efectos de una lesión estriatal con ácido kaínico se habían establecido, sigue habiendo cambios tisulares evidentes a los 30 días postlesión.

Adicionalmente, los cortes estriatales sirvieron para obtener la localización del sitio de entrada de los inyectores mediante los cuales se realizó la administración de AK. En todos los animales incluidos en este experimento se ubicó a la punta de los inyectores dentro de la región anterodorsal del estriado.

V.3.4. Correlación entre la dilatación ventricular y la expresión de c-Fos.

Se realizó una gráfica de correlación comparando el grado de dilatación ventricular ocasionada por la lesión estriatal y el número de células positivas para c-Fos observadas en el NTPP entre los grupos que mostraban mayores diferencias, y de acuerdo también a las horas de mayor expresión. En la figura 11A se hace una correlación utilizando los datos de los grupos control y 30 días postlesión al final de

la fase de oscuridad y a la quinta hora del inicio de la fase de luz, debido a que son los grupos que mostraron mayores diferencias en el conteo de células inmunorreactivas a c-Fos. Así, se puede observar que existe una correlación positiva ($r=0.80395$, $F(1,14)=25.5$, $p<0.001$) entre el grado de dilatación ventricular y el número de células que expresaron c-Fos. Adicionalmente, se realizó una regresión lineal para observar la dependencia entre ambas variables ($R^2=0.6463$, $p<0.05$) (Fig. 11B). Esto parece estar indicando que entre mayor sea la dilatación ventricular, en este caso particular debido a la lesión en el estriado, mayor actividad habrá en el NTPP como probable consecuencia de un proceso de desinhibición.

V.4. Experimento II.

V.4.1. *Expresión de células positivas para c-Fos en el NTPP en respuesta a la estimulación estriatal por amfetamina y su localización.*

Todos los cerebros pertenecientes a este experimento fueron procesados tanto para c-Fos revelado por DAB como por doble marcaje para c-Fos y ChAT con anticuerpos unidos a fluoróforos. Los resultados que se obtuvieron son como a continuación se describen.

En los cerebros de los animales pertenecientes al grupo experimental que fue estimulado por amfetamina 60 minutos antes de la perfusión se encontró un aumento en la expresión de c-Fos en el NTPP principalmente ipsilateral al sitio de inyección (Fig. 12A). El número de células positivas en el NTPP ipsilateral resultó mayor comparado con el NTPP contralateral, en cuyo lado sólo se administró el vehículo. Por otro lado, la expresión de c-Fos en los grupos testigo (Fig. 12B) e intacto (Fig. 12C) fue mínima. Sin embargo, la expresión en el NTPP del lado que recibió la inyección de vehículo en el grupo experimental fue mayor a la del grupo testigo en las mismas condiciones.

En la figura 13 se muestra el conteo del número de células positivas a c-Fos en el NTPP de los tres grupos. Se puede observar que los grupos testigo e intacto se comportan de manera similar, mientras que en el grupo experimental, particularmente en el lado ipsilateral a la administración de anfetamina, muestra un número mayor de células positivas. El análisis estadístico muestra un efecto significativo de grupo (ANDEVA, $F(2,15)=4.70$, $p<0.05$) así como una interacción significativa entre grupo y lado de la inyección (ANDEVA, $F(2,15)=7.57$, $p<0.01$). Las comparaciones preplaneadas muestran una diferencia entre ambos lados sólo para el grupo de anfetamina. Para el lado tratado, se encontró un número significativamente mayor de células positivas a c-Fos en el grupo que recibió anfetamina (ANDEVA, $F(1,15)=9.08$ y 11.53 , $p<0.01$, para los grupos testigo e intacto, respectivamente).

En cuanto a los resultados obtenidos de la doble IHQ por fluorescencia, estos también muestran la escasa expresión de células positivas a c-Fos en los grupos testigo e intacto (al igual que con la técnica con DAB), dentro de los pocos que llegaron a expresar el gen temprano, mientras que el grupo experimental muestra de manera consistente el aumento en la expresión de c-Fos. En la figura 14 se muestran estos resultados: se puede observar a las células positivas a ChAT (verde) y a las positivas para c-Fos (rojo), estas últimas dentro de y dorsales a la población colinérgica, tanto en el lado ipsilateral a la estimulación (Fig. 14A) como en el lado contralateral (Fig. 14B). Aunque ambos lados parecen expresar c-Fos, es evidente el mayor número de células en el lado ipsilateral, así como el grado de coexpresión, lo cual se observa de color amarillo. Cabe señalar que la coexpresión no se observó en todos los animales que compartieron estas mismas condiciones experimentales; el resto de los animales mostraba un aumento en la expresión de c-Fos dorsal a la población colinérgica, tal como en los cortes procesados con DAB.

Es importante señalar en este momento que el sitio de mayor expresión de c-Fos es dorsal al NTPP colinérgico, coincidiendo incluso con la localización de la expresión observada tras la lesión estriatal, descrita en el experimento anterior.

V.4.2. *Respuesta motora ante los diferentes fármacos.*

Los valores totales de las 4 horas de los registros de actividad motora muestran un efecto significativo del tratamiento tanto en la distancia total recorrida (ANDEVA $F(2,26)=4.36$, $p<0.05$) como en el tiempo total de movimiento (ANDEVA $F(2,26)=5.1$, $p<0.05$) (Fig. 15). También se encontró un efecto de muestra (segmentos de 15 minutos) (ANDEVA $F(15,390)=11.54$ y 18.74 para distancia total recorrida y tiempo de movimiento respectivamente, $p<0.001$) así como de interacción entre las muestras (ANDEVA $F(30,390)=2.78$ y 2.89 para distancia total recorrida y tiempo de movimiento respectivamente, $p<0.001$). El principal efecto de la anfetamina se sitúa en el inicio del registro, donde aparece un incremento significativo en la distancia total recorrida ($p<0.05$ para el tercer segmento) y en el tiempo de movimiento ($p<0.05$ para los primeros tres segmentos), y tiende a disminuir progresivamente hasta alcanzar los valores de los otros grupos 60 minutos después de comenzar el registro. Las flechas en las gráficas de la figura 15 están situadas a los 60 minutos del comienzo del registro, el momento en que los animales procesados para IHQ fueron perfundidos. De esta manera, es evidente que en el momento de ser perfundidos aquellos animales, la actividad motora se encontraba en los mismos valores que los demás grupos. Por su parte, el grupo tratado con lidocaína no muestra ningún efecto del tratamiento.

V.4.3. *Análisis de los estados de vigilancia.*

Los datos obtenidos a partir de los registros ECoG muestran cambios entre los diferentes tratamientos. Dos registros ECoG del grupo tratado con solución salina fueron excluidos por no cumplir con el criterio de estar libres de ruido en un 85% del registro. En la figura 16 se muestra el tiempo total en cada estado de vigilancia y se puede observar que el grupo tratado con anfetamina presenta una cantidad mayor de vigilia. El análisis estadístico muestra que existe un efecto de tratamiento en el tiempo total tanto en vigilia (ANDEVA, $F(2,19)=6.19$, $p<0.01$) como en el SOL

(ANDEVA, $F(2,19)=12.3$, $p<0.001$), y las pruebas post hoc Tukey indicaron diferencias significativas en el incremento en la vigilia y la disminución del SOL en el grupo tratado con anfetamina cuando fue comparado con los grupos que recibieron lidocaína y solución salina.

Adicionalmente, se obtuvieron los datos del número de episodios y la duración promedio de éstos. Así, en la figura 17 se observa que existe una tendencia del grupo de anfetamina a tener un mayor número de episodios tanto de vigilia como de SOL, que no llega a ser estadísticamente significativo, aunque sí se observa una tendencia ($p<0.06$). Esto se complementa con la disminución en la duración de los episodios de vigilia del mismo grupo. Es también notoria en este grupo una disminución de la duración promedio de los episodios de sueño MOR en comparación con el grupo control, aunque esta diferencia tampoco es significativa.

Finalmente, se analizaron las latencias para ambos tipos de sueño, SOL y MOR. Se observa en la gráfica 18 un aumento esperado en el grupo tratado con anfetamina en la latencia para el SOL a partir del inicio del registro, el cual se correlaciona con el incremento en la actividad motora (ANDEVA $F(2,19)=6.81$, $p<0.01$). La latencia para el inicio del sueño MOR parece no variar mucho entre los diferentes tratamientos, pero si se mide a partir del primer SOL que aconteció en el registro, es posible observar una disminución en el grupo de anfetamina comparado con el grupo control, lo cual, aunado al incremento en vigilia, parecería estar indicando una baja susceptibilidad del sistema al sueño lento con el consecuente predominio de frecuencias rápidas. En contraste, el grupo tratado con lidocaína muestra una diferencia todavía mayor con el grupo de anfetamina que con el grupo de salina ($p<0.08$).

V.4.4. *Comparación entre actividad motora y vigilia.*

En la figura 19 se muestran las curvas tanto del tiempo total de movimiento, para evaluar actividad motora, como del tiempo de vigilia en el grupo tratado con anfetamina a lo largo de las cuatro horas de registro, y en donde los datos se

encuentran divididos en segmentos de 15 minutos. El propósito de esta gráfica fue describir la evolución de cada conducta a lo largo del experimento, teniendo en cuenta que ambos registros se llevaron a cabo en los mismos animales y de manera simultánea. En esta figura se puede observar que mientras la gráfica de movimiento comienza elevada para posteriormente decaer hasta prácticamente la inmovilidad (al igual que los otros grupos, datos mostrados en la figura 15), la gráfica de vigilia igualmente comienza elevada para decaer pero se mantiene por encima de la curva de movimiento, lo cual indica vigilia sin movimiento.

V.4.5. Análisis histológico de los cortes estriatales incluidos en el estudio.

En la figura 20 se muestran los esquemas de cortes coronales representativos del estriado a los niveles anteroposteriores en que se encontraron tanto las puntas de los inyectores en los experimentos de inmunohistoquímica, como las puntas de las cánulas en los experimentos conductuales (de Bregma +1.6mm a +1.0mm). De esta manera, es posible observar que todos los animales fueron inyectados dentro del estriado anterodorsal.

CAPITULO VI

DISCUSION

Los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis de una relación funcional entre los ganglios basales y el núcleo tegmental pedúnculo pontino (NTPP), así como la implicación de los primeros en la regulación de la vigilia. En el primer experimento, fue posible observar una actividad espontánea con variación circádica en el NTPP, la cual fue modificada por una lesión estriatal con ácido kaínico. Este aumento en la expresión basal de c-Fos en el NTPP se hizo más evidente 30 días después de la lesión, mientras que a los 7 días postlesión, cuando la actividad motora estaba aumentada, la expresión de c-Fos permaneció sin cambios importantes. Asimismo, fue posible delimitar los cambios en el grupo de 30 días a dos momentos particulares del ciclo circádico: al final de la fase de oscuridad, cuando el animal termina su ciclo de actividad, y a la quinta hora del inicio de la fase de luz, momento durante en el cual se esperaba encontrar más actividad electroencefalográfica lenta en animales intactos. La expresión diferencial entre los animales control y los animales del grupo 30 días postlesión permite inferir la implicación de los ganglios basales en la desinhibición del NTPP, lo cual a su vez se traducirá en vigilia, función estrechamente ligada con este núcleo del tallo cerebral. Los factores que determinan la expresión diferencial entre estos dos puntos específicos del ciclo circádico deben ser analizados por separado.

En primer lugar, el aumento en la expresión de c-Fos hacia el final de la fase de oscuridad puede estar dependiendo de factores de expresión circádica de la proteína Fos previamente descritos (Grassi Zucconi et al., 1994), debido a que existe un aumento generalizado de c-Fos en diferentes áreas del encéfalo hacia el final de la fase de oscuridad (ver más adelante), tal como fue observado en los animales control. Así, es posible que un estado de desinhibición producido por la lesión favorezca la actividad del núcleo en momentos particulares del ciclo, ocurriendo así hacia el final de la fase de actividad, cuando más activo se encuentra el NTPP debido a su papel en la regulación y manutención de la vigilia. Es importante también hacer notar la falta de correlación con la actividad motora en esta parte del ciclo (Fig. 3), lo no sucedería si la

relación entre los ganglios basales y el NTPP fuera exclusivamente de naturaleza motora. Diversos autores cuyo trabajo está enfocado sobre la circadicidad de los factores de transcripción (Cirelli & Tononi, 2000), defienden la noción de que la expresión de dichos factores se encuentra relacionada por un lado con la acumulación de vigilia a lo largo de la fase de actividad, y por otro con la necesidad cada vez mayor de mantener al cerebro en vigilia, en contraposición con aquellos sistemas que tienden a llevar al cerebro hacia una fase de reposo y actividad electroencefalográfica lenta (capítulo II). Es factible pensar entonces que un estado de desinhibición basal en estos animales lesionados aumente el número de células activas en el NTPP sin modificar su actividad circádica, aún cuando exista mayor sensibilidad en ciertos puntos del ciclo circádico. Esto lleva al segundo punto, el aumento en la expresión de c-Fos hacia la quinta hora de la fase de luz.

Los experimentos que dieron lugar al presente trabajo hicieron evidente un aumento en la vigilia durante la fase de luz, a expensas del sueño de ondas lentas, 30 días después de la lesión estriatal, aunado a un aumento en el número de episodios de vigilia y una disminución en la duración de éstos (Mena-Segovia et al., 2002a). De esta manera, se planteó la hipótesis de que podría existir una estructura que por un lado estuviera relacionada con la vigilia y por otro que mantuviera una relación estrecha con los ganglios basales, y en la cual se manifestaran los cambios previamente descritos. Así, los resultados que aquí se presentan satisfacen ambas condiciones para el NTPP, el cual refleja los cambios previamente reportados en vigilia. Incluso, el aumento de tipo gradual que se observa en la vigilia al momento de hacer los registros ECoG, es observado también en la expresión de c-Fos en el NTPP a las 13 horas si se comparan los valores del grupo de 7 días contra los grupos control y 30 días. En conclusión, los datos aquí presentados apoyan la correlación entre la vigilia y el aumento en la expresión de c-Fos, fortaleciendo asimismo la hipótesis de la desinhibición, sustentada ésta en el hallazgo del incremento de la actividad del NTPP en un momento en el cual debería disminuir dada la influencia de los elementos que mantienen un control inhibitorio sobre este núcleo (capítulo II). Es entonces evidente que los ganglios basales juegan un papel importante en el control inhibitorio del NTPP,

y que la disfunción de los primeros se traduce en un cambio en la fisiología del segundo.

En el segundo experimento observamos que la estimulación dopaminérgica estriatal conlleva tanto a un aumento en la vigilia como a un incremento en la expresión de c-Fos en el NTPP, y que si bien dicha estimulación produce también un aumento en la conducta motora, ésta sólo se mantiene durante los primeros 45 minutos después de la estimulación, en comparación con la vigilia, cuyo efecto se prolonga por al menos 4 horas. Aunado al efecto estimulador de la vigilia observamos la consecuente disminución en SOL, mientras que el sueño MOR no presentó cambios importantes. Es importante remarcar, sin embargo, que existió una menor latencia para MOR a partir del SOL después del tratamiento con anfetamina. Considerando la fisiología del NTPP, este hallazgo apoya el planteamiento de la activación de una estructura relacionada con los ritmos electroencefalográficos rápidos y que en consecuencia inhibe a los ritmos lentos, tal como es el caso del NTPP. A diferencia del experimento anterior, en el cual se midió la expresión basal de c-Fos en el NTPP y su posterior cambio debido a una lesión estriatal a largo plazo, en este experimento se buscó una relación más directa entre la manipulación del estriado y su repercusión inmediata tanto a nivel de la actividad del NTPP como a nivel conductual. El mecanismo propuesto por el cual esto ocurre, sin embargo, sería el mismo: la desinhibición de la actividad del NTPP como consecuencia de la suspensión parcial del control inhibitorio de los núcleos de salida de los ganglios basales. Más adelante se discutirá sobre los cambios de actividad de los núcleos que conforman los ganglios basales que ocurren como consecuencia de la estimulación dopaminérgica del estriado.

Sustento del acercamiento inmunohistoquímico y los factores de transcripción

Los genes tempranos fueron inicialmente descritos como factores de transcripción encargados de regular la expresión de los genes tardíos. Dentro de la diversidad que existe, éstos se encuentran organizados en diversas familias, entre ellas la familia Fos y la familia Jun. En el sistema nervioso, estos genes tienen una

importante función como reguladores de la respuesta de las células nerviosas, específicamente, en la respuesta de neuronas postmitóticas ante la estimulación transináptica. La activación funcional de las neuronas, desencadenada por señales de membrana, acciona una serie de eventos bioquímicos que involucran a la expresión genética, la cual es mediada por la activación de genes tempranos. Así, han sido propuestos como mediadores de la respuesta a largo plazo de la neurona ante estímulos externos (Sheng & Greenberg, 1990).

La utilización de c-Fos como marcador de actividad neuronal ha sido ampliamente reconocida en una diversidad de acercamientos que reflejan el funcionamiento de determinado conjunto neuronal, que abarcan desde las oscilaciones basales de actividad de determinado núcleo, la inducción mediante estímulos agudos o crónicos, y la correlación con respuestas conductuales (Herrera & Robertson, 1996). Incluso, ha sido reportada tanto la inducción crónica de c-Fos en diferentes estructuras cerebrales relacionadas con los ganglios basales (Rodríguez et al., 2001; Westin et al., 2001) como la expresión cortical de c-Fos como consecuencia de la activación estriatal (Steiner & Kitai, 2000; Steiner & Kitai, 2001).

De interés particular para el presente trabajo son los datos publicados que reportan una variación circádica de la expresión de genes tempranos en diversas regiones del cerebro. Por un lado, Merchant y cols. (Merchant-Nancy et al., 1992) reportan una ciclicidad en la expresión de c-Fos en ciertas células del tallo cerebral denominadas *REM-ON* como indicadores de actividad neuronal; ellos correlacionan la expresión de dicho gen con el incremento de actividad de células generadoras del sueño MOR. Un poco más tarde, Grassi-Zucconi y cols. (Grassi-Zucconi et al., 1993) y Grassi-Zucconi y cols. (Grassi Zucconi et al., 1994) miden específicamente la inducción espontánea de c-Fos, y posteriormente c-Jun y jun B, en seis regiones del cerebro (corteza cerebral, cerebelo, tallo cerebral, diencefalo, hipocampo y estriado) durante diferentes etapas del ciclo circádico de la rata, encontrando una evidente variación a lo largo de 24 horas. A excepción de la expresión de jun B, la cual permanece estable a lo largo del ciclo, se observó una expresión mínima en las primeras horas de la fase oscura (período de actividad de la rata) y un incremento gradual hasta llegar al pico máximo al final de dicha etapa, mientras que en la fase de

luz (reposo de la rata), los niveles se mantenían por debajo del mínimo expresado en la fase oscura. Pompeiano y cols. (Pompeiano et al., 1995) sugieren con base en experimentos previos que la expresión de c-Fos está relacionada con la vigilia per se más que con factores circádicos y propone que en algunas áreas, entre ellas el estriado, la expresión de c-Fos puede estar relacionada con las actividades específicas de esa área como la atención y la memoria. De esta manera, existe suficiente evidencia para considerar la expresión de c-Fos como un indicador confiable de actividad neuronal y que incluso guarda una relación estrecha con los patrones de expresión circádica y las estructuras relacionadas con la vigilia.

Consideraciones anatómicas

Tal como se describe en el primer capítulo, en el NTPP existen varias poblaciones celulares que presumiblemente mantienen una relación funcional entre ellas. La población colinérgica, descrita como grupo colinérgico 5 (Mesulam et al., 1983), ha sido la más estudiada tanto a nivel anatómico e histológico, como en cuanto a sus implicaciones funcionales, particularmente en su relación con la actividad motora y los estados de vigilancia. Sin embargo, aún cuando suele considerarse al NTPP únicamente como un núcleo colinérgico, existen otras poblaciones celulares que hasta hace relativamente poco tiempo no habían sido tomadas en cuenta. Entre ellas se encuentran las células GABAérgicas, que funcionan como interneuronas, las células peptidérgicas y, principalmente, las células glutamatérgicas (Clements & Grant, 1990).

Las proyecciones provenientes de los ganglios basales al NTPP parten principalmente de la SNR (Noda & Oka, 1986; Scarnati et al., 1987) y en menor grado del GPI (Shink et al., 1997). Asimismo, ha sido descrita una proyección directa del estriado al NTPP (Berendse et al., 1992). La SNR proyecta tanto a la población colinérgica como a la glutamatérgica de dicho núcleo (Grofova & Zhou, 1998), partiendo sus proyecciones de la región lateral, misma área que tiene conexiones con los núcleos ventral anterior y ventral lateral del tálamo (Parent, 1990). Los primeros trabajos que se realizaron en torno a la funcionalidad de las conexiones entre los ganglios basales y el NTPP fueron los experimentos de García-Rill en los cuales se

estimularon las áreas del NTPP que reciben inervación nigral en animales intactos y se observó un aumento en la locomoción (Garcia-Rill, 1986; Garcia-Rill et al., 1987; Garcia-Rill et al., 1990). El papel del NTPP entonces quedó parcialmente definido como un área motora intermedia que servía de interfase entre los ganglios basales y la médula espinal. Casi de forma paralela surgió la evidencia de la participación del mismo núcleo en la activación talámica y en los cambios intrínsecos previos a la desincronización electroencefalográfica (el Mansari et al., 1989; Steriade et al., 1982). A raíz de estos datos surgieron especulaciones acerca de la función dual del NTPP. Algunos autores llegaron a dividirlo en dos porciones de acuerdo con su citoquímica y funcionalidad, llamando así a la población colinérgica involucrada en la actividad rápida encefalográfica como propiamente NTPP, mientras que a la población no colinérgica involucrada en la respuesta de locomoción inducida la denominaron área mesencefálica extrapiramidal (AME) (Rye et al., 1987; Lee et al., 1988). Esta última, sin embargo, quedó definida de acuerdo con la topografía de las proyecciones provenientes de los ganglios basales, aún cuando trabajos posteriores demostraron la doble inervación de la SNR tanto sobre la población colinérgica como sobre la glutamatérgica (Grofova & Zhou, 1998) así como la funcionalidad de estas proyecciones en términos de inhibición GABAérgica nigral sobre la actividad espontánea de dicho núcleo (Kang & Kitai, 1990; Granata & Kitai, 1991), razones por las cuales dicha división funcional del NTPP no ha sido totalmente aceptada. En un trabajo posterior, Rye y cols. (Rye, 1997) volvieron a presentar este mismo argumento, sin embargo, es importante notar que al área denominada AME la sitúan en el tegmento en relación medial con respecto a la población colinérgica del NTPP, mientras que las células glutamatérgicas no se encuentran delimitadas a esta zona, sino, al contrario, repartidas dentro y alrededor del núcleo. Otro elemento digno de considerarse es la localización del electrodo que utilizó García-Rill y cols. (Garcia-Rill et al., 1987) para estimular locomoción en el NTPP: éste se situó dentro de la población colinérgica.

De esta manera, existen evidencias en contra de la delimitación del NTPP propuesta por el grupo de Rye. Más allá de considerarse un área definida podríamos argumentar la cantidad de datos inconsistentes acerca de su demarcación. Para ello

hemos revisado tres fuentes principales de mapas de la región pontina en el tallo cerebral, cada una de ellas respetada por la precisión y el extenso trabajo que ha representado definir un patrón neuroanatómico confiable. Así, podemos observar que el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1986) muestra a un NTPP pequeño y no contempla las dos porciones principales, *pars compacta* y *pars dissipata*, además de que omite una serie de núcleos pequeños que guardan relación anatómica estrecha con el núcleo en cuestión. En la localización que propone el grupo de Rye (Rye et al., 1987), si bien más precisa que la anterior, este núcleo se separa en dos poblaciones neuroquímicas, más allá del arreglo celular. Estos trabajos, si bien complejos en cuanto al mapeo que se realiza, son ya obsoletos debido a la cantidad de información que ha aparecido ampliando los conocimientos que se tienen de esta región. Según los esquemas de Paxinos y de Rye y cols., todo lo que no queda dentro de los núcleos definidos por ellos pertenece al campo central tegmental, restando importancia a la diversidad de conexiones y propiedades electrofisiológicas que pudieran tener las células que ahí se localizan. Finalmente, una descripción más proviene de Jones y cols. (Jones, 1995), la cual se acerca más a la concepción actual de dicha zona; ésta contempla una localización anatómica semejante a la encontrada en los experimentos aquí presentados. Sin embargo, la descripción no es completa; los cortes presentados presentan una gran separación entre ellos lo que es poco útil en un sitio anatómico en el cual los núcleos son muy pequeños.

Los datos que se han presentado como resultado de nuestros experimentos hacen evidente una población celular que se está activando en respuesta a diferentes manipulaciones en el estriado. Esta población, que fue parcialmente descartada como colinérgica, es de naturaleza glutamatérgica y se encuentra ubicada en situación dorsal a la población colinérgica a lo largo de todos los niveles anteroposteriores en los cuales se hace presente. Por esta razón, es posible descartar de entrada que se trate del AME previamente descrita, cuya situación es medial con respecto a las células colinérgicas. Muchos autores ya mencionados consideran a los límites de la población colinérgica como los límites del NTPP, y esto hasta cierto punto se ha mantenido vigente. Trabajos anteriores, sin embargo, presentan datos que muestran células no colinérgicas pertenecientes al NTPP en situación dorsal a las células

colinérgicas. Como ejemplos están los trabajos de Clements (Clements & Grant, 1990), quien demuestra la presencia de células glutamatérgicas en el NTPP cuyo límite anatómico no coincide con el de las células marcadas para NADPH (que coexpresan acetilcolina), y de Semba y cols. (Semba et al., 1990), quien realiza un trazado de las proyecciones del NTPP aunado al marcaje de las células colinérgicas y observa que algunas células de proyección que no se tiñeron para ChAT se encuentran dorsales a la población que sí lo hizo. Aún considerando la posibilidad de que no se tratara del NTPP, no existe ningún núcleo definido todavía que pudiera tener esas características anatómicas. En los cortes más posteriores es posible ubicar al núcleo cuneiforme adyacente a la porción dorsal del NTPP; sin embargo, éste núcleo no está presente en los cortes anteriores y mediales que corresponden con nuestros conteos celulares. Es importante notar la manera en cómo la situación anatómica tanto de la población colinérgica como de la población glutamatérgica positiva para c-Fos va cambiando en sentido anteroposterior: de ser lateral y ventral en los cortes anteriores, se vuelve medial y dorsal en los cortes posteriores, y sin embargo, la relación entre ambas poblaciones se mantiene constante, razón por la cual se sostiene la teoría de que se trata del mismo núcleo.

La población glutamatérgica como elemento decisivo en la activación talámica

La población glutamatérgica del NTPP ha sido considerada como un elemento importante de este núcleo por su posible papel sobre las funciones de las células colinérgicas por un lado, y por otro, sobre la activación talámica. Dicha población fue descrita inicialmente por Clements y Grant en 1990 como un grupo de células glutamatérgicas localizadas dentro y adyacentes a la población colinérgica del NTPP, que incluso en algunos casos coexpresaban acetilcolina además de glutamato (Lavoie & Parent, 1994). La población glutamatérgica, además de las proyecciones descendentes hacia las motoneuronas (Liu et al., 1995), mantiene proyecciones ascendentes, al igual que la población colinérgica, no sólo a la SNC (Scarnati et al., 1986), sino también a distintos núcleos del tálamo, particularmente los núcleos intralaminares, el núcleo ventromedial y el núcleo reticular del tálamo (Woolf &

Butcher, 1986; Scarnati et al., 1987). Además, se ha determinado que las mismas neuronas que proyectan a la SNC emiten colaterales hacia el tálamo y otras proyecciones descendentes hacia el tallo cerebral (Takakusaki et al., 1996).

El papel que se le ha adjudicado a la proyección glutamatérgica al tálamo no ha sido plenamente establecido. En 1982, Steriade y cols. (Steriade et al., 1982) reportaron que las células glutamatérgicas mesencefálicas con proyecciones a los núcleos intralaminares del tálamo, en ese entonces aún no bien definidas en cuanto al núcleo al cual pertenecían, aumentan su frecuencia de disparo aproximadamente 15 segundos antes de los signos más precoces de activación electroencefalográfica y eventos motores asociados a despertamiento conductual, precediendo de esta manera tanto a los estados de vigilia como de sueño MOR. No es difícil pensar en la posibilidad de que dichos grupos celulares glutamatérgicos pertenezcan al NTPP, cuya descripción sucedería hasta 1990. En 1989 y 1990, El Mansari y cols. (el Mansari et al., 1989; el Mansari et al., 1990) reportan la presencia de un grupo de neuronas dentro del NTPP con alta frecuencia de disparo durante el sueño MOR y que no son colinérgicas, debido a que no modifican su actividad ante la aplicación de carbacol, lo cual sí sucede con las neuronas colinérgicas. En un estudio reciente, Kodama y Honda (Kodama & Honda, 1999), que miden tanto la liberación de acetilcolina como de glutamato a partir de las células del NTPP, observan que el glutamato aumenta durante la vigilia, mientras que durante el SOL su liberación está significativamente disminuida. De esta forma, este conjunto de datos apoya la idea de que la población glutamatérgica juega un papel importante en la activación talámica inespecífica. Esto, por otro lado, no se contrapone a la evidencia de la activación colinérgica de las células tálamo-corticales. Al igual que como ocurre en la SNC, en la cual se observa un aumento tanto en acetilcolina como en glutamato posterior a la estimulación del NTPP, un mecanismo similar podría estar activando al tálamo y por consiguiente a la corteza cerebral.

Adicionalmente, el glutamato también participa en la activación de las células colinérgicas dentro del NTPP. Recientemente ha surgido una línea de investigación en el grupo de Datta y cols. (Datta & Siwek, 1997) quienes han realizado una serie de experimentos inyectando diferentes dosis de glutamato en el NTPP. Dichos autores

reportan, primero en gatos y posteriormente en ratas, que el glutamato en el NTPP produce, dependiendo de la dosis en que fue administrado, los estados de sueño MOR, con una dosis baja, o vigilia, con las dosis más altas. En un trabajo posterior precisan que la acción del glutamato se debe a la activación de los receptores tipo NMDA (Datta et al., 2001). Así, estos autores remarcan la importancia de la activación glutamatérgica del NTPP como un factor predisponente a la activación cortical.

Con los trabajos principalmente de Datta y cols. (Datta & Siwek, 1997; Datta et al., 2001) se fortalece la relación estrecha entre el glutamato y la activación cortical. Los mismos autores señalan dos posibilidades mediante las cuales el glutamato pudiera estar regulando la activación cortical: la primera contempla la aferencia glutamatérgica por parte de la formación reticular pontina sobre el NTPP, mientras que la segunda destaca la posibilidad de la regulación de las células glutamatérgicas del mismo núcleo sobre la población colinérgica contigua. En interesante considerar esta última posibilidad desde el punto de vista de los resultados que aquí se presentan sobre el conteo de células positivas a c-Fos. La población glutamatérgica podría estar desempeñando un papel importante como activador de la población colinérgica del núcleo o como responsable de la activación del tálamo y por consiguiente de la desincronización cortical.

Dentro de las células que se encontraron activas en nuestras condiciones experimentales, si bien predominaban las de estirpe glutamatérgica, fueron aparentes también algunas de naturaleza colinérgica. Esto iría de acuerdo con los datos en los que se reporta un mayor número de terminales GABAérgicas nigrales haciendo sinapsis con los cuerpos de neuronas glutamatérgicas y menor número en neuronas colinérgicas (Grofova & Zhou, 1998). Es el papel de las células glutamatérgicas lo que hace falta definir, si se trata de una función únicamente regulatoria sobre los otros tipos celulares, particularmente las colinérgicas, o si tienen una función independiente de activación talámica. Incluso, es posible que pudieran estar desempeñando ambas funciones. La redundancia de la estimulación glutamatérgica, tanto sobre el NTPP como sobre el tálamo, permitiría asegurar la función del sistema de activación cortical. Esto podría además sustentarse en los distintos efectos que podría tener cada neurotransmisor sobre los receptores de las células talámicas, lo cual a su vez se

manifestaría en diferentes efectos corticales. Por otro lado, cada población celular del NTPP puede estar bajo el control de distintas aferencias; si esto ha sido posible definirlo en torno a las proyecciones que recibe el NTPP de la SNR, es posible especular sobre la posibilidad de que lo mismo suceda con los diversos núcleos que controlan la actividad de la población colinérgica.

Regulación dopaminérgica de la vigilia y su implicación en la modulación estriatal

Las implicaciones de la dopamina en la regulación de la vigilia no son nuevas y han sido ampliamente estudiadas. El papel de las catecolaminas en el ciclo sueño vigilia ha sido tomado en cuenta por su capacidad de aumentar la actividad eléctrica cerebral así como por la correlación de los núcleos catecolaminérgicos con los diferentes estados de activación cortical (Jouvet, 1962; Jouvet, 1969). Aún cuando diferentes reportes concluyeron la falta de respuesta de las neuronas de la SNC ante las diferentes etapas del ciclo sueño vigilia (Miller et al., 1981; Miller et al., 1983; Steinfels et al., 1981; Steinfels et al., 1983; Trulson et al., 1981; Trulson, 1985), los experimentos farmacológicos de administración sistémica de agentes dopaminérgicos mostraron que éstos eran capaces de modificar los niveles de vigilia (Weissman & Koe, 1965). De esta manera, fármacos como la L-DOPA, la apomorfina o la anfetamina, al igual que los agonistas de los receptores dopaminérgicos D1, estimulan la vigilia (Kadzielawa & Widy-Tyszkiewicz, 1970; Thut & Rech, 1972; Corsini et al., 1977; Ongini et al., 1985; Ongini & Caporali, 1987), mientras que los bloqueadores correspondientes son capaces de producir sedación y somnolencia (Bo et al., 1988; Kropf & Kuschinsky, 1991).

Los efectos de la administración de anfetamina, al igual que otros fármacos estimuladores (cocaína y nicotina), se centran en la liberación de dopamina recién sintetizada en el estriado (Besson et al., 1971; Giorguieff-Chesselet et al., 1979; Di Chiara & Imperato, 1988). De hecho, se ha determinado que el estriado es un blanco de todos estos fármacos estimuladores al administrarlos sistémicamente, lo cual se ha observado mediante la expresión de c-Fos (Lin et al., 1996). Al ser administrada la

anfetamina de manera intraestriatal, como fue el caso de nuestros experimentos, la activación de los receptores dopaminérgicos por la dopamina liberada llevó hipotéticamente a la activación de la vía directa de proyección estriatal, dependientes principalmente de receptores D1, y a la inactivación de la vía indirecta, ligada a receptores D2. La activación de la vía directa produce una inhibición de la sustancia nigra reticulata y el globo pálido interno (Gulley et al., 1999). La inactivación de la vía indirecta produce un aumento en la actividad del GPE, el cual inhibe al NST, quien tiene una proyección glutamatérgica hacia la SNR y el GPI (ver Fig. 1). Esto llevaría a la inhibición de la SNR y el GPI por parte de la vía directa, y a la falta de estimulación por parte de la vía indirecta, traduciéndose en su inactivación. En consecuencia, al mantener estos núcleos un control GABAérgico inhibitorio sobre el NTPP, este último queda desinhibido y puede expresar sus funciones.

La posibilidad de que haya existido una difusión de la anfetamina intraestriatal hacia la corteza cerebral no puede ser totalmente descartada. Sin embargo, la evidencia indirecta sugiere que el efecto observado se debe únicamente a estimulación estriatal. Parte de esta evidencia recae en experimentos anteriores que consideran el papel del estriado en la activación cortical (Mena-Segovia et al., 2002a). Además, ha sido observado, en un modelo de narcolepsia, un aumento en la liberación de dopamina en el estriado después de la administración de inhibidores de la recaptura de dopamina, lo cual se correlacionó con despertamiento electroencefalográfico (Kanbayashi et al., 2000).

Este trabajo aporta evidencias claras de la participación del sistema dopaminérgico mesoestriatal sobre la activación cortical relacionada con la vigilia. Existen otros trabajos que apoyan nuestros resultados en términos del despertamiento conductual (Timmerman & Abercrombie, 1996) así como la misma activación cortical (Steiner & Kitai, 2000; Steiner & Kitai, 2001). El efecto de la anfetamina, si bien recae principalmente sobre la liberación de dopamina recién sintetizada, también interactúa con otros sistemas de neurotransmisores, tal como el glutamatérgico (Del Arco et al., 1999). Sin embargo, nuevos datos preliminares apoyan la teoría de la participación de los receptores D1, y por tanto la vía directa, en la activación estriatal que se traduce en desinhibición del NTPP (Mena-Segovia et al., 2002b). En conjunto, es posible

remarcar la importancia del papel de la dopamina en la regulación de la vigilia y la activación conductual, siendo el estriado un elemento crucial de este sistema.

Corolario

Los resultados de los experimentos presentados en esta tesis sustentan la hipótesis de la implicación del estriado en la regulación de la vigilia y la activación cortical. Son de similar importancia los hallazgos que revelan una independencia entre la activación estriatal ligada a la conducta motora y la capacidad del estriado para modificar la actividad cortical inespecífica, así como la funcionalidad dual del NTPP también en términos motores y de vigilia. El hecho de que ambos núcleos compartan dicha dualidad sugiere una interdependencia entre ambas funciones. Hallazgos como el de que la activación cortical de la amfetamina dure más que la activación motora, o el de que en animales lesionados las manifestaciones en la vigilia sucedan cuando la hiperactividad ha disminuido, podrían sugerir que el efecto sobre la vigilia prevalece sobre el efecto motor.

Los ganglios basales han sido relacionados con una serie de funciones cognitivas más allá de las funciones motoras, tales como la atención, la percepción temporal, el aprendizaje y la memoria. Además, existe la evidencia del deterioro cognitivo que sufren los pacientes con enfermedades neurodegenerativas de los ganglios basales. Otras patologías, tales como el trastorno obsesivo-compulsivo, el autismo, la esquizofrenia y el síndrome de déficit de atención e hiperactividad, han sido también relacionadas con la disfunción estriatal. Es posible interpretar entonces a la activación cortical de origen estriatal como un factor común al resto de sus funciones, siendo así un elemento indispensable para alertar al cerebro y permitirle ejecutar estas funciones de forma integrativa.

REFERENCIAS

- Albin, R. L., Koeppe, R. A., Chervin, R. D., Consens, F. B., Wernette, K., Frey, K. A. & Aldrich, M. S. 2000. Decreased striatal dopaminergic innervation in REM sleep behavior disorder. *Neurology*, **55**, 1410-2.
- Alexander, G. E. & Crutcher, M. D. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, **13**, 266-71.
- Autret, A., Lucas, B., Henry, F., Saudeau, D. & de Toffol, B. 1994. Influence du sommeil sur les mouvements anormaux de la veille. *Neurophysiologie Clinique*, **24**, 218-26.
- Berendse, H. W., Groenewegen, H. J. & Lohman, A. H. 1992. Compartmental distribution of ventral striatal neurons projecting to the mesencephalon in the rat. *Journal of Neuroscience*, **12**, 2079-103.
- Besson, M., Cheramy, A., Feltz, P. & Glowinski, J. 1971. Dopamine: spontaneous and drug-induced release from the caudate nucleus in the cat. *Brain Res*, **32**, 407-24.
- Bo, P., Ongini, E., Giorgetti, A. & Savoldi, F. 1988. Synchronization of the EEG and sedation induced by neuroleptics depend upon blockade of both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology*, **27**, 799-805.
- Canales, J. J. & Iversen, S. D. 1998. Behavioural topography in the striatum: differential effects of quinpirole and D-amphetamine microinjections. *Eur J Pharmacol*, **362**, 111-9.
- Cirelli, C. & Tononi, G. 2000. On the functional significance of c-fos induction during the sleep- waking cycle. *Sleep*, **23**, 453-69.
- Clarke, P. B., Hommer, D. W., Pert, A. & Skirboll, L. R. 1987. Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine

- nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience*, **23**, 1011-9.
- Clements, J. R. & Grant, S. 1990. Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculo pontine nuclei in the rat. *Neurosci Lett*, **120**, 70-3.
- Corsi-Cabrera, M., Grinberg-Zylberbaum, J. & Arditti, L. S. 1975. Caudate nucleus lesion selectively increases paradoxical sleep episodes in the rat. *Physiology & Behavior*, **14**, 7-11.
- Corsini, G. U., Del Zompo, M., Manconi, S., Piccardi, M. P., Onali, P. L. & Mangoni, A. 1977. Evidence for dopamine receptors in the human brain mediating sedation and sleep. *Life Sci*, **20**, 1613-8.
- Chapman, C. A., Yeomans, J. S., Blaha, C. D. & Blackburn, J. R. 1997. Increased striatal dopamine efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental pedunculo pontine nucleus. *Neuroscience*, **76**, 177-86.
- Chokroverty, S. 1996. Sleep and neurodegenerative neurologic disorders. In: *Sleep disorders II*, pp. 807-26.
- Datta, S., Patterson, E. H. & Spoley, E. E. 2001. Excitation of the pedunculo pontine tegmental NMDA receptors induces wakefulness and cortical activation in the rat. *J Neurosci Res*, **66**, 109-16.
- Datta, S. & Siwek, D. F. 1997. Excitation of the brain stem pedunculo pontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *Journal of Neurophysiology*, **77**, 2975-88.
- Del Arco, A., Gonzalez-Mora, J. L., Armas, V. R. & Mora, F. 1999. Amphetamine increases the extracellular concentration of glutamate in striatum of the awake rat: involvement of high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacology*, **38**, 943-54.
- Deniau, J. M. & Chevalier, G. 1985. Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence on

- thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Brain Research*, **334**, 227-33.
- Di Chiara, G. & Imperato, A. 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5274-8.
- Di Chiara, G., Porceddu, M. L., Morelli, M., Mulas, M. L. & Gessa, G. L. 1979. Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus of the rat. *Brain Research*, **176**, 273-84.
- el Mansari, M., Sakai, K. & Jouvet, M. 1989. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp Brain Res*, **76**, 519-29.
- el Mansari, M., Sakai, K. & Jouvet, M. 1990. Responses of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons to carbachol microinjections in freely moving cats. *Exp Brain Res*, **83**, 115-23.
- Farooqui, S. M., Brock, J. W. & Zhou, J. 1996. Changes in monoamines and their metabolite concentrations in REM sleep-deprived rat forebrain nuclei. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, **54**, 385-91.
- Fibiger, D. 1978. Kainic acid lesion of the striatum: a pharmacological and behavioral model of Huntington's disease. In: *Kainic acid as a tool in neurobiology* (Ed. by McGeer, E. G., Onley, J. W. & McGeer, P. L.), pp. 161-76. New York: Raven.
- Fish, D. R., Sawyers, D., Allen, P. J., Blackie, J. D., Lees, A. J. & Marsden, C. D. 1991. The effect of sleep on the dyskinetic movements of Parkinson's disease, Gilles de la Tourette syndrome, Huntington's disease, and torsion dystonia. *Archives of Neurology*, **48**, 210-4.
- Garcia-Rill, E. 1986. The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Research*, **396**, 47-63.

- Garcia-Rill, E., Houser, C. R., Skinner, R. D., Smith, W. & Woodward, D. J. 1987. Locomotion-inducing sites in the vicinity of the pedunculo-pontine nucleus. *Brain Research Bulletin*, **18**, 731-8.
- Garcia-Rill, E., Kinjo, N., Atsuta, Y., Ishikawa, Y., Webber, M. & Skinner, R. D. 1990. Posterior midbrain-induced locomotion. *Brain Research Bulletin*, **24**, 499-508.
- Gerfen, C. R. 2000. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci*, **23**, S64-70.
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., Jr. & Sibley, D. R. 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, **250**, 1429-32.
- Gessa, G. L., Porceddu, M. L., Collu, M., Mereu, G., Serra, M., Ongini, E. & Biggio, G. 1985. Sedation and sleep induced by high doses of apomorphine after blockade of D-1 receptors by SCH 23390. *Eur J Pharmacol*, **109**, 269-74.
- Giordano, M., Hagenmeyer-Houser, S. H. & Sanberg, P. R. 1988. Intraparenchymal fetal striatal transplants and recovery in kainic acid lesioned rats. *Brain Res*, **446**, 183-8.
- Giorguieff-Chesselet, M. F., Kemel, M. L., Wandscheer, D. & Glowinski, J. 1979. Regulation of dopamine release by presynaptic nicotinic receptors in rat striatal slices: effect of nicotine in a low concentration. *Life Sci*, **25**, 1257-62.
- Gould, E., Woolf, N. J. & Butcher, L. L. 1989. Cholinergic projections to the substantia nigra from the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei. *Neuroscience*, **28**, 611-23.
- Granata, A. R. & Kitai, S. T. 1991. Inhibitory substantia nigra inputs to the pedunculo-pontine neurons. *Experimental Brain Research*, **86**, 459-66.
- Grassi Zucconi, G., Menegazzi, M., Carcereri De Prati, A., Vescia, S., Ranucci, G. & Bentivoglio, M. 1994. Different programs of gene expression are

associated with different phases of the 24h and sleep-wake cycles.

Chronobiologia, **21**, 93-7.

Grassi-Zucconi, G., Menegazzi, M., De Prati, A. C., Bassetti, A., Montagnese, P., Mandile, P., Cosi, C. & Bentivoglio, M. 1993. c-fos mRNA is spontaneously induced in the rat brain during the activity period of the circadian cycle. *Eur J Neurosci*, **5**, 1071-8.

Graybiel, A. M. 1998. The basal ganglia and chunking of action repertoires.

Neurobiology of Learning & Memory, **70**, 119-36.

Graybiel, A. N. & Ragsdale, C. W. 1983. Biochemical anatomy of the striatum. In:

Chemical neuroanatomy (Ed. by Emson, P. C.), pp. 427-504. New York:

Raven Press.

Groenewegen, H. J., Berendse, H. W. & Haber, S. N. 1993. Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents.

Neuroscience, **57**, 113-42.

Grofova, I. & Zhou, M. 1998. Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol*, **395**, 359-79.

Gulley, J. M., Kuwajima, M., Mayhill, E. & Rebec, G. V. 1999. Behavior-related changes in the activity of substantia nigra pars reticulata neurons in freely moving rats. *Brain Res*, **845**, 68-76.

Hallanger, A. E., Levey, A. I., Lee, H. J., Rye, D. B. & Wainer, B. H. 1987. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol*, **262**, 105-24.

Hars, B. 1999. Endogenous nitric oxide in the rat pons promotes sleep. *Brain Research*, **816**, 209-19.

Hauber, W. 1998. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress in Neurobiology*, **56**, 507-40.

- Heimer, L., Zahm, D. S. & Alheid, G. F. 1995. Basal ganglia. In: *The rat nervous system* (Ed. by Paxinos, G.), pp. 579-628: Academic Press.
- Hernandez-Lopez, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A. & Galarraga, E. 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci*, **17**, 3334-42.
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H. & Surmeier, D. J. 2000. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP3-calcineurin- signaling cascade. *J Neurosci*, **20**, 8987-95.
- Herrera, D. G. & Robertson, H. A. 1996. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*, **50**, 83-107.
- Hobson, J. A. 1999. Sleep and dreaming. In: *Fundamental neuroscience* (Ed. by Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L. & Squire, L. R.), pp. 1207-27. San Diego, CA: Academic Press.
- Hobson, J. A., Lydic, R. & Baghdoyan, A. 1986. Evolving concepts of sleep cycle generation: From brain centers to neuronal populations. *The behavioral and brain sciences*, **9**, 371-448.
- Inglis, W. L. & Winn, P. 1995. The pedunculo-pontine tegmental nucleus: where the striatum meets the reticular formation. *Progress in Neurobiology*, **47**, 1-29.
- Jones, B. E. 1995. Reticular formation: cytoarchitecture, transmitters, and projections. In: *The rat nervous system* (Ed. by Paxinos, G.), pp. 155-171: Academic Press.
- Jouvet, M. 1962. Recherches sur les structures nerveuses et les mecanismes responsables des differentes phases du sommeil physiologique. *Arch Ital Biol*, **100**, 125-206.
- Jouvet, M. 1969. Biogenic amines and the states of sleep. *Science*, **163**, 32-41.

- Kadzielawa, K. & Widy-Tyszkiewicz, E. 1970. Electroencephalographic analysis of the central action of dihydroxyphenylalanine. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **28**, 259-265.
- Kanbayashi, T., Honda, K., Kodama, T., Mignot, E. & Nishino, S. 2000. Implication of dopaminergic mechanisms in the wake-promoting effects of amphetamine: a study of D- and L-derivatives in canine narcolepsy. *Neuroscience*, **99**, 651-9.
- Kang, Y. & Kitai, S. T. 1990. Electrophysiological properties of pedunculo pontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Research*, **535**, 79-95.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J. & Emson, P. C. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization [published erratum appears in Trends Neurosci 1996 Apr;19(4):143]. *Trends in Neurosciences*, **18**, 527-35.
- Kayama, Y. & Koyama, Y. 1998. Brainstem neural mechanisms of sleep and wakefulness. *European Urology*, **33 Suppl 3**, 12-5.
- Kimura, H., McGeer, P. L., Peng, J. H. & McGeer, E. G. 1981. The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, **200**, 151-201.
- Kodama, T. & Honda, Y. 1999. Acetylcholine and glutamate release during sleep-wakefulness in the pedunculo pontine tegmental nucleus and norepinephrine changes regulated by nitric oxide. *Psychiatry Clin Neurosci*, **53**, 109-11.
- Kropf, W. & Kuschinsky, K. 1991. Electroencephalographic correlates of the sedative effects of dopamine agonists presumably acting on autoreceptors. *Neuropharmacology*, **30**, 953-60.
- Kropf, W. & Kuschinsky, K. 1993. Effects of stimulation of dopamine D1 receptors on the cortical EEG in rats: different influences by a blockade of D2 receptors

and by an activation of putative dopamine autoreceptors.

Neuropharmacology, **32**, 493-500.

Lavoie, B. & Parent, A. 1994. Pedunculo-pontine nucleus in the squirrel monkey: projections to the basal ganglia as revealed by anterograde tract-tracing methods. *Journal of Comparative Neurology*, **344**, 210-31.

Lee, H. J., Rye, D. B., Hallanger, A. E., Levey, A. I. & Wainer, B. H. 1988. Cholinergic vs. noncholinergic efferents from the mesopontine tegmentum to the extrapyramidal motor system nuclei. *J Comp Neurol*, **275**, 469-92.

Lin, J. S., Hou, Y. & Jouvett, M. 1996. Potential brain neuronal targets for amphetamine-, methylphenidate-, and modafinil-induced wakefulness, evidenced by c-fos immunocytochemistry in the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14128-33.

Liu, M. T., Rothstein, J. D., Gershon, M. D. & Kirchgessner, A. L. 1997. Glutamatergic enteric neurons. *J Neurosci*, **17**, 4764-84.

Liu, R. H., Fung, S. J., Reddy, V. K. & Barnes, C. D. 1995. Localization of glutamatergic neurons in the dorsolateral pontine tegmentum projecting to the spinal cord of the cat with a proposed role of glutamate on lumbar motoneuron activity. *Neuroscience*, **64**, 193-208.

Maloney, K. J., Mainville, L. & Jones, B. E. 1999. Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Journal of Neuroscience*, **19**, 3057-72.

Martin, J., Jeste, D. V., Caligiuri, M. P., Patterson, T., Heaton, R. & Ancoli-Israel, S. 2001. Actigraphic estimates of circadian rhythms and sleep/wake in older schizophrenia patients. *Schizophr Res*, **47**, 77-86.

Mena-Segovia, J., Cintra, L., Prospero, G., O. & Giordano, M. 2002a. Changes in sleep-waking cycle after striatal excitotoxic lesions. *Behav Brain Res*, **136**, 475-481.

- Mena-Segovia, J., Terres, M. L. & Giordano, M. 2002b. Striatal D1-dopamine receptors involved in cortical activation as a consequence of PPT and thalamic nuclei disinhibition. In: *2002 Abstract Viewer/ Itinerary Planner* (Ed. by Neuroscience, S. f.). Washington DC: Online.
- Merchant-Nancy, H., Vazquez, J., Aguilar-Roblero, R. & Drucker-Colin, R. 1992. c-fos proto-oncogene changes in relation to REM sleep duration. *Brain Res*, **579**, 342-6.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H. & Levey, A. I. 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*, **10**, 1185-201.
- Miller, J. D., Farber, J., Gatz, P., Roffwarg, H. & German, D. C. 1983. Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and walking in the rat. *Brain Res*, **273**, 133-41.
- Miller, J. D., Sanghera, M. K. & German, D. C. 1981. Mesencephalic dopaminergic unit activity in the behaviorally conditioned rat. *Life Sci*, **29**, 1255-63.
- Mukhida, K., Baker, K. A., Sadi, D. & Mendez, I. 2001. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci*, **21**, 3521-30.
- Murer, M. G., Riquelme, L. A., Tseng, K. Y. & Pazo, J. H. 1997. Substantia nigra pars reticulata single unit activity in normal and 60HDA-lesioned rats: effects of intrastriatal apomorphine and subthalamic lesions. *Synapse*, **27**, 278-93.
- Nakamura, Y., Tokuno, H., Moriizumi, T., Kitao, Y. & Kudo, M. 1989. Monosynaptic nigral inputs to the pedunculopontine tegmental nucleus neurons which send their axons to the medial reticular formation in the medulla oblongata. An electron microscopic study in the cat. *Neuroscience Letters*, **103**, 145-50.
- Nishino, S., Mao, J., Sampathkumaran, R. & Shelton, J. 1998. Increased dopaminergic transmission mediates the wake-promoting effects of CNS stimulants. *Sleep Res Online*, **1**, 49-61.

- Noda, T. & Oka, H. 1986. Distribution and morphology of tegmental neurons receiving nigral inhibitory inputs in the cat: an intracellular HRP study. *Journal of Comparative Neurology*, **244**, 254-66.
- Nomura, S., Mizuno, N. & Sugimoto, T. 1980. Direct projections from the pedunculopontine tegmental nucleus to the subthalamic nucleus in the cat. *Brain Research*, **196**, 223-7.
- Ongini, E. & Caporali, M. G. 1987. Differential effects of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists on EEG activity and behaviour in the rabbit. *Neuropharmacology*, **26**, 355-60.
- Ongini, E., Caporali, M. G. & Massotti, M. 1985. Stimulation of dopamine D-1 receptors by SKF 38393 induces EEG desynchronization and behavioral arousal. *Life Sci*, **37**, 2327-33.
- Parent, A. 1990. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci*, **13**, 254-8.
- Parent, A. & Hazrati, L. N. 1995a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research - Brain Research Reviews*, **20**, 91-127.
- Parent, A. & Hazrati, L. N. 1995b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Research - Brain Research Reviews*, **20**, 128-54.
- Paxinos, G. & Watson, C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pompeiano, M., Cirelli, C., Arrighi, P. & Tononi, G. 1995. c-Fos expression during wakefulness and sleep. *Neurophysiol Clin*, **25**, 329-41.
- Prospero-Garcia, O., Navarro, L., Murillo-Rodriguez, E. & Drucker-Colin, R. 1999. Cellular and molecular changes occurring during REM sleep. In: *Rapid Eye Movement Sleep* (Ed. by Mallick, B. N. & Inoue, S.): Academic Press.

- Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B. & Young, A. B. 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 5733-7.
- Robbins, T. W. 1997. Arousal systems and attentional processes. *Biol Psychol*, **45**, 57-71.
- Rodriguez, J. J., Garcia, D. R., Nakabeppu, Y. & Pickel, V. M. 2001. FosB in rat striatum: normal regional distribution and enhanced expression after 6-month haloperidol administration. *Synapse*, **39**, 122-32.
- Rohrbacher, J., Ichinohe, N. & Kitai, S. T. 2000. Electrophysiological characteristics of substantia nigra neurons in organotypic cultures: spontaneous and evoked activities. *Neuroscience*, **97**, 703-14.
- Rye, D. B. 1997. Contributions of the pedunculopontine region to normal and altered REM sleep. *Sleep*, **20**, 757-88.
- Rye, D. B., Saper, C. B., Lee, H. J. & Wainer, B. H. 1987. Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *Journal of Comparative Neurology*, **259**, 483-528.
- Sanberg, P. R., Hagenmeyer, S. H. & Henault, M. A. 1985. Automated measurement of multivariate locomotor behavior in rodents. *Neurobehavioral Toxicology & Teratology*, **7**, 87-94.
- Scarnati, E., Proia, A., Campana, E. & Pacitti, C. 1986. A microiontophoretic study on the nature of the putative synaptic neurotransmitter involved in the pedunculopontine-substantia nigra pars compacta excitatory pathway of the rat. *Experimental Brain Research*, **62**, 470-8.
- Scarnati, E., Proia, A., Di Loreto, S. & Pacitti, C. 1987. The reciprocal electrophysiological influence between the nucleus tegmenti pedunculopontinus and the substantia nigra in normal and decorticated rats. *Brain Research*, **423**, 116-24.

- Semba, K. & Fibiger, H. C. 1992. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculo pontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, **323**, 387-410.
- Semba, K., Reiner, P. B. & Fibiger, H. C. 1990. Single cholinergic mesopontine tegmental neurons project to both the pontine reticular formation and the thalamus in the rat. *Neuroscience*, **38**, 643-54.
- Sheng, M. & Greenberg, M. E. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, **4**, 477-85.
- Shink, E., Sidibe, M. & Smith, Y. 1997. Efferent connections of the internal globus pallidus in the squirrel monkey: II. Topography and synaptic organization of pallidal efferents to the pedunculo pontine nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, **382**, 348-63.
- Silvestri, R., De Domenico, P., Di Rosa, A. E., Bramanti, P., Serra, S. & Di Perri, R. 1990. The effect of nocturnal physiological sleep on various movement disorders. *Movement Disorders*, **5**, 8-14.
- Silvestri, R., Raffaele, M., De Domenico, P., Tisano, A., Mento, G., Casella, C., Tripoli, M. C., Serra, S. & Di Perri, R. 1995. Sleep features in Tourette's syndrome, neuroacanthocytosis and Huntington's chorea. *Neurophysiologie Clinique*, **25**, 66-77.
- Smith, I. D., Sutton, M. A. & Beninger, R. J. 1997. Rotational bias in intact rats following intrastriatal injections of dopaminergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav*, **58**, 431-41.
- Spann, B. M. & Grofova, I. 1989. Origin of ascending and spinal pathways from the nucleus tegmenti pedunculo pontinus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **283**, 13-27.
- Steckler, T., Inglis, W., Winn, P. & Sahgal, A. 1994. The pedunculo pontine tegmental nucleus: a role in cognitive processes? *Brain Res Brain Res Rev*, **19**, 298-318.

- Steiner, H. & Kitai, S. T. 2000. Regulation of rat cortex function by D1 dopamine receptors in the striatum. *Journal of Neuroscience*, **20**, 5449-60.
- Steiner, H. & Kitai, S. T. 2001. Unilateral striatal dopamine depletion: time-dependent effects on cortical function and behavioural correlates. *Eur J Neurosci*, **14**, 1390-404.
- Steinfels, G. F., Heym, J. & Jacobs, B. L. 1981. Single unit activity of dopaminergic neurons in freely moving cats. *Life Sci*, **29**, 1435-42.
- Steinfels, G. F., Heym, J., Strecker, R. E. & Jacobs, B. L. 1983. Behavioral correlates of dopaminergic unit activity in freely moving cats. *Brain Res*, **258**, 217-28.
- Steininger, T. L., Wainer, B. H., Blakely, R. D. & Rye, D. B. 1997a. Serotonergic dorsal raphe nucleus projections to the cholinergic and noncholinergic neurons of the pedunculopontine tegmental region: a light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, **382**, 302-22.
- Steininger, T. L., Wainer, B. H. & Rye, D. B. 1997b. Ultrastructural study of cholinergic and noncholinergic neurons in the pars compacta of the rat pedunculopontine tegmental nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, **382**, 285-301.
- Steriade, M. 1992. Basic mechanisms of sleep generation. *Neurology*, **42**, 9-17; discussion 18.
- Steriade, M. & McCarley, R. W. 1990. *Brainstem control of wakefulness and sleep*. : Plenum Press.
- Steriade, M., Oakson, G. & Ropert, N. 1982. Firing rates and patterns of midbrain reticular neurons during steady and transitional states of the sleep-waking cycle. *Exp Brain Res*, **46**, 37-51.
- Strecker, R. E., Porkka-Heiskanen, T., Thakkar, M. M., Dauphin, L. & McCarley, R. W. 1998. Serotonin, adenosine & GABA modulate the PPT in the control of vigilance. *Journal of Sleep Research*, **7**, 263.

- Sugimoto, T. & Hattori, T. 1984. Organization and efferent projections of nucleus tegmenti pedunculo pontinus pars compacta with special reference to its cholinergic aspects. *Neuroscience*, **11**, 931-46.
- Sugimoto, T., Mizukawa, K., Hattori, T., Konishi, A., Kaneko, T. & Mizuno, N. 1984. Cholinergic neurons in the nucleus tegmenti pedunculo pontinus pars compacta and the caudoputamen of the rat: a light and electron microscopic immunohistochemical study using a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Neurosci Lett*, **51**, 113-7.
- Sutin, E. L. & Jacobowitz, D. M. 1988. Immunocytochemical localization of peptides and other neurochemicals in the rat laterodorsal tegmental nucleus and adjacent area. *J Comp Neurol*, **270**, 243-70.
- Takakusaki, K., Shiroyama, T., Yamamoto, T. & Kitai, S. T. 1996. Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculo pontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *J Comp Neurol*, **371**, 345-61.
- Thut, P. D. & Rech, R. H. 1972. Effects of L-DOPA on the EEG and brain amines of unrestrained rats. *Exp Neurol*, **35**, 13-29.
- Timmerman, W. & Abercrombie, E. D. 1996. Amphetamine-induced release of dendritic dopamine in substantia nigra pars reticulata: D1-mediated behavioral and electrophysiological effects. *Synapse*, **23**, 280-91.
- Trulson, M. E. 1985. Simultaneous recording of substantia nigra neurons and voltammetric release of dopamine in the caudate of behaving cats. *Brain Res Bull*, **15**, 221-3.
- Trulson, M. E., Preussler, D. W. & Howell, G. A. 1981. Activity of substantia nigra units across the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Neurosci Lett*, **26**, 183-8.
- Vataev, S. I. & Oganessian, G. A. 2000. Effect of uni- and bilateral lesions in the caudate nucleus by kainic acid on the electroencephalogram in the cycle wakefulness-sleep in Wistar rats. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*, **36**, 115-9.

- Villablanca, J. 1972. Permanent reduction in sleep after removal of cerebral cortex and striatum in cats. *Brain Research*, **36**, 463-8.
- Weissman, A. & Koe, B. K. 1965. Behavioral effects of L-alpha-methyltyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase. *Life Sci*, **4**, 1037-48.
- Westin, J. E., Andersson, M., Lundblad, M. & Cenci, M. A. 2001. Persistent changes in striatal gene expression induced by long-term L- DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, **14**, 1171-6.
- Wiegand, M., Moller, A. A., Lauer, C. J., Stolz, S., Schreiber, W., Dose, M. & Krieg, J. C. 1991. Nocturnal sleep in Huntington's disease. *Journal of Neurology*, **238**, 203-8.
- Wisor, J. P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G. H., Mignot, E. & Edgar, D. M. 2001. Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci*, **21**, 1787-94.
- Wolf, N. J. & Butcher, L. L. 1986. Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res Bull*, **16**, 603-37.
- Wooten, G. F. 1997. Functional anatomical and behavioral consequences of dopamine receptor stimulation. *Ann N Y Acad Sci*, **835**, 153-6.

APENDICE I

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema GB y NTPP
Figura 2	Mapeo acetilcolinesterasa y esquema Paxinos
Figura 3	Evaluación motora postlesión
Figura 4	NTPP Maloney y sitio del conteo
Figura 5	Conteo células positivas a c-Fos del experimento 1
Figura 6	Reconstrucción 3D del NTPP
Figura 7	Caracterización neuroquímica 1
Figura 8	Caracterización neuroquímica 2
Figura 9	Doble inmunohistoquímica ChAT/Fos del experimento 1
Figura 10	Dilatación ventricular
Figura 11	Correlación dilatación ventricular/células positivas a c-Fos
Figura 12	Microfotografías del NTPP para observar la expresión de c-Fos
Figura 13	Conteos células positivas a c-Fos del experimento 2
Figura 14	Doble inmunohistoquímica ChAT/Fos del experimento 2
Figura 15	Respuesta motora a anfetamina
Figura 16	Estados de vigilancia
Figura 17	Número y duración de episodios
Figura 18	Latencias
Figura 19	Comparación vigilia con actividad motora posterior a anfetamina
Figura 20	Situación de inyectores y cánulas en experimento 2

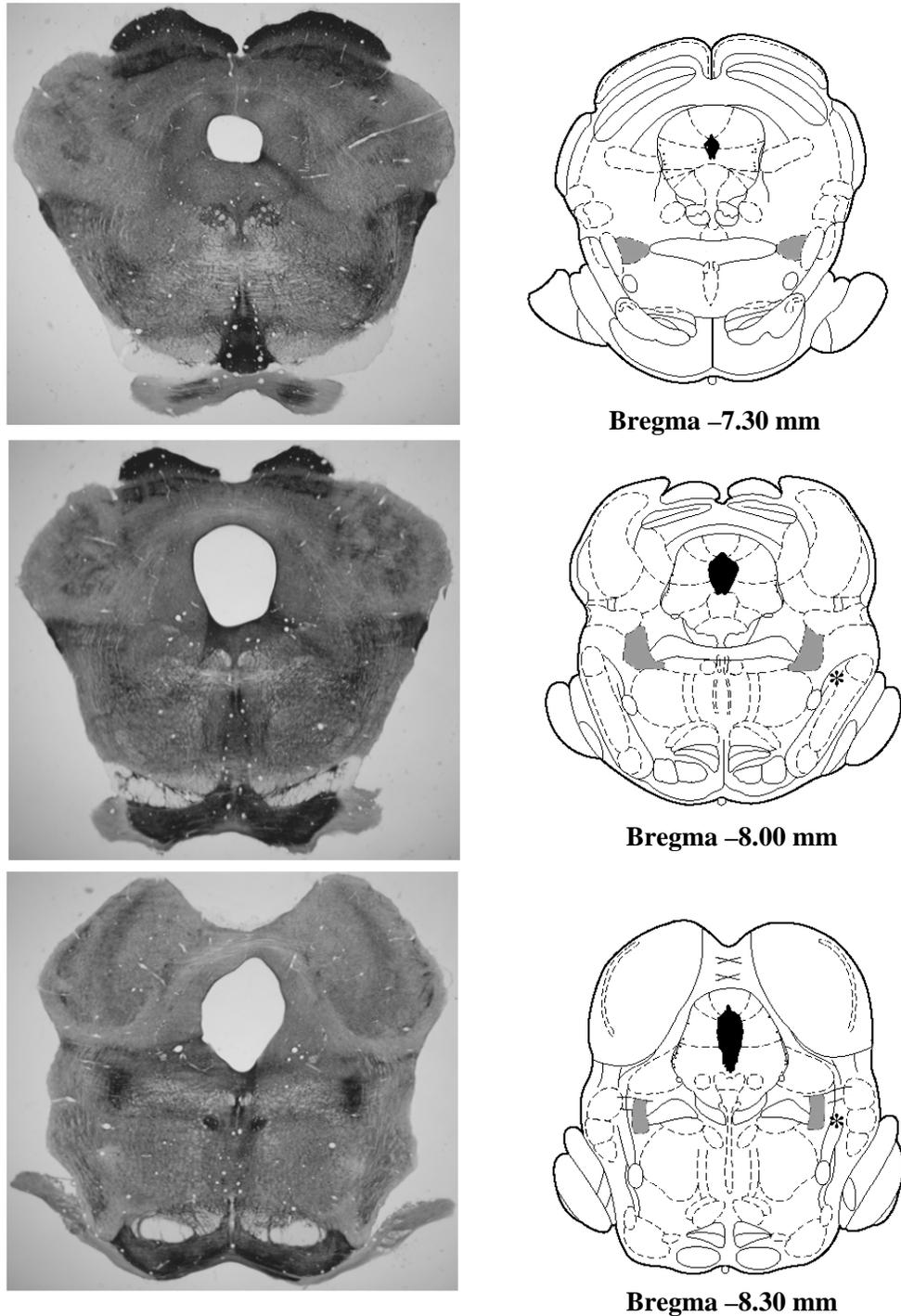


Figura 2. Fotografías de cortes coronales del puente teñidos para acetilcolinesterasa, en los diferentes niveles del eje anteroposterior en que se encuentra el NTPP, el cual adquiere una tinción oscura con esta técnica. A la derecha se muestran los esquemas tomados de Paxinos y Watson (1986) en los niveles correspondientes de las fotografías del lado izquierdo: el NTPP se muestra sombreado, mientras que el asterisco marca la localización del lemnisco lateral.

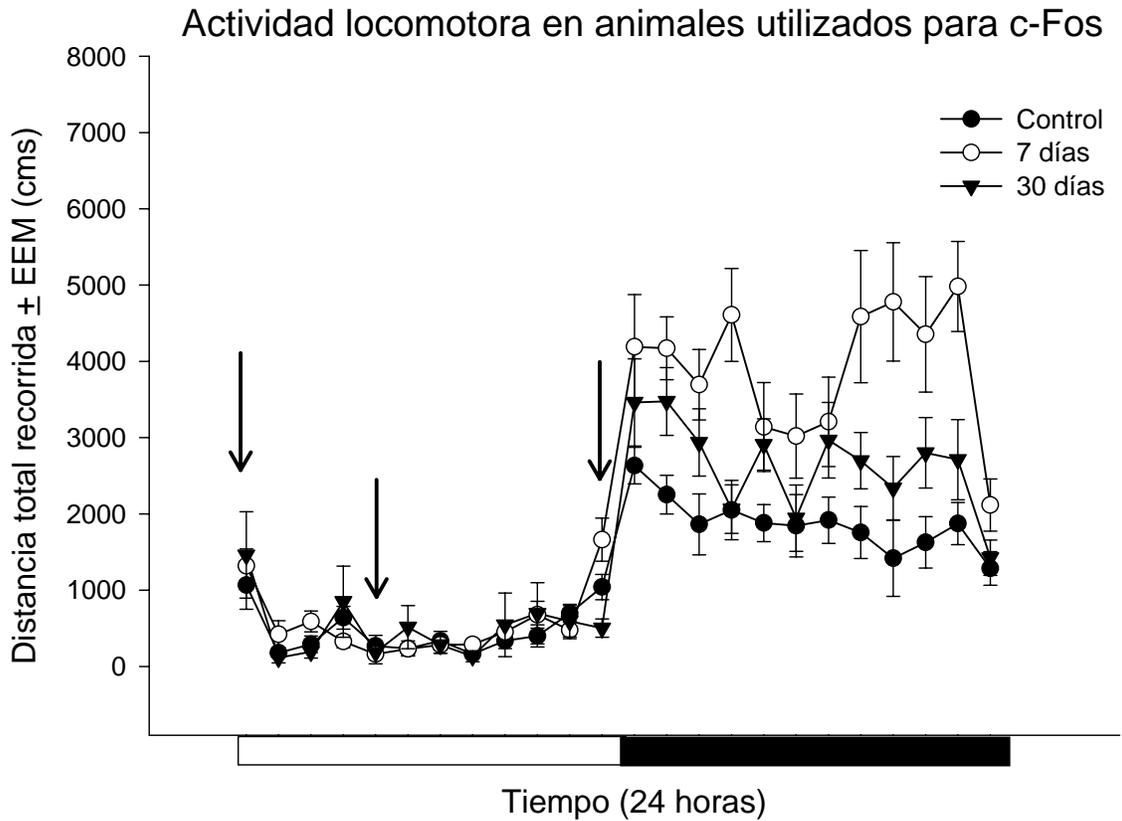


Figura 3. Se muestra la actividad locomotora promedio evaluada como distancia total recorrida en animales control (círculos negros) y animales sometidos a una lesión estriatal después de 7 días (círculos blancos) o 30 días (triángulos). Los registros fueron llevados a cabo el día anterior a su utilización para la técnica IHQ contra c-Fos. Las flechas indican las horas del ciclo en las cuales se realizaron las perfusiones.

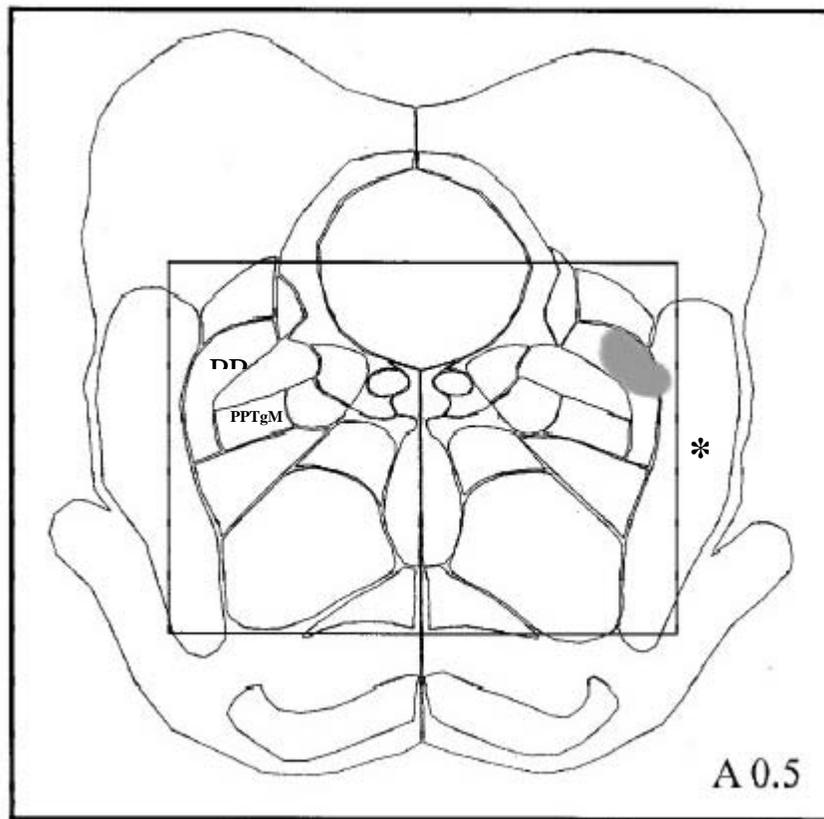


Figura 4. Esquema de un corte coronal a nivel de los núcleos pontomesencefálicos en el que se representa la localización anatómica del NTPP en el tallo cerebral. Se muestra sombreado el sitio en el cual se realizó el conteo para células inmunorreactivas a c-Fos. PPTgL, n. tegmental pedúnculo pontino región lateral; PPTgM, n. tegmental pedúnculo pontino región medial. El asterisco marca la localización del lemnisco lateral.

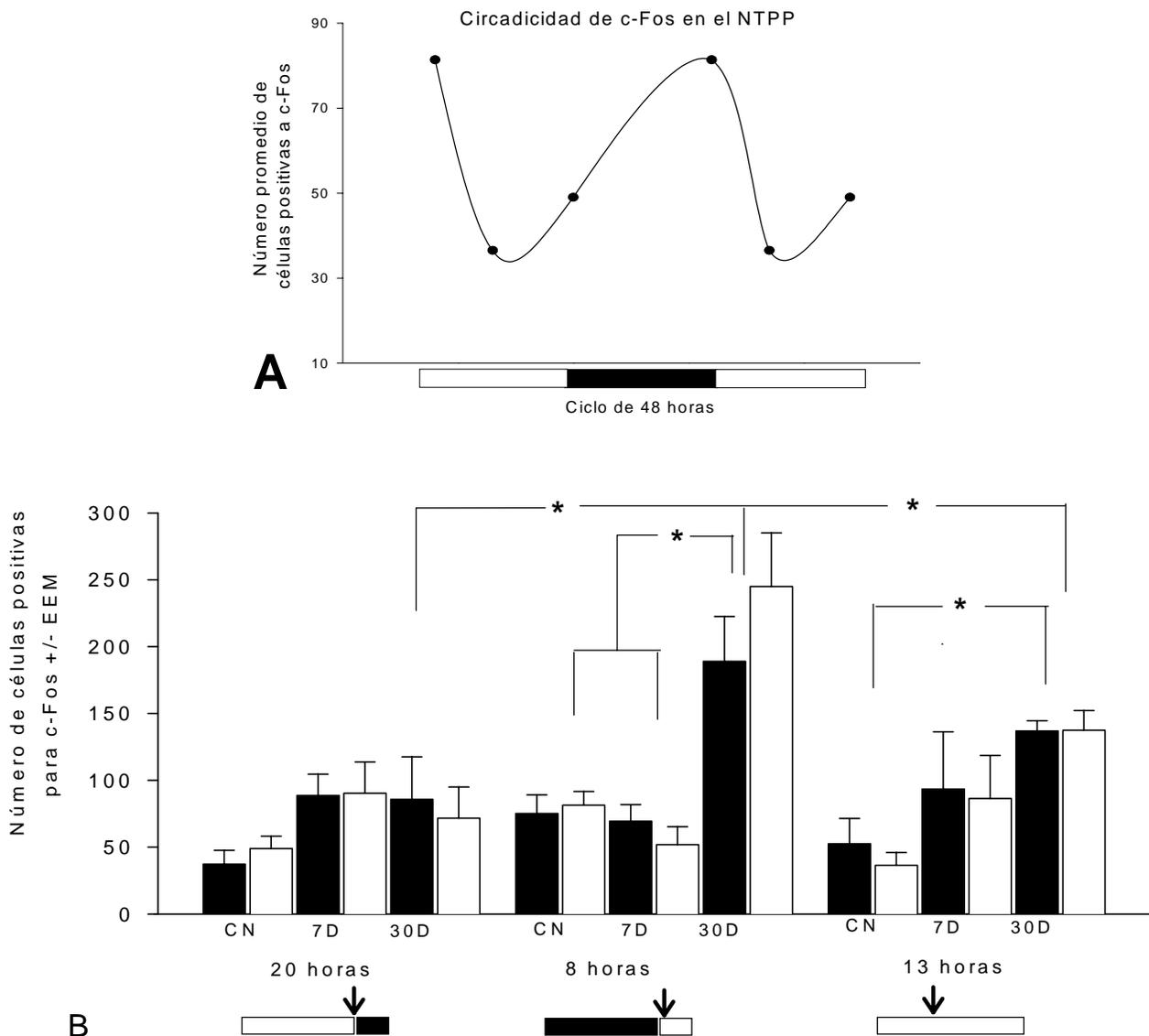


Figura 5. Se muestran los promedios del conteo bilateral de células positivas para c-Fos en el NTPP. Se observa una variación circádica en el grupo control en tres muestras del ciclo de 24 horas (A). Asimismo, se muestran los conteos de los 3 grupos experimentales (control, 7 días y 30 días postlesión) a las mismas horas descritas (B), en donde resalta un aumento en la expresión de c-Fos en el grupo 30 días postlesión tanto a las 8 como a las 13 horas. El asterisco indica diferencias significativas entre conteos ($p < 0.05$). Las barras negras indican el NTPP izquierdo y las barras blancas el derecho. CN, control vehículo; 7D y 30D, 7 días o 30 días posteriores a la lesión intraestriatal con ácido kaínico (5nmols/0.5 μ l).

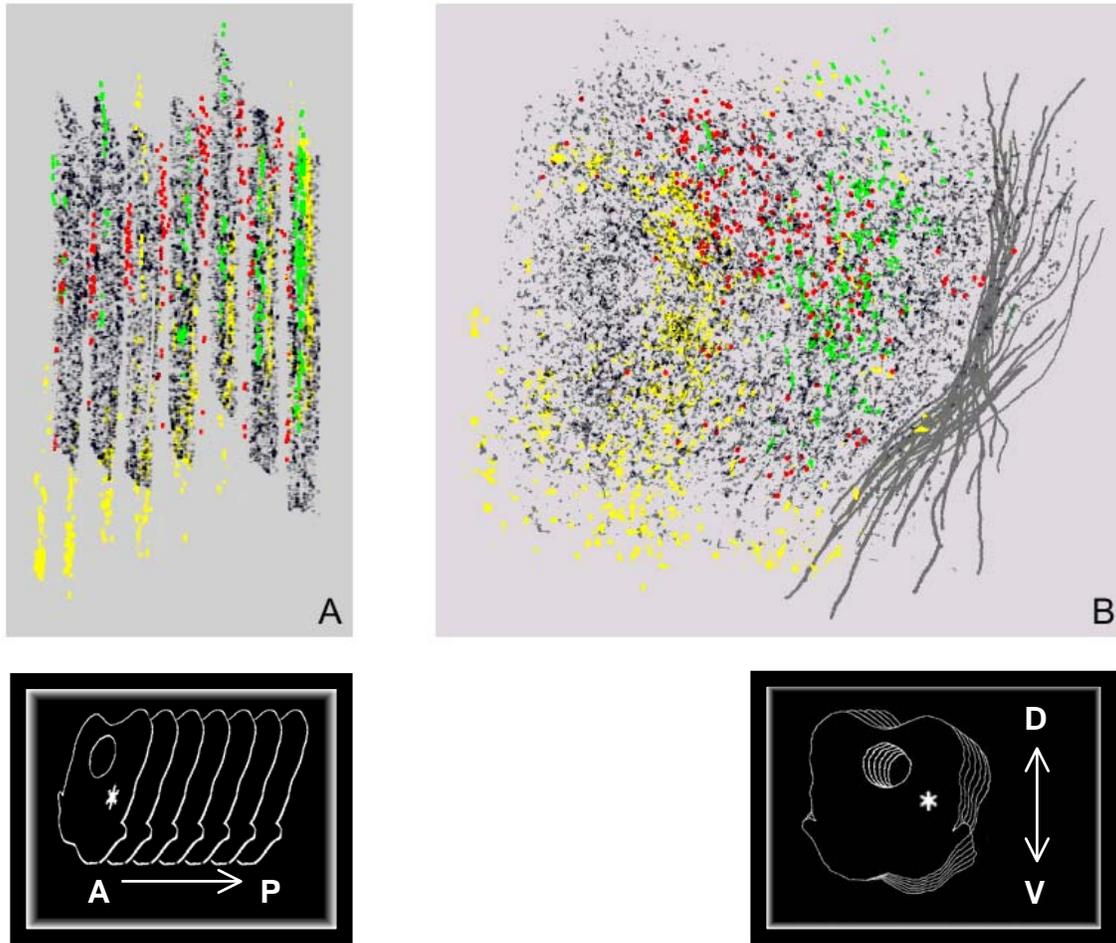


Figura 6. Reconstrucción tridimensional digitalizada de 28 secciones secuenciales de 35 μ m correspondientes a un animal modelo perteneciente al grupo de 30 días postlesión. La reconstrucción fue realizada siguiendo el eje longitudinal (A) o en relación a un plano coronal (B). Cuatro marcadores inmunohistoquímicos se muestran: ChAT (amarillo), c-Fos (rojo), GAD (verde) y glutamato (azul-gris). Los recuadros negros muestran una representación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral de las reconstrucciones. Las líneas en la fig. 4B representan el borde del tejido.

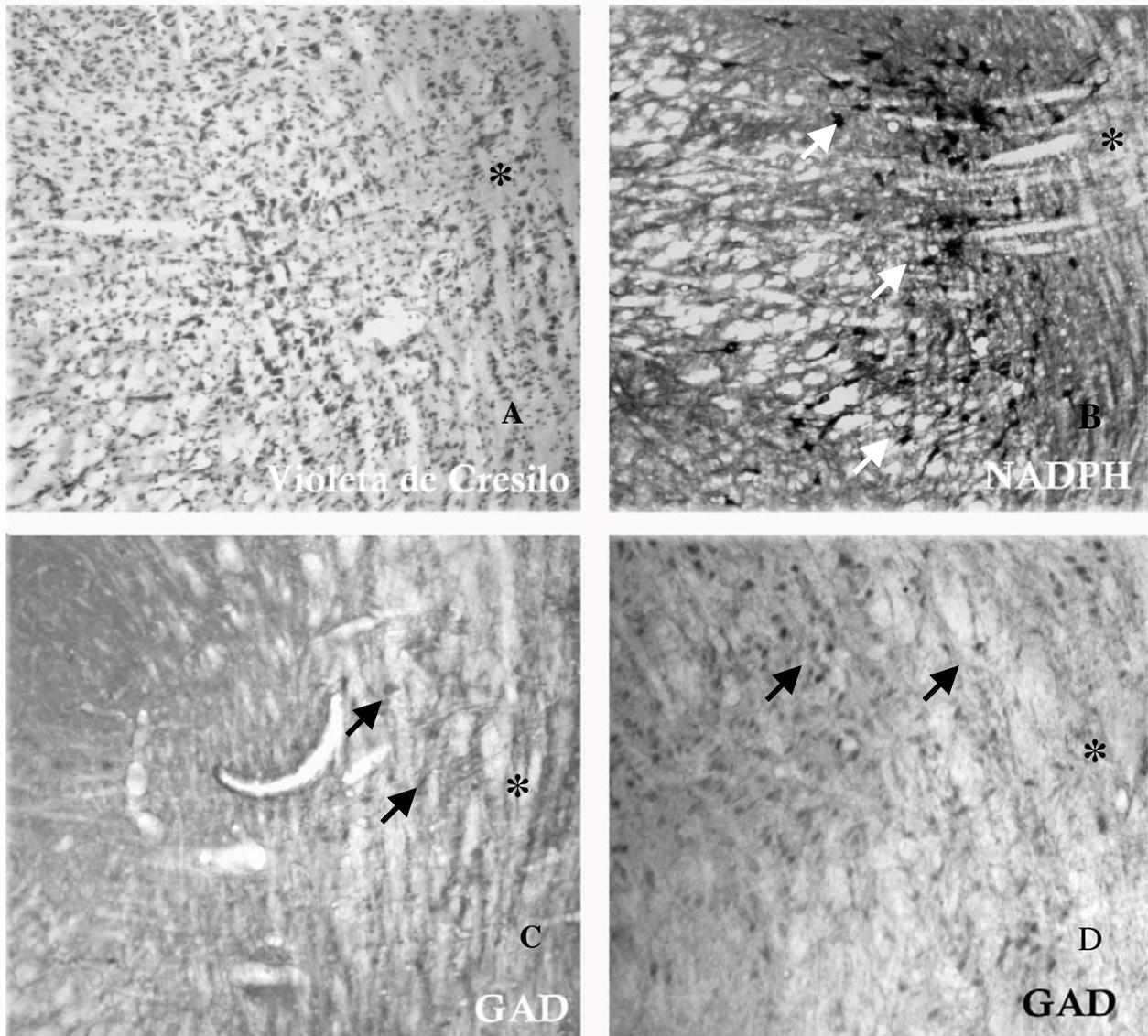


Figura 7. Se presentan cuatro microfotografías del NTPP para mostrar diferentes poblaciones celulares. (A) Tinción de violeta de Cresilo para ubicar la población celular total en el NTPP; (B) histoquímica para NADPH; (C) técnica inmunohistoquímica para GAD-65; y (D) técnica inmunohistoquímica para GAD-67. El asterisco marca la localización del lemnisco lateral, tal como se muestra en las figuras 2 y 4. Magnificación 20X.

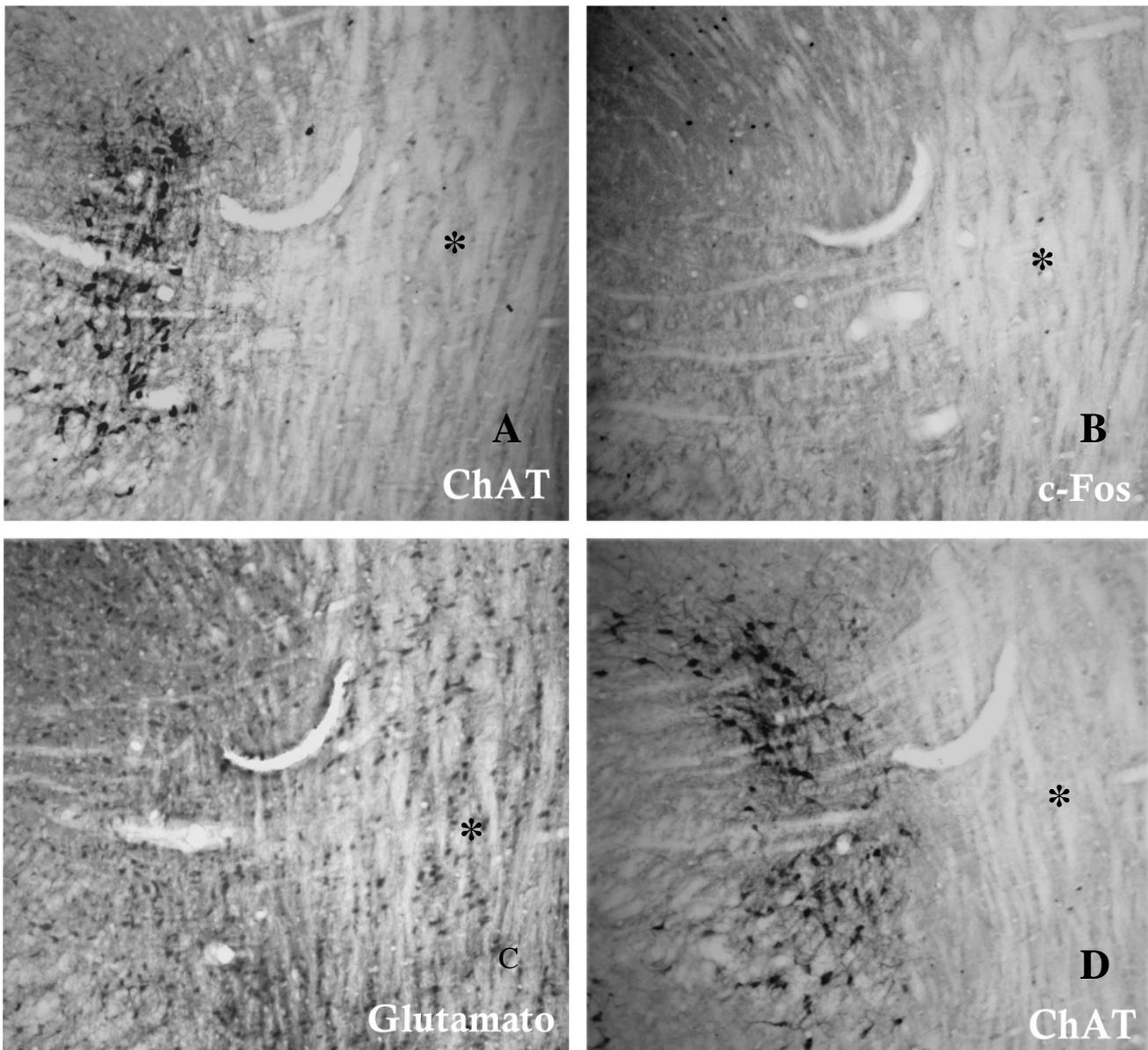


Figura 8. Se muestran cuatro micrográficas secuenciales de distintas técnicas IHQ para diferenciar las poblaciones neuroquímicas en el NTPP en relación con la población de células positivas a c-Fos. (A) Tinción para ChAT, anterior ; (B) población inmunorreactiva para c-Fos; (C) tinción para glutamato; y (D) tinción para ChAT, posterior. La muesca en el tejido fue utilizada como referencia para ubicación anatómica. El asterisco marca la localización del lemnisco lateral, tal como se muestra en las figuras 2 y 4. Magnificación 20X.

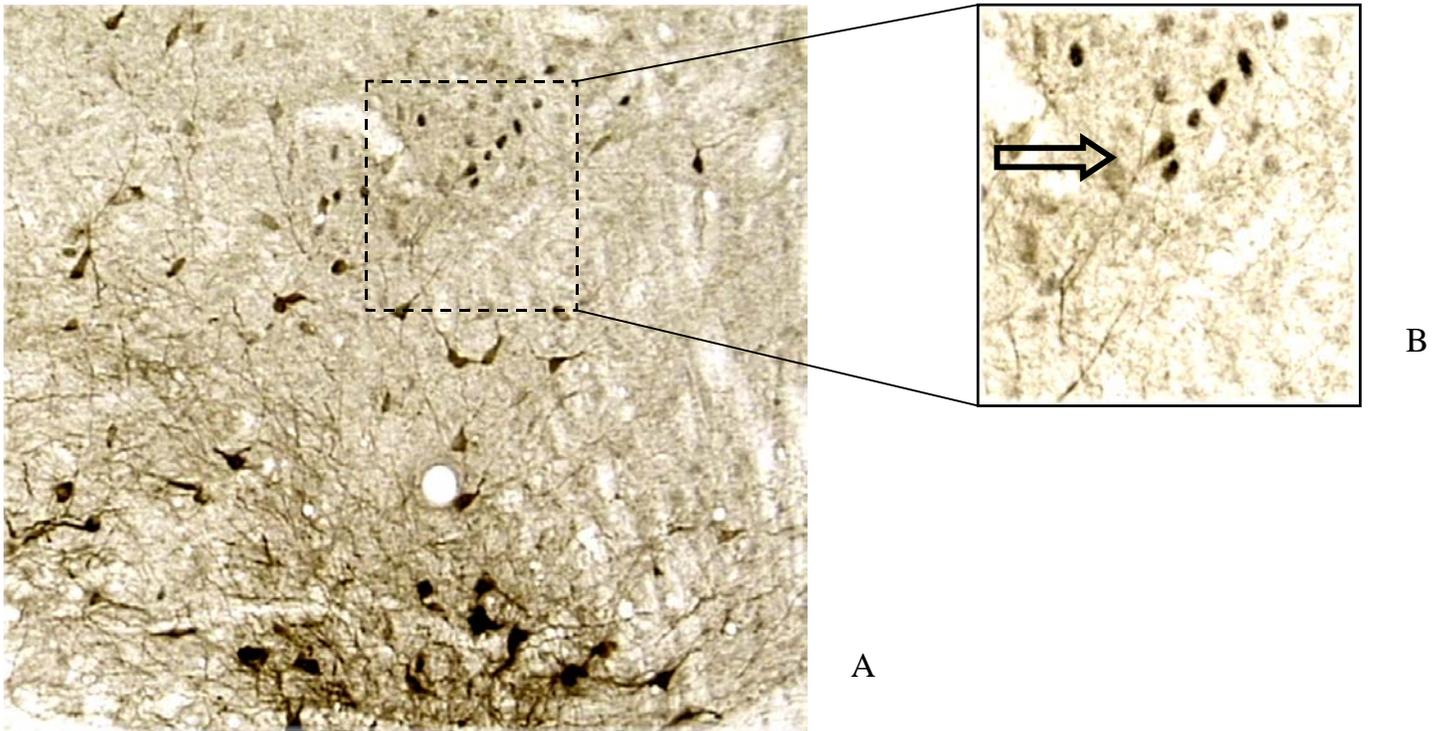


Figura 9. Doble inmunohistoquímica para marcar las células inmunorreactivas a c-Fos y a ChAT en un corte coronal al nivel del NTPP perteneciente a un animal a los 30 días después de la lesión intraestriatal con ácido kaínico (5nmols/0.5 μ l). Se muestra en la fotografía capturada a 20x (A) la situación anatómica de la población positiva para c-Fos, la cual se encuentra dorsal a la población colinérgica. Sin embargo, en la fotografía capturada a 40x (B) la flecha muestra en detalle una célula colinérgica que también coexpresa c-Fos.

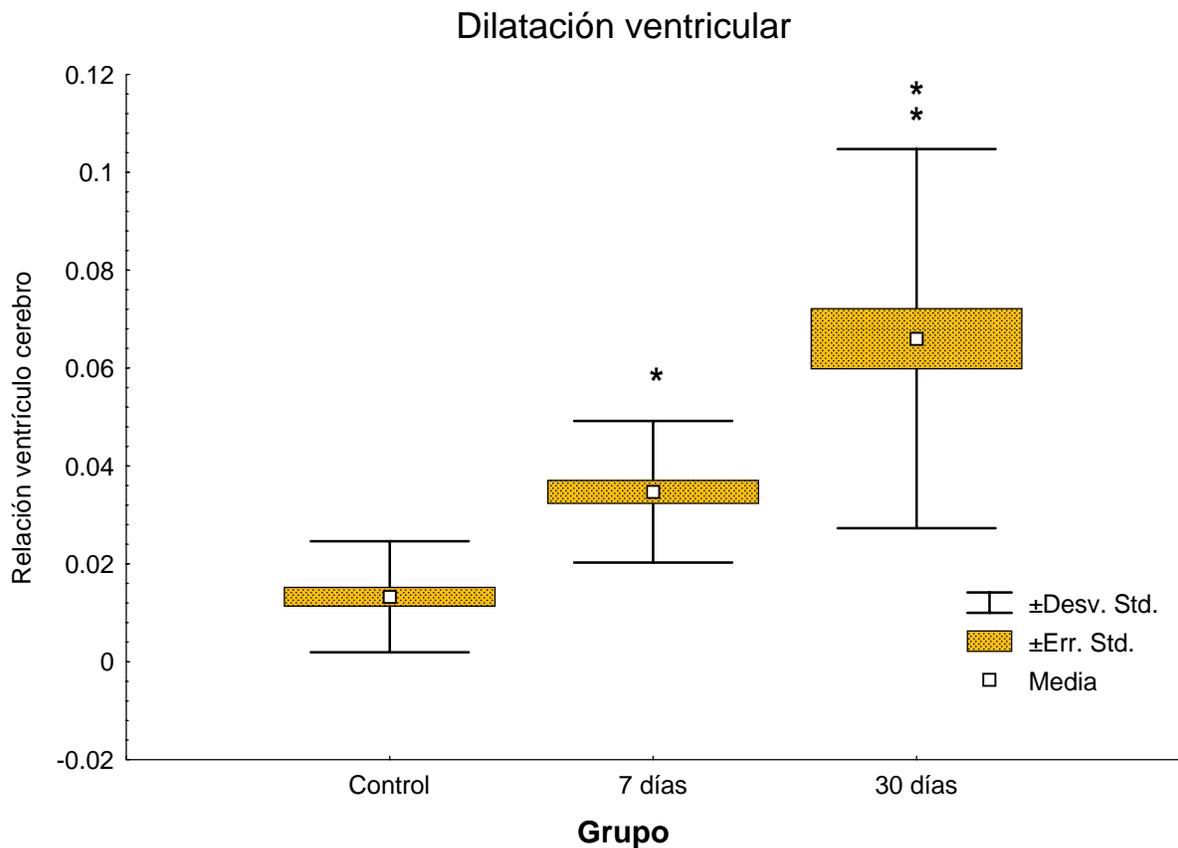


Figura 10. Gráfica que muestra la proporción del área total del cerebro ocupada por los ventrículos cerebrales en los grupos control, 7 días y 30 días postlesión. El incremento en el área de los ventrículos es indicativo de pérdida tisular, es decir, de lesión estriatal. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de grupo (ANDEVA $F(2)=42.12$, $p<0.05$). Una prueba *posthoc* reveló diferencias tanto entre los grupos control contra 7 días (*) como control contra 30 días (**), así como diferencias entre ambos grupos experimentales.

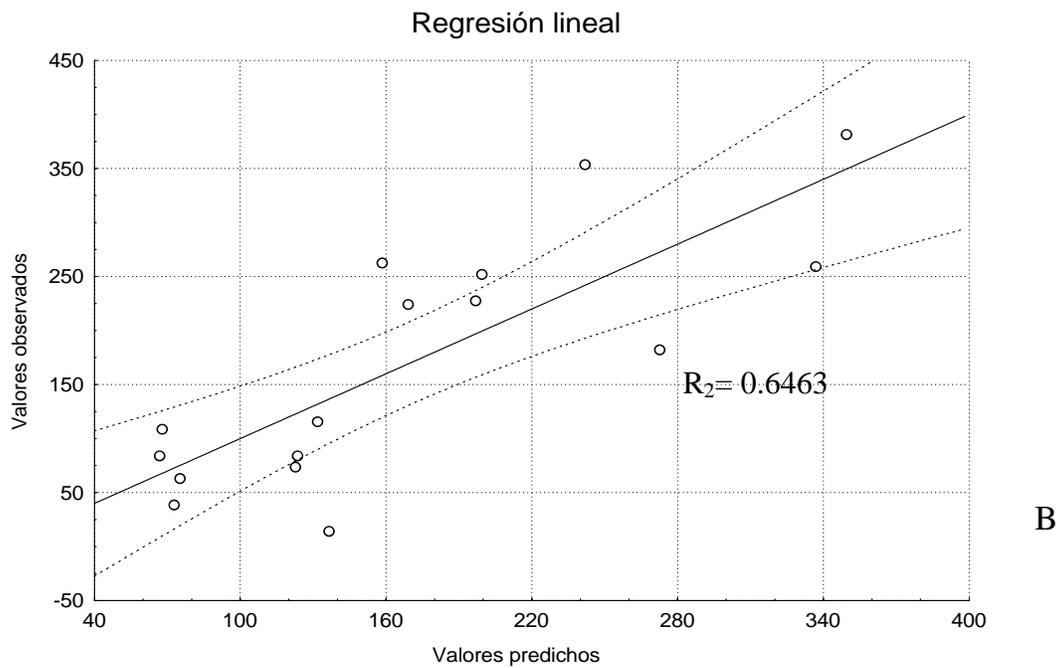
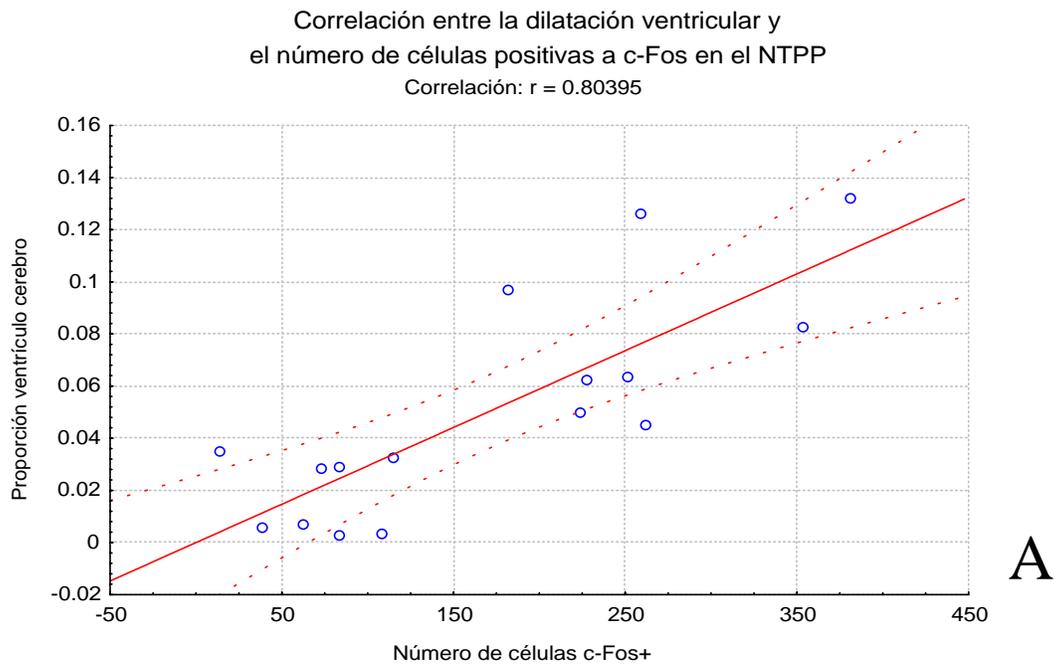


Figura 11. Se presenta la correlación entre la proporción área ventricular/ área cerebral como indicador de dilatación ventricular debida a lesión estriatal, y el número de células inmunorreactivas a c-Fos en el NTPP pertenecientes a los grupos control y 30 días después de la lesión (A). Asimismo, se muestra el resultado de la regresión lineal utilizando estas mismas variables (B).

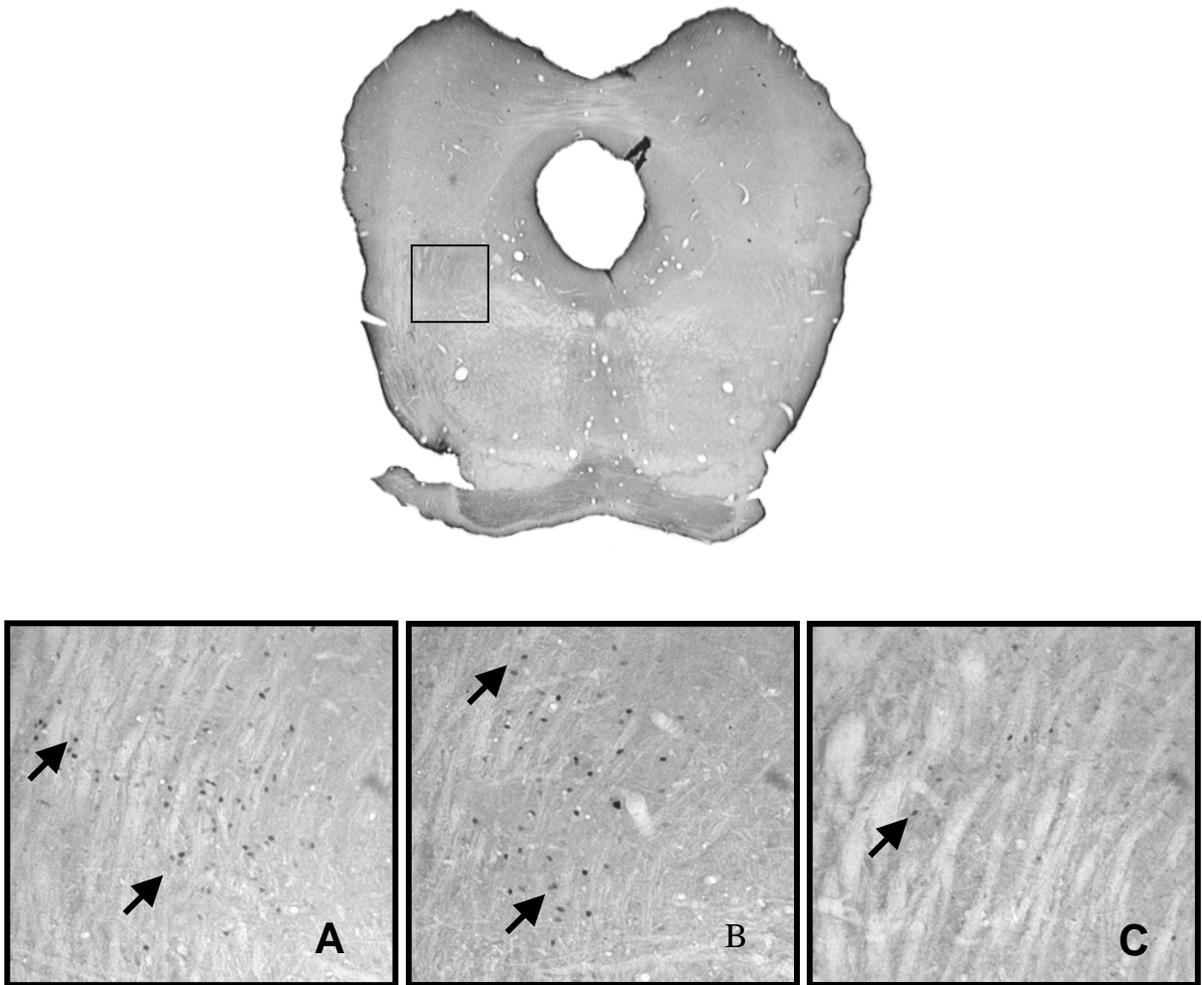


Figura 12. Se muestra a partir de un corte coronal del tallo cerebral la ubicación del conteo de células positivas para c-Fos (área dentro del cuadro). La expresión de c-Fos fue analizada en el NTPP después de la administración de amfetamina (A), solución salina (B) y en animales intactos (C). Las flechas indican ejemplos de células positivas para c-Fos. Magnificación: 20X.

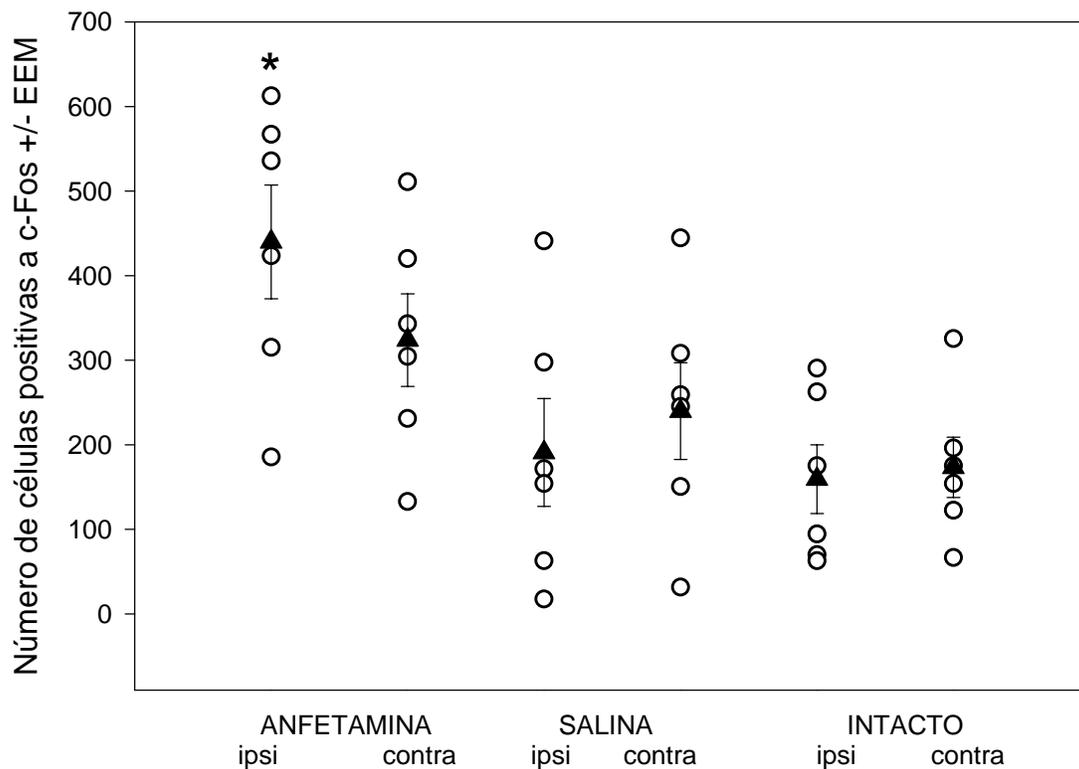


Figura 13. Se presenta el conteo de células inmunorreactivas a c-Fos en el NTPP en las diferentes condiciones experimentales, el grupo que recibió anfetamina, el grupo que recibió solución salina y el grupo que permaneció intacto. Los círculos muestran los valores de cada animal en su grupo respectivo y los triángulos muestran la media del grupo. El asterisco representa una diferencia significativa con el resto de los conteos ($p < 0.05$).

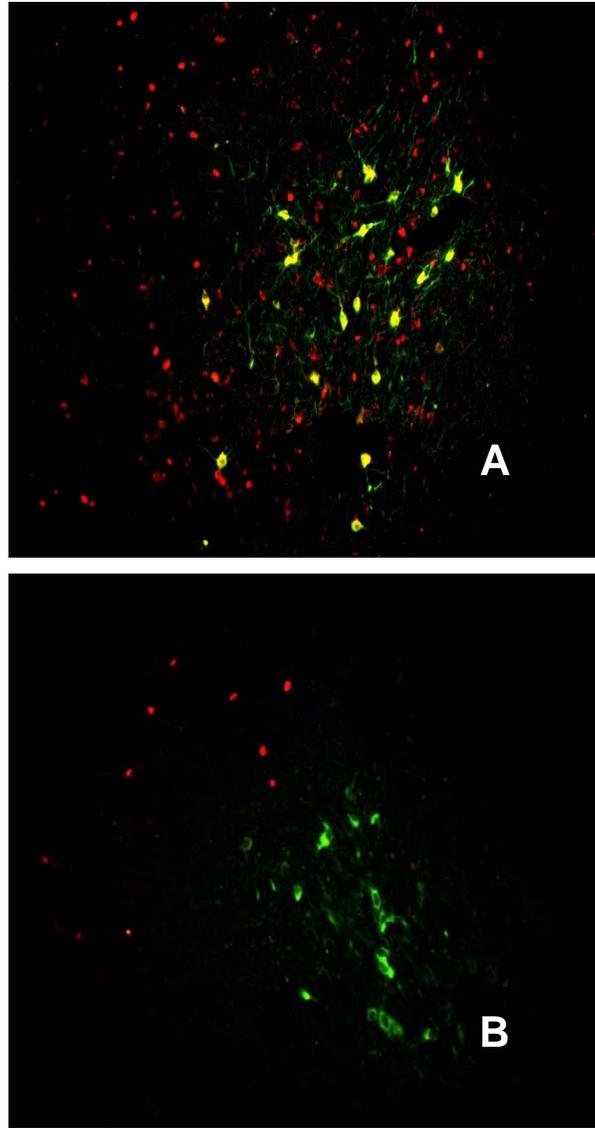


Figura 14. Microfotografías de cortes coronales del tallo cerebral a nivel del NTPP procesada por inmunofluorescencia. Se muestra la expresión tanto de c-Fos (en rojo) como de ChAT (en verde) posterior a la administración intraestriatal unilateral de amfetamina. Los cortes pertenecen al NTPP tanto del lado ipsilateral a la estimulación (A) como del lado contralateral (B). Las células que coexpresan para ambos marcadores aparecen en color amarillo. Magnificación: 20X.

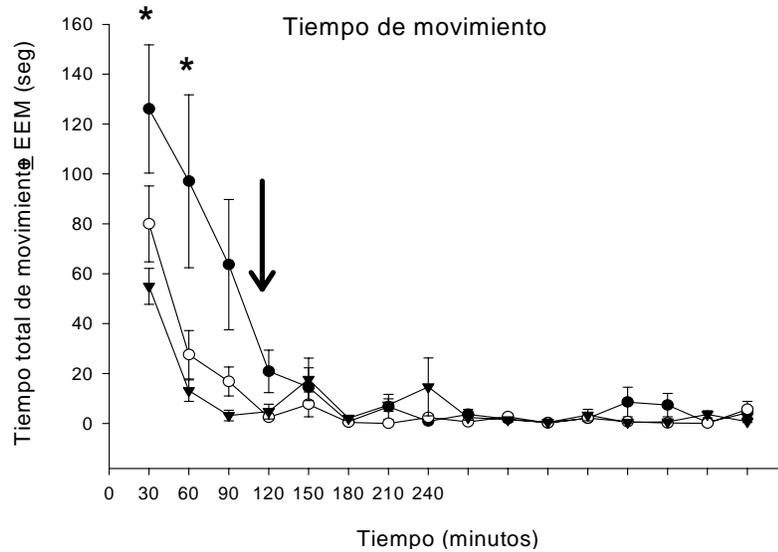
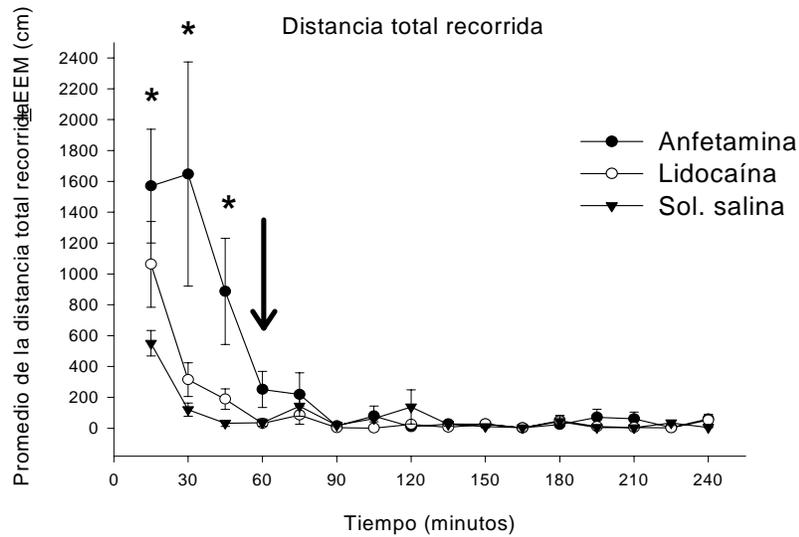


Figura 15. Actividad locomotora promedio de los animales después de la estimulación farmacológica del estriado expresada como distancia total recorrida (A) y tiempo de movimiento (B). En ambos parámetros hubo una diferencia significativa entre el tratamiento con anfetamina comparado con los otros dos tratamientos, además de diferencias dentro del tratamiento de anfetamina en los primeros puntos de los registros (*). Las flechas indican el momento en el que corresponde la perfusión para los animales utilizados para inmunohistoquímica.

Estados de vigilancia

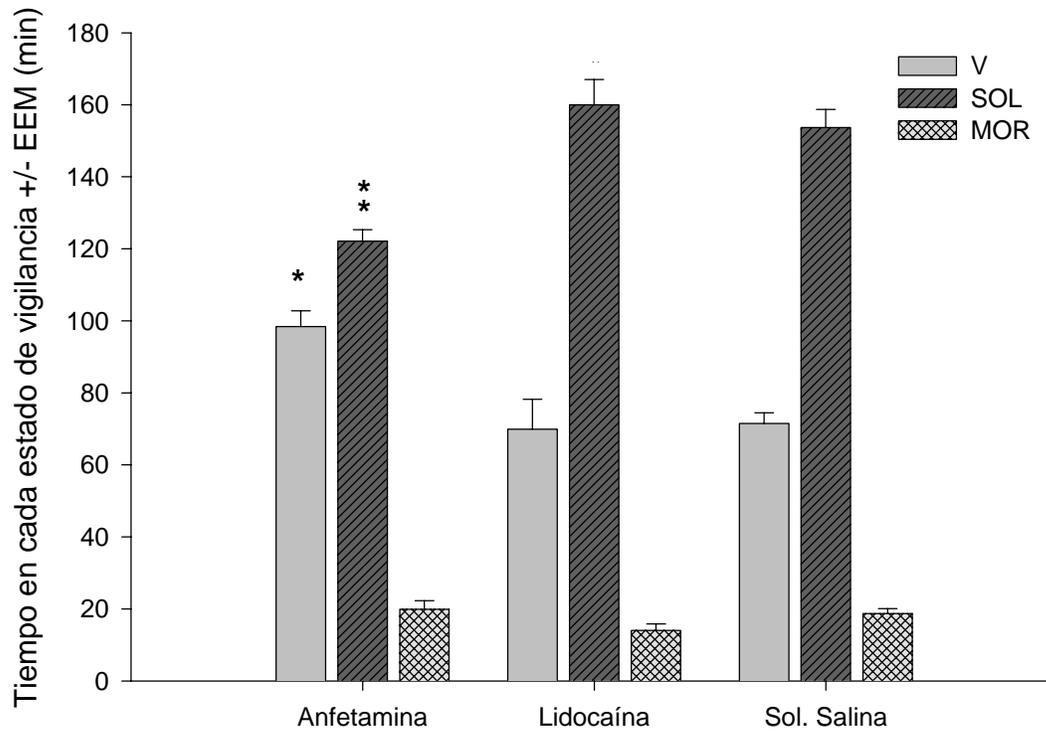
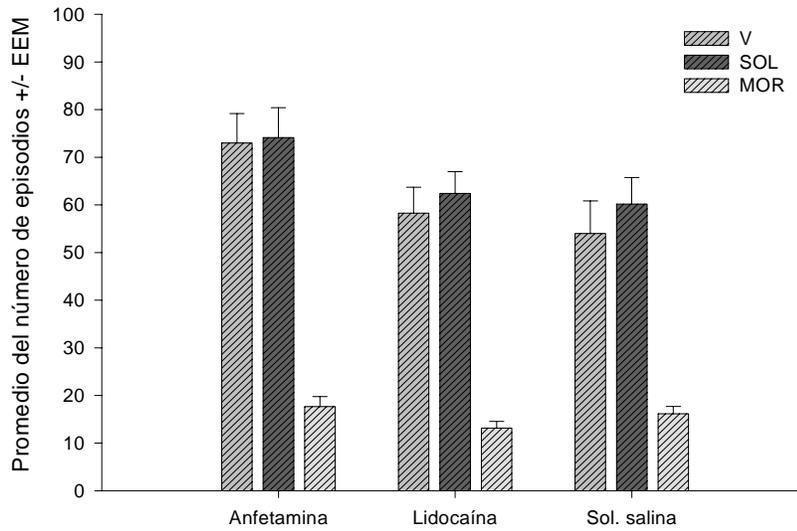


Figura 16. En esta gráfica se muestra el tiempo transcurrido en cada estado de vigilancia según un registro ECoG de 4 horas a partir de la administración intraestriatal de anfetamina (n=8), lidocaína (n=8) o solución salina como control (n=8). Se observan diferencias significativas tanto entre la vigilia como el SOL del tratamiento con anfetamina contra la del tratamiento con lidocaína (V = vigilia, SOL = sueño de ondas lentas, MOR = sueño de movimientos oculares rápidos).

Número de episodios



Duración de los episodios en cada estado de vigilancia

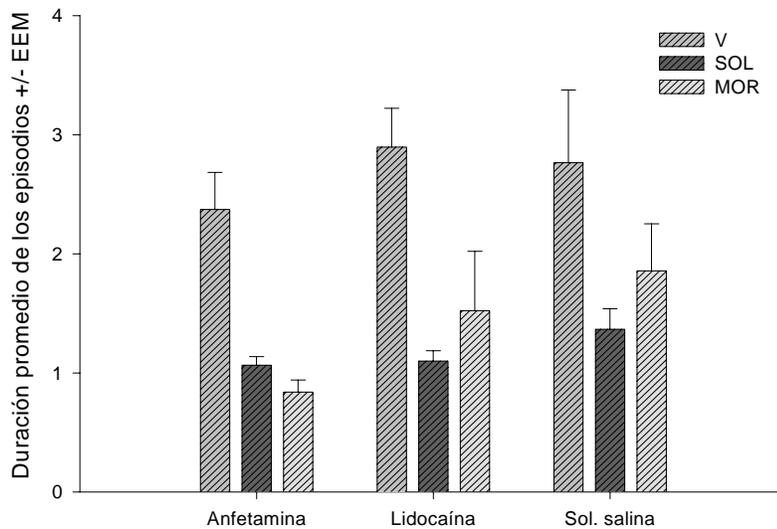


Figura 17. Se presenta el análisis de los episodios de cada estado de vigilancia, en términos del número de episodios en las cuatro horas de registro (gráfica superior) y la duración promedio de cada episodio (gráfica inferior). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, aunque se puede observar una tendencia del tratamiento con anfetamina a presentar un mayor número de episodios de vigilia y SOL (V = vigilia, SOL = sueño de ondas lentas, MOR = sueño de movimientos oculares rápidos).

Latencias para SOL y MOR

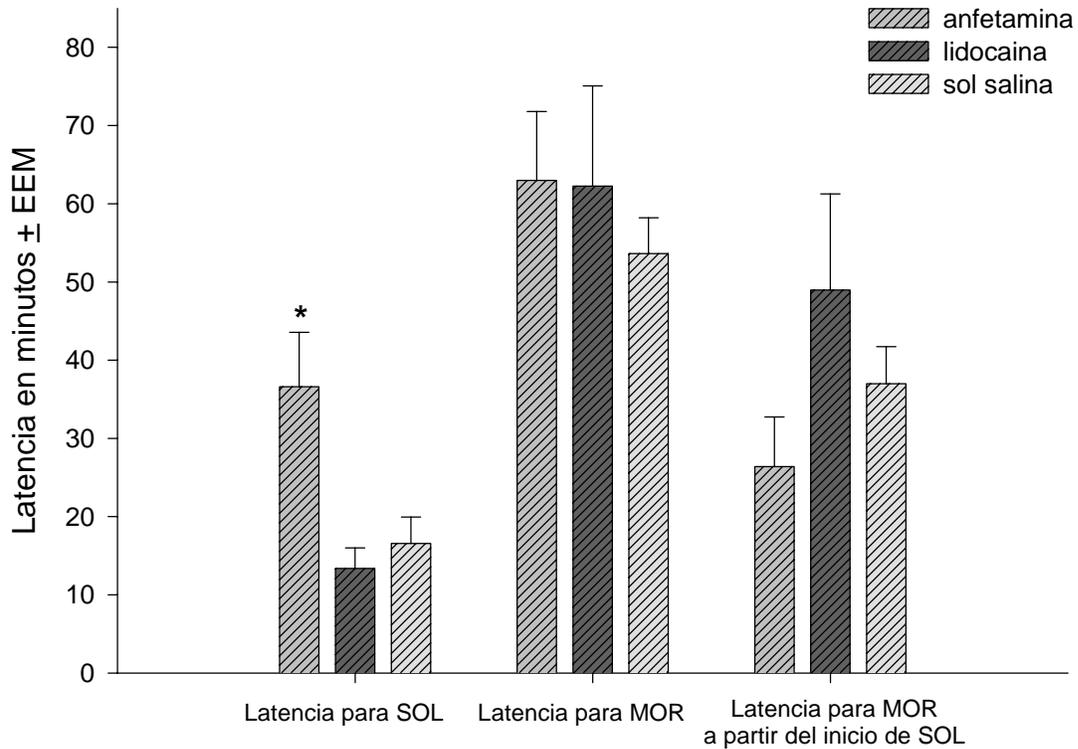


Figura 18. Latencias promedio para SOL y para MOR a partir de vigilia y a partir del primer SOL en el caso del sueño MOR para los diferentes tratamientos. Es evidente, por un lado, el incremento en la latencia para SOL después del tratamiento con anfetamina, y por otro, la disminución en la latencia para MOR a partir del SOL.

Comparación entre vigilia y el tiempo de movimiento

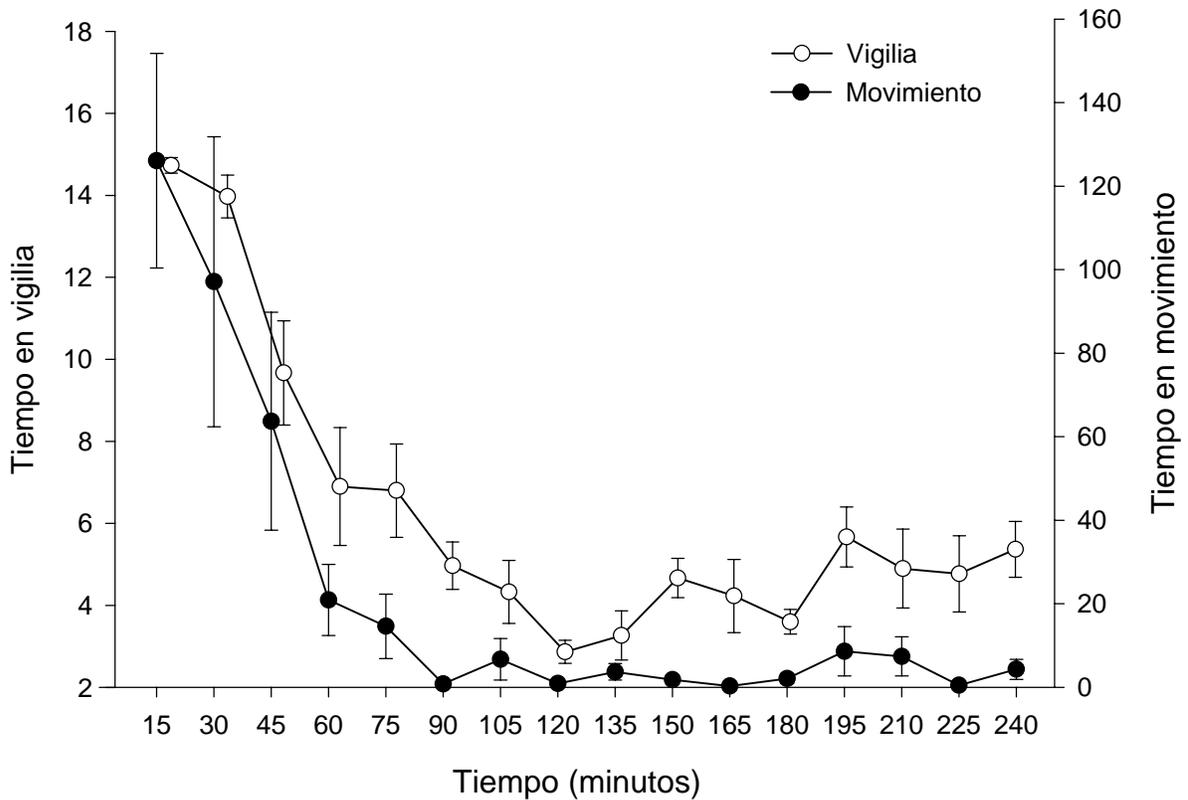


Figura 19. Se muestra las curvas de los porcentajes tanto del tiempo total de movimiento (círculos negros) como del tiempo en vigilia (círculos blancos) en segmentos de 15 minutos a lo largo de las cuatro horas de registro después del tratamiento con anfetamina (n=8). Así, es posible apreciar la evolución de cada variable posterior a la aplicación del fármaco con lo cual se observa que la vigilia se mantiene elevada aún cuando el movimiento es prácticamente nulo.

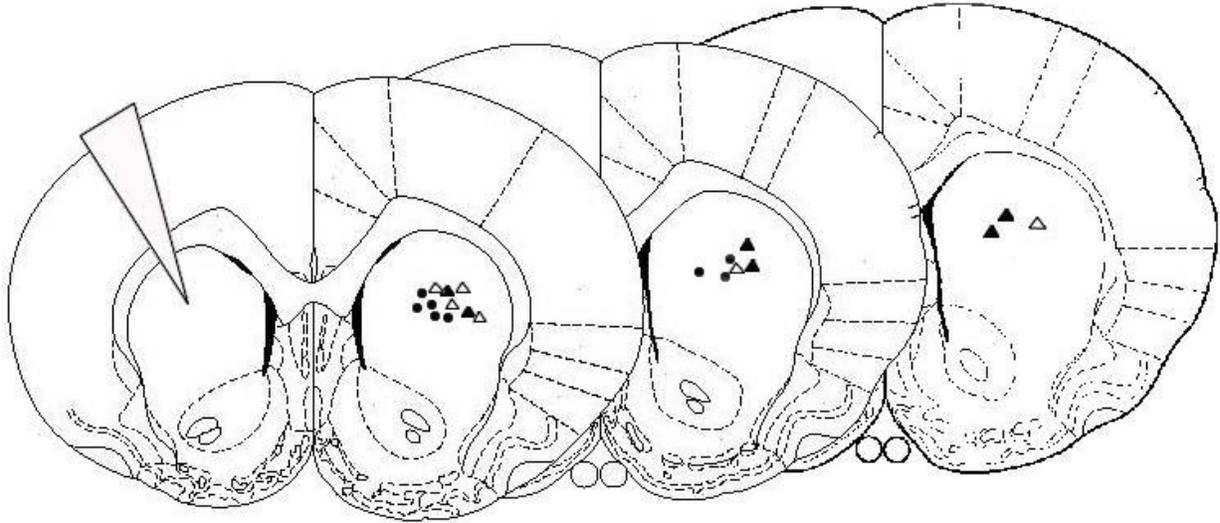


Figura 20. Se muestran cortes coronales representativos del estriado en el eje antero-posterior (Bregma +1.6mm a 1.0mm) con el propósito de localizar las puntas de las cánulas en los experimentos conductuales (círculos) y las puntas de los inyectores en los experimentos de inmunohistoquímica tanto para los animales que recibieron amfetamina (triángulos negros) como para los que recibieron solución salina (triángulos blancos). La cabeza de la flecha en el hemisferio derecho indica el sitio elegido para la administración del fármaco de acuerdo con el atlas estereotáxico.