



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**“EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN  
SISTÉMICA DEL PRINCIPAL  
METABOLITO DEL ETANOL  
(ACETALDEHÍDO) EN LOS PARÁMETROS DE  
SUEÑO DE LA RATA”**

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**JAVIER EDGAR FRANCO PÉREZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS PAZ TRES

MÉXICO, D.F.

2007

MARZO,



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.

# **RECONOCIMIENTO**

***Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la  
Beca de Maestría No. 182679***

***A los Miembros del Comité Tutorial:***

***Dr. Carlos Paz Tres  
Dr. León Federico Cintra McGlone  
Dr. Manuel Miranda Anaya***

**A MIS PADRES**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto de Maestría.*

*Al Laboratorio de Neurofisiología y en particular al Dr. Carlos Paz Tres por permitir el desarrollo de este proyecto bajo su tutela.*

*En especial a todos los Miembros del Jurado (Dra. Maria Luisa Fanjul Peña de Moles, Dr. Manuel Miranda Anaya, Dr. Carlos Paz Tres, Dr. Oscar Prospero García y Dr. León Federico Cintra McGlone) por brindarme un poco de su valioso tiempo para realizar acertadas observaciones a este trabajo de tesis.*

*Al Dr. Joaquín Manjarrez Marmolejo por todos los comentarios que ayudaron a enriquecer esta tesis.*

*Al Programa de Apoyos a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo recibido para la impresión de tesis.*

*A la Biol. Mónica Padilla de la Torre por todo su aliento, comprensión y paciencia.*

*A la M. en Psicobiol. Verónica Custodio, M. en C. Edith González y al Biol. Francisco Gutiérrez por todo su apoyo y ayuda técnica durante las diferentes etapas de este proyecto.*

# INDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>I. Introducción</b>	3
<b>II. Antecedentes</b>	
A. Generalidades del ciclo sueño vigilia	7
B. Vigilia	9
C. Sueño de ondas lentas (SOL)	10
D. Sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR)	11
E. Neuroquímica del ciclo sueño vigilia	11
F. Metabolismo del etanol y acetaldehído	22
G. Efectos del acetaldehído en el cerebro	25
<b>III. Hipótesis</b>	30
<b>IV. Objetivos</b>	30
<b>V. Material y Métodos</b>	
A. Animales	31
B. Implantación de electrodos	31
C. Estudios poligráficos	32
D. Cuantificación de monoaminas	33
E. Análisis estadístico	34
<b>VI. Resultados</b>	
A. Administración aguda de ACH y estudios poligráficos	35
B. Administración crónica de ACH y estudios poligráficos	39
C. Administración aguda de ACH y contenido de monoaminas	42
<b>VII. Discusión</b>	48
<b>VIII. Conclusión</b>	55
<b>IX. Apéndice</b>	
A. Artículo publicado	56
<b>X. Bibliografía</b>	63

## RESUMEN

El acetaldehído es el principal metabolito del etanol y es un compuesto biológico muy activo. Esta molécula es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y modificar el contenido de monoaminas en el cerebro. Recientemente ha sido implicado en muchos efectos tóxicos del etanol. Este estudio se llevó a cabo para determinar las alteraciones en el ciclo sueño vigilia de la rata y en el contenido de serotonina y noradrenalina en varias regiones del cerebro después de la administración aguda y crónica de acetaldehído. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar las cuales se implantaron con siete electrodos para la realización de registros polisomnográficos. Los grupos experimentales fueron administrados con acetaldehído a varias dosis para tratar de establecer una curva dosis respuesta. Otro lote de ratas fue sacrificado a diferentes tiempos después de la administración de acetaldehído para analizar el contenido de serotonina, noradrenalina y ácido 5-hidroxiindolacético en diferentes regiones del cerebro. En general, los resultados mostraron que el acetaldehído disminuyó significativamente el tiempo total de vigilia, incrementó el sueño de ondas lentas y disminuyó el sueño de movimientos oculares rápidos. La disminución del sueño de movimientos oculares rápidos se observó inmediatamente después de la aplicación de acetaldehído y durante las primeras 12 h de registro, es decir a lo largo del periodo de luz. Por el contrario, el sueño de ondas lentas se incrementó hasta 12 h después de la inyección de acetaldehído y a lo largo del periodo de oscuridad. El análisis neuroquímico mostró que el acetaldehído incrementó significativamente el contenido de ácido 5-hidroxiindolacético y la tasa de recambio (5-hidroxiindolacético/serotonina) en el bulbo y puente. Estos resultados sugieren que el acetaldehído modifica el metabolismo de serotonina el cual ha sido implicado en la aparición y mantenimiento de los episodios de sueño de movimientos oculares rápidos a lo largo de todo el ciclo sueño vigilia.

## **ABSTRACT**

The acetaldehyde is the first product formed in the ethanol metabolism and it is a very active biological compound. This molecule is able to cross the blood-brain barrier and it can modify the monoamine contents in the brain. Several reports have suggested it plays a role in the effects of ethanol on the brain. The aim of this study was to determine the modifications in the sleep-wake cycle and changes of serotonin and noradrenaline concentrations in several regions of the rat brain after acute and chronic acetaldehyde administration. Male Wistar rats were used for this study and the animals were implanted with seven electrodes for the polygraphic recordings. For the neurochemical analysis the rats were sacrificed at different times after the acetaldehyde administration. The contents of serotonin, noradrenalin and 5-hydroxyindolacetic acid were analyzed in several brain regions. Results showed that acetaldehyde significantly decreases the time spent in wakefulness, increases the time spent in slow wave sleep and decreases the rapid eye movements sleep. The decrease of rapid eye movements sleep was immediately observed after acetaldehyde injection and along the light period. By contrast, the increase of slow wave sleep was detected along the dark period. The neurochemical analysis showed that acetaldehyde significantly increases the 5-hydroxyindolacetic acid content and 5-hydroxyindolacetic acid/serotonin ratio at the bulb and pons. These results suggest that acetaldehyde modifies the metabolism of serotonin which has been implicated in the onset and sustaining of the sleep episodes occurring along the sleep-wake cycle.



## I. INTRODUCCIÓN

El sueño es un estado conductual de reposo el cual presenta diferentes niveles de control, desde los genes y los mecanismos intracelulares hasta las redes neuronales centrales incluyendo aquellas que controlan el movimiento, despertares, funciones autonómicas, conducta y cognición.

A partir de la década pasada, una explosión remarcable de nuevos descubrimientos ha permitido construir un panorama mucho más completo de los mecanismos genéticos, la neurofisiología celular y las redes subcorticales que subyacen a la neurobiología del sueño. Los ritmos biológicos están determinados genéticamente, por lo que se presentan aún cuando los individuos se encuentren aislados del medio ambiente. Algunas señales externas sincronizan a los organismos vivos con el medio ambiente, a estas señales se les llama sincronizadores. El más estudiado es el ciclo nictameral, o de sucesión de luz y oscuridad, provocado por la rotación de la tierra en un periodo de 24 horas. Este ritmo geológico, probablemente como una presión de selección, dió lugar en los organismos a ritmos biológicos internos con un periodo similar al natural, los cuales son conocidos como circadianos (Hiriyart, 1998).

Descubrimientos recientes indican que los mecanismos moleculares que controlan los ritmos circadianos están altamente conservados filogenéticamente (Allada y cols, 2001; Reppert y cols, 2001). La conservación tanto molecular como conductual de los ritmos circadianos sugiere que el sueño proporcionó una ventaja selectiva en los mamíferos ancestrales para poder persistir. La prolongada pérdida de sueño afecta, entre otras cosas, el control de temperatura, el metabolismo y la función inmune, pudiendo producir en condiciones extremas hasta la muerte. Con todo lo anterior

podemos darnos cuenta de la importancia que tiene este proceso y todos los niveles de organización que participan o que son influidos directa o indirectamente por el sueño (Rechtschaffen y Bergmann, 2002).

Desde que comenzaron los primeros trabajos para conocer más a fondo el origen y función del sueño, se han empleado diversos enfoques y metodologías. Uno de los primeros trabajos que surgieron para tratar de describir los mecanismos de este fenómeno fue la postulación de la Teoría hipnagógica del sueño. Esta teoría fue propuesta por Pieron en 1913 (citado por Borbely y Tobler, 1989), y demostró que el líquido cefalorraquídeo de perros privados de sueño era capaz de incrementar el sueño cuando se administraba en perros controles. De esta forma, Pieron postuló que durante la vigilia prolongada se acumulaba cierta sustancia en el líquido cefalorraquídeo a la que nombró hipnotoxina y que era la responsable de la generación del sueño.

Debido a esta necesidad para dormir, se han formulado varias hipótesis que tratan de explicar que es el sueño. Las primeras hipótesis de los neurofisiólogos consideraron al sueño como un estado pasivo opuesto a la vigilia. Con el descubrimiento del sistema reticular activador ascendente (Moruzzi y cols, 1949), la vigilia pasó a ser explicada en términos de un incremento en la actividad de este sistema, y el sueño, en términos pasivos del sistema. Sin embargo, esta teoría requería solamente un sistema para explicar la sucesión de la vigilia hacia el sueño. Estas teorías fueron inicialmente aceptadas de manera muy amplia, pero desde entonces el panorama ha cambiado drásticamente. El descubrimiento que el sueño podía ser inducido por la estimulación eléctrica de diferentes partes del cerebro fue el primer punto de ataque contra la teoría pasiva del sueño.

Posteriormente, para probar la existencia de un sistema activo inductor del sueño fue necesario producir estados de insomnio por medio de lesiones en el cerebro. Von Economo describió estados de insomnio en un grupo de pacientes afectados por encefalitis letárgica y con lesión del área preóptica del hipotálamo anterior. Bremer en los años treinta, seccionó entre el bulbo y la médula (*encephale isolé*) del cerebro de gatos y observó que el animal se mantenía con una actividad cerebral normal y en el que se alternaban los periodos de sueño y de vigilia (ref. ver Velayos y cols, 2003). El siguiente paso de esta directriz fueron las transecciones del tallo cerebral inmediatamente por debajo del sistema reticular activador ascendente. La transección del núcleo pontino medio produjo un incremento definitivo en la conducta y en el registro electroencefalográfico característico de la vigilia (Batini y cols, 1958). Estos descubrimientos postularon así la existencia de estructuras especializadas en la generación del sueño localizadas en el tallo cerebral inferior. De esta forma, en 1960 la mayoría de los neurofisiólogos aceptaron la hipótesis de la existencia de mecanismos inductores de sueño los cuales pueden activamente disminuir la actividad del sistema reticular activador ascendente. La teoría activa del sueño fue apoyada por los trabajos realizados en gatos, en los que se observó que la estimulación eléctrica de un área bien definida en el diencefalo producía sueño conductual y electrográfico (Hernández-Peón, 1962).

Aunque no existe una teoría global comprobada que explique el ciclo sueño vigilia, se han realizado varios estudios en diferentes grupos de vertebrados para caracterizar la presencia o ausencia de sueño de ondas lentas (SOL) y sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR) y para realizar un comparativo con la arquitectura del sueño conocida en roedores y humanos. Los peces y anfibios pasan por periodos de reposo acompañados de un

descenso en la respuesta ante estímulos del entorno. Sin embargo, no se ha podido demostrar que existan diferencias claras entre el sueño y la vigilia de estos grupos. Los reptiles presentan características conductuales propias del sueño y los resultados de los registros electroencefalográficos son similares al SOL de los mamíferos y en algunos casos se han registrado episodios breves de un estado muy parecido al sMOR (Garau y cols, 2005). Las aves tienen periodos alternados de ambas fases de sueño, aunque los periodos de sMOR son muy pocos y ocupan una pequeña parte del tiempo total de sueño. Por el contrario, todos los mamíferos presentan los dos tipos de sueño bien desarrollados. Con excepción de especies muy primitivas, como el equidna, en donde la presencia de sMOR ha estado bajo discusión (Siegel, 1995).

Actualmente no podemos considerar una teoría pasiva o activa para determinar los procesos que determinan la aparición de los diferentes estados en el ciclo sueño vigilia, sin embargo existe una gran cantidad de evidencias que han permitido el conocimiento de la activación o inactivación de muchos grupos neuronales en varias regiones cerebrales a lo largo de este ciclo.

## II. ANTECEDENTES

### A. Generalidades del ciclo sueño-vigilia

Para definir el sueño tenemos que describir las variaciones en la actividad eléctrica cerebral. En la actualidad, un registro de sueño debe considerar al menos, los siguientes parámetros: electroencefalograma (EEG) o actividad cortical, electrooculograma (EOG) para registro de movimientos oculares y electromiograma (EMG) para registro de tono muscular. Otros parámetros que pueden registrarse son la frecuencia cardiaca y respiratoria así como la presencia de actividad en regiones específicas del cerebro como las ondas ponto-geniculo-occipitales (PGO). A partir de los datos del EEG se puede obtener un análisis del espectro de frecuencia. Este análisis utiliza una función matemática llamada Transformación de Fourier para convertir los datos del EEG y clasificarlos en 4 bandas de frecuencia: a) ritmo delta (0.5 - 3.9 Hz), b) ritmo theta (4 - 7.9 Hz), c) ritmo alfa (8 - 12.9 Hz) y d) ritmo beta (13 - 20 Hz).

El ciclo sueño vigilia del humano consiste de seis etapas (Rechtschaffen y Kales, 1968) que se caracterizan de la siguiente manera:

- a) Vigilia: en el EEG se observan frecuencias mezcladas de ritmos alfa y beta. Generalmente el tono muscular esta elevado y no se presentan movimientos oculares rápidos.
- b) Sueño de ondas lentas I (SOL I): El EEG presenta actividad de bajo voltaje (50-75  $\mu$ V) y una frecuencia entre 5 y 7 Hz, ocasionalmente aparecen ondas con amplitud mayor que 200  $\mu$ V.
- c) SOL II: se presentan los llamados husos de sueño, los cuales presentan frecuencia de 12-14 Hz, duración mínima de 5 segundos y están formados por 6-7 ondas.

d) SOL III y e) SOL IV: estas dos etapas varían de acuerdo a su duración y se caracterizan por la presencia de ritmo delta.

f) Sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR): el EEG presenta actividad de bajo voltaje, similar a la vigilia, con presencia de movimientos oculares y atonía muscular.

La investigación básica del sueño se ha llevado a cabo principalmente en ratas y gatos. El fenómeno del sueño en la rata ha sido subdividido solamente en las siguientes fases: SOL y sMOR. Tanto el SOL como el sMOR presentan patrones conductuales, electrofisiológicos y bioquímicos diferentes. Durante el SOL la actividad cerebral esta constituida por ondas de gran amplitud (150-250  $\mu$ V) y baja frecuencia disminuyendo la actividad muscular, mientras que el sMOR se caracteriza por tener un EEG de ondas rápidas y bajo voltaje (50-150  $\mu$ V) presentando además atonía muscular. En la vigilia los animales presentan conductas típicas de su especie así como una actividad electrográfica de bajo voltaje (30-50  $\mu$ V) junto con un elevado tono muscular.

Otros parámetros electrofisiológicos que se presentan durante el ciclo sueño vigilia incluyen a los movimientos oculares, registrados por el EOG, los cuales disminuyen en frecuencia durante el SOL y aparecen abruptamente formando ráfagas durante el sMOR. La actividad muscular es un parámetro evaluado por medio del EMG. Esta actividad se observa elevada en la vigilia, se reduce durante el SOL y desaparece totalmente durante el sMOR; sin embargo, durante esta última fase se presentan fuertes sacudidas musculares en las extremidades, conocidas como mioclonías. Algunas funciones como la respiración y el ritmo cardíaco disminuyen su frecuencia al transitar de la vigilia al SOL hasta presentar arritmias durante el sMOR. Incluso, la temperatura

corporal también sigue un ritmo asociado con la vigilia y el sueño (Orem, 1980; Orem y cols, 2002).

En la rata, la transición de SOL a vigilia tiene una duración corta y consiste en una disminución de la amplitud e incremento en la frecuencia de las ondas registradas en el EEG, precedida de un incremento abrupto del tono muscular; por otra parte, la transición de vigilia a SOL no muestra una clara sincronización ininterrumpida del EEG, sino que está marcada por la aparición episódica de ondas en huso. Las ondas lentas aparecen generalmente uno o varios minutos después de la presentación de los husos. La transición de SOL a sMOR está marcada por un periodo corto, durante el cual el EEG está todavía sincronizado, aún sin indicios de atonía muscular pero con la presencia de ondas PGO de gran amplitud. Cuando el sMOR está completamente desarrollado, la desincronización cortical es evidente y el tono muscular se abate totalmente.

## **B. Vigilia**

En general, los animales en vigilia presentan características conductuales particulares como cabeza erguida con respuestas rápidas a estímulos del medio ambiente, ojos abiertos y ritmo respiratorio rápido e irregular. La fase de vigilia en los mamíferos se divide en activa y pasiva. En la activa los animales presentan conductas típicas de su especie y en la pasiva los animales permanecen quietos con los ojos abiertos y alertas a los estímulos significativos del medio ambiente por lo que presentan un umbral bajo para responder a cualquier estímulo sensorial (Jouvet, 1967).

La vigilia activa en la rata se caracteriza por una actividad de frecuencia variable en un rango de 11.5 a 30 Hz con un voltaje medio que varía de 30 a 50

$\mu\text{v}$ . La vigilia pasiva se distingue por el contrario por un ritmo rápido y de bajo voltaje. En el EMG se presenta una gran actividad, es decir, la amplitud se observa con un voltaje elevado. En el EOG se puede observar una cantidad elevada de movimientos oculares debido a la exploración continua del medio ambiente y a los estímulos percibidos (Jouvet, 1967).

### **C. Sueño de Ondas Lentas (SOL)**

EL SOL presenta patrones conductuales claramente definidos, la rata se encuentra echada, la pupila se contrae y es muy rara la presencia de movimientos oculares rápidos. Se ha observado que la respiración se torna profunda y lenta, mientras que la presión arterial disminuye y el umbral para reaccionar a los estímulos se encuentra elevado en relación con el estado de vigilia (Orem y cols, 2002; ref. ver Harris, 2005).

El registro de las oscilaciones electrográficas del SOL se caracteriza por los husos de sueño y el ritmo delta sincrónico con frecuencias de 1 a 4 Hz. Conforme avanza el sueño, estos husos se entremezclan con oscilaciones electrográficas lentas ( $> 1$  Hz) de alto voltaje (100 a 250  $\mu\text{v}$ ) que predominan en la corteza frontal, núcleo reticular talámico, hipocampo y formación reticular pontina y mesencefálica (Jouvet, 1967; Nuñez- Molina y Amzica, 2004). En el registro del EMG, la actividad muscular disminuye en comparación con la observada en la vigilia y esta disminución se acentúa conforme avanza el tiempo en el cual el animal permanece en esta fase. El registro del EOG presenta una actividad esporádica y lenta.



#### **D. Sueño de Movimientos Oculares Rápidos (sMOR)**

Durante este estado, aparecen movimientos rápidos de los ojos, orejas, vibras y extremidades, la respiración se vuelve irregular y con periodos cortos de apnea (Orem y cols, 2002). La posición característica que adopta la rata se denomina de "ovillo". Una de las características electrofisiológicas del sMOR es la actividad cortical que se presenta. Estudios pioneros (Derbyshire y cols, 1936) clasificaron los cambios eléctricos durante la vigilia y el sueño en gatos no anestesiados y observaron periodos de actividad cortical rápida de bajo voltaje, similar a la que aparece durante la vigilia, pero en momentos en los que el sueño parecía mas profundo. Estas oscilaciones electrográficas corticales desincronizadas (20 a 30 Hz) y de baja amplitud, paradójicamente similares a las de la vigilia, son características del sMOR. Unos segundos antes de finalizar el SOL aparecen de manera fásica, espigas de gran amplitud conocidas como PGO. Cuando el sMOR esta completamente desarrollado, las espigas PGO aparecen como potenciales individuales o agrupados como potenciales de pequeña amplitud, la desincronización cortical es evidente y el tono muscular se abate totalmente (Hess y cols, 1953).

#### **E. Neuroquímica del ciclo sueño-vigilia**

A lo largo de la historia se ha realizado una gran cantidad de estudios para tratar de determinar las estructuras neurales y los sistemas neuroquímicos involucrados en la regulación del sueño y la vigilia. Los trabajos pioneros de Moruzzi y Magoun (1949) demostraron que la estimulación eléctrica de la formación reticular en animales dormidos bloqueaba la actividad cortical lenta sincronizada y la sustituía por un estado desincronizado de bajo voltaje asociado con la vigilia. Estas observaciones llevaron a una hipótesis, la cual

proponía que un sistema ascendente, localizado dentro de la región de la formación reticular podría ser el responsable de la aparición de la vigilia y el control del estado conductual. Los estudios actuales han proporcionado evidencia extensa acerca de la regulación del estado conductual, el cual es modulado por una serie de interacciones que involucran múltiples sistemas neuronales neuroquímicamente distintos localizados a lo largo del cerebro. Hasta la fecha se conocen varias moléculas de naturaleza peptídica con propiedades hipnogénicas, las cuales se han denominado “factores inductores de sueño” (ref. ver García-García y Drucker-Colín, 1999). Sin embargo, en esta sección solo nos enfocaremos en los sistemas de neurotransmisión relacionados hasta ahora, con la regulación del ciclo sueño-vigilia.

### **Noradrenalina (NA)**

El *locus coeruleus* (LC) es un núcleo pontino par compuesto exclusivamente de neuronas noradrenérgicas. Aunque existen otros núcleos noradrenérgicos, la mayoría de la investigación sobre la regulación noradrenérgica del estado conductual se ha concentrado en el LC. Este núcleo es el sitio principal de proyecciones eferentes a la mayoría de las estructuras del cerebro anterior que son inervadas por neuronas noradrenérgicas (Foote y cols, 1983). Las neuronas del LC exhiben actividad dependiente del estado, es decir las tasas de disparo más altas se observan durante la vigilia, tasas más bajas durante el SOL y el cese casi completo de la tasa de disparo durante el sMOR (Aston-Jones y cols, 1981). Inclusive, los niveles extracelulares de NA son linealmente proporcionales con la actividad neuronal de LC (Berridge y Abercrombie, 1999).

Existe un gran número de reportes los cuales sugieren que las neuronas noradrenérgicas del LC son un elemento principal en la regulación de la vigilia y los despertares. Incluso, varios reportes han proporcionado evidencia sobre un importante papel de las neuronas noradrenérgicas del LC en la regulación circadiana del estado de alerta y el desarrollo cognitivo durante la vigilia (Aston-Jones, 2005). El LC contribuye a la iniciación y mantenimiento de un estado conductual (vigilia) y de actividad neuronal apropiado para la colección de información sensorial. Por otro lado, dentro de la fase de vigilia, este sistema modula la colección y procesamiento de información sensorial saliente, por medio de una diversidad de acciones dependientes de la concentración dentro de circuitos corticales y subcorticales (ref. ver Berridge y Waterhouse, 2003b). Además, se ha observado que el mantenimiento de la función del LC depende de la exposición a la luz, lo cual está mediado por un circuito indirecto desde el núcleo supraquiasmático hasta el LC (González y Aston-Jones, 2006).

La NA se enlaza a dos diferentes clases de receptores denominados  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos. A su vez, estos pueden subdividirse en varios subtipos:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Los receptores adrenérgicos son los clásicos receptores acoplados a proteínas G. Los receptores  $\beta$ - son postsinápticos y no se ha podido diferenciar su efecto fisiológico. Los tipo  $\alpha_1$  son postsinápticos y los tipo  $\alpha_2$  son presinápticos, de tal forma que es fácil entender el efecto autorregulador de los receptores  $\alpha_2$  y el efecto excitador de los tipo  $\alpha_1$  (Weiner y Molinoff, 1989).

Los estudios farmacológicos que utilizan diversos agentes para manipular la neurotransmisión noradrenérgica, también han aportado evidencia acerca del papel de la NA en la regulación del sueño y la vigilia. La microinyección de yohimbina, un antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, origina un incremento en la

actividad del LC e índices conductuales y electrográficos de vigilia (Berridge y cols, 1991). También se ha observado que la infusión intracerebroventricular (ICV) de NA, el agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina o el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol producen incrementos similares en la vigilia (Berridge y cols, 2003a). La aplicación de metoxamina, que tiene un efecto estimulante sobre los adrenoreceptores- $\alpha_1$ , disminuye el sMOR en ratas (Pellejero y cols, 1984). La inactivación bilateral del LC por medio de la infusión de clonidina, un agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, produce un incremento significativo en la frecuencia lenta del EEG y sedación (Berridge y cols, 2000). Las drogas que estimulan la liberación o bloquean la recaptura de NA incrementan o prolongan la vigilia y son usadas para tratar la hipersomnolencia. El modafinil es la más usada recientemente y al parecer también incrementa la neurotransmisión mediada por NA (Gallopín y cols, 2004).

Todos estos estudios farmacológicos han sugerido que las neuronas noradrenérgicas en el LC juegan un papel en la regulación de la vigilia.

### **Serotonina (5-HT)**

Las neuronas serotoninérgicas están distribuidas a lo largo de los núcleos del rafe (grupos de neuronas que se extienden desde el mesencéfalo hasta la medula) y proyectan ampliamente a lo largo de todo el cerebro. A finales de los años 60's, este neurotransmisor se involucró en la generación de sueño a partir de los trabajos pioneros de Jouvet (1969). En el inicio se consideró que participaba únicamente en la regulación del SOL debido al insomnio observado después de la lesión de los núcleos del rafe.

El papel funcional de la 5-HT en relación al ciclo sueño-vigilia ha sido ampliamente estudiado en gatos y ratas. En ambas especies, la tasa de

disparo de las neuronas serotoninérgicas y la concentración de 5-HT extracelular en el rafe dorsal es consistentemente más alta durante la vigilia, disminuye progresivamente a lo largo del SOL y alcanza su mínima concentración durante el sMOR (Jacobs y cols, 1991; Portas y cols, 2000; Levine y cols, 1992). Lo anterior sugiere que este sistema tiene participación en el mantenimiento de la vigilia, la regulación del tono muscular y en la regulación de algunos de los eventos fásicos del sMOR. La actividad tónica de las neuronas serotoninérgicas durante la vigilia suprime los eventos fásicos y su inactividad durante el sMOR permite que la actividad eléctrica de alto voltaje (espigas PGO) se propague desde el puente hasta el tálamo y la corteza (Wu y cols, 2004). Esta hipótesis ha sido apoyada por algunos estudios farmacológicos; se ha observado que la administración sistémica de agonistas serotoninérgicos como 8-OH-DPAT y RU 24969, incrementa la vigilia y esto es probablemente por medio de acciones sobre receptores serotoninérgicos postsinápticos (Dzolic y cols, 1992). Asimismo, la activación de otro tipo de receptores serotoninérgicos por medio de CGS 12066B, CP 94,253 y m-clorofenilbiguanida origina incrementos similares en la vigilia (Dugovic y cols, 1989; Ponzoni y cols, 1993). De acuerdo con la hipótesis que el sistema serotoninérgico está involucrado en la vigilia, se ha observado que la reducción en la neurotransmisión serotoninérgica produce sedación. Así, la administración de los antagonistas ritanserina y GR 127935 reduce la vigilia e incrementa el SOL (Dugovic y cols, 1989).

El origen de los cambios sobre la concentración de 5-HT en los núcleos del rafe a lo largo del ciclo sueño vigilia aún no está claramente definido, pero existe evidencia que la disminución de la neurotransmisión serotoninérgica durante el SOL esta mediada por la activación de una entrada inhibitoria en el

núcleo rafe dorsal (Gervasoni y cols, 2000). Sin embargo, aún queda por determinar si el cese de la descarga de las neuronas serotoninérgicas es el resultado de un incremento en el tono GABAérgico (Nitz y Siegel, 1997) o de una disfacilitación de las entradas excitatorias.

## **Acetilcolina**

En los últimos años ha sido bien documentada la importancia del sistema colinérgico en la generación del sueño, principalmente en el sMOR. La acetilcolina fue involucrada en la regulación del sueño a partir de los trabajos de Hernández-Peón (1962). Estos primeros reportes demostraron que la estimulación de diferentes áreas del cerebro con cristales de acetilcolina originaba la presencia de SOL y sMOR. Los núcleos tegmentales pedunculopontinos (PPT) y laterodorsales (LDT) contienen neuronas colinérgicas que están involucradas en la regulación del estado conductual. La actividad en estas neuronas es mayor durante la vigilia y sMOR (es decir, cuando los patrones de disparo corticales están desincronizados) y muy baja durante el SOL (Steriade y cols, 1990). Las neuronas del PPT y LDT proyectan hacia el tálamo, donde se ha observado mediante estudios con microdiálisis que los niveles de acetilcolina son elevados durante la vigilia y el sMOR (Williams y cols, 1994). Existe otra población de neuronas colinérgicas que proyectan principalmente hacia la corteza e hipocampo. Las fluctuaciones en los niveles extracelulares de acetilcolina en la corteza e hipocampo son similares a los observados en el tálamo a lo largo del ciclo sueño vigilia (Marrosu y cols, 1995).

Los receptores colinérgicos han sido divididos en dos tipos: los *muscarínicos* y los *nicotínicos*. Estos términos se refieren a los efectos de la

muscarina, sustancia proveniente de un hongo (*Amanita muscaria*) y que tiene efectos similares a los de la nicotina contenida en el tabaco. La muscarina, en general, estimula los receptores colinérgicos, mientras que la nicotina primero los estimula y después los desensibiliza. Los receptores muscarínicos están subdivididos en M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub> y los nicotínicos en N<sub>N</sub>, N<sub>M</sub>. En el cerebro, estos receptores se localizan en corteza, cuerpo estriado, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, mesencéfalo, medula, puente, sustancia nigra, LC, septum (Taylor y Brown, 1989).

Los estudios farmacológicos que manipulan la neurotransmisión colinérgica han ofrecido gran cantidad de evidencia para establecer el papel de la acetilcolina en el control del sueño y la vigilia. La microinyección de agonistas muscarínicos no selectivos como oxotremorina, cis-metil-dioxolano y carbacol o la anticolinesterasa neostigmina en la formación reticular pontina medial produce sMOR (Velázquez-Moctezuma y cols, 1989; Baghdoyan y cols, 1997). Algunos de estos efectos pueden ser bloqueados con atropina, un antagonista muscarínico no selectivo. De acuerdo con estas observaciones, se ha descrito que algunos antagonistas muscarínicos como quinuclidinil benzilato y metoctramina reducen el sMOR e incrementan la vigilia, posiblemente a través del bloqueo de receptores muscarínicos tipo M<sub>2</sub> (Imeri y cols, 1994; Coleman y cols, 2004).

Las neuronas colinérgicas también participan en la atonía muscular del sMOR a través de las vías descendentes que reducen el tono muscular. Las neuronas del PPT, LDT y áreas adyacentes utilizan acetilcolina y otros neurotransmisores para activar a las neuronas de la médula medial responsables de la atonía (Morales y cols, 1987). Estas neuronas medulares subsecuentemente liberan glicina durante el sMOR en las neuronas motoras

espinales y del tallo cerebral, de esta manera producen hiperpolarización e inhibición (Curtis y cols, 1968).

### **Ácido Gama Amino Butírico (GABA)**

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central y se ha establecido que la activación de algunos receptores para GABA favorece el SOL y sMOR. Las benzodiazepinas (triazolam, diacepam, clonacepam) y barbitúricos (pentobarbital) incrementan la señalización GABAérgica interactuando con el complejo receptor GABA<sub>A</sub> y de esta forma promueven el sueño (Gauthier y cols, 1997; Gottesman y cols, 1998). Aunque estos fármacos han sido usados extensivamente para el tratamiento del insomnio, provocan varios efectos laterales que incluyen alteraciones en la arquitectura del sueño, presencia de rebote en el insomnio, problemas en la memoria y síndrome de abstinencia. En los años noventas, fue introducido un nuevo grupo de hipnóticos no benzodiazepínicos para el tratamiento del insomnio. En roedores y humanos, estos nuevos fármacos reducen la latencia al sueño e incrementan el tiempo total en SOL (Gottesman y cols, 1998).

La influencia más específica del GABA sobre los mecanismos del sueño ha sido estudiada principalmente por medio de la acción de sus agonistas. Lancel y cols. (1996, 1997) encontraron un incremento de SOL y sMOR después de la aplicación de los agonistas de GABA, muscimol y gaboxadol. Incluso, se ha observado que en el área hipotalámica posterior existe un incremento en la liberación de GABA durante el SOL (Nitz y Siegel, 1996). Las neuronas del hipotálamo anterior, activas durante el sueño, son GABAérgicas e inervan múltiples regiones promotoras de la vigilia, incluyendo el LC, rafe dorsal, PPT/LDT y posiblemente neuronas hipocretinérgicas del hipotálamo lateral.



Estas neuronas GABAérgicas pueden regular el sueño por medio de la inhibición de estos sistemas involucrados en la vigilia y los despertares (Sherin y cols, 1998). Otros datos sugieren que neuronas GABAérgicas del tallo cerebral pueden ser responsables de la inhibición de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas durante el sMOR. Nitz y Siegel (1997a, 1997b) mostraron concentraciones altas de GABA durante el sMOR en el núcleo del rafe dorsal y en el LC. Estos datos sugieren que la inhibición GABAérgica de estas áreas monoaminérgicas podría ser suficiente para la aparición de episodios de sMOR.

## **Histamina**

Varios estudios inmunohistoquímicos han mostrado que la histidina descaboxilasa, y por lo tanto las neuronas histaminérgicas, están localizadas en el hipotálamo posterior de ratas y gatos (Watanabe y cols, 1984; Senba y cols, 1985).

Las neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar proyectan ampliamente en el cerebro y tienen un papel importante en el mantenimiento de la vigilia. De manera similar a las neuronas del LC, las neuronas histaminérgicas muestran una actividad dependiente del estado. Así, las tasas de disparo y la liberación de histamina son más altas durante la vigilia, menores en SOL y permanecen casi inactivas durante el sMOR (Saper y cols, 2001). Sin embargo, en contraste con los grupos neuronales monoaminérgicos, las neuronas histaminérgicas están activas en la cataplexia (síntoma asociado con la narcolepsia en el cual el tono muscular se pierde) a un nivel similar o mayor que en la vigilia (John y cols, 2004). Por lo que se puede plantear que la

actividad de las neuronas histaminérgicas esta relacionada con el mantenimiento de la vigilia.

Algunos estudios han demostrado que la administración de histamina y drogas que incrementan la neurotransmisión histaminérgica incrementan la activación cortical y la vigilia además de que reducen el SOL y sMOR (Monti y cols, 1986). En contraste, la inyección intraperitoneal (IP) de mepiramina, un antagonista de los receptores H1, incrementa el SOL y el sMOR, asimismo disminuye la vigilia (Lin y cols, 1988). Estos estudios sugieren que el sistema histaminérgico en el hipotálamo juega un papel muy importante en los mecanismos de la vigilia y sus acciones están reguladas por medio de los receptores H1 (Goodwin y Gren, 1985).

### **Hipocretinas**

Los neuropéptidos excitatorios relacionados con el control del sueño y más recientemente descubiertos son las hipocretinas 1 y 2, también conocidos como orexinas A y B. Estos péptidos son exclusivamente sintetizados por neuronas en el hipotálamo lateral y posterior. Dichas neuronas proyectan ampliamente a núcleos histaminérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos y de esta forma juegan un papel importante en la regulación del sueño y la vigilia (De Lecea, 1998). Estas moléculas fueron originalmente relacionadas con el sueño cuando se encontró que la pérdida de neuronas hipocretinérgicas estaba relacionada con la narcolepsia humana. La mayoría de los narcolépticos con cataplexia exhiben una pérdida de aproximadamente el 90% de neuronas que sintetizan hipocretina (Thannickal y cols, 2000).

Recientemente se observó en registros *in vivo* que las neuronas orexinérgicas descargan durante la vigilia, cuando el tono muscular es alto;

disminuyen la descarga durante la vigilia pasiva y en ausencia de movimiento y virtualmente cesan la tasa de disparo durante el sueño, cuando el tono muscular es bajo o ausente. Durante el sMOR permanecen relativamente silentes e incrementan su disparo antes del final del episodio de sMOR y de esta forma "anuncian" el regreso de la vigilia y del tono muscular (Lee y cols, 2005).

La expresión de c-fos junto con la determinación de los niveles de hipocretinas en el líquido cefalorraquídeo, sugieren que estas neuronas están más activas durante la vigilia, particularmente durante periodos de alta actividad locomotora (Estabrooke y cols, 2001). Se ha observado que la administración de hipocretina-1 y 2 en el ventrículo lateral, el LC o el tallo cerebral incrementa la vigilia y la actividad conductual mientras que suprime el SOL y sMOR (Hagan y cols, 1999). Dada su inervación y excitación de otros "sistemas de vigilia", las neuronas orexinérgicas parecen tener un papel principal en la estimulación y mantenimiento de la vigilia.

### **Adenosina**

La adenosina es otro neurotransmisor que ha sido involucrado en la regulación del sueño. Se ha descrito que la vigilia prolongada incrementa la concentración de adenosina mientras que los niveles disminuyen durante la subsiguiente recuperación del sueño (Porkka-Heiskanen y cols, 1997). La administración exógena de adenosina o de fármacos agonistas de los receptores para adenosina, originan un aumento de SOL y retraso de sMOR tanto en ratas como en humanos. Por otro lado, fármacos antagonistas de adenosina, como las metilxantinas (cafeína, teofilina), reducen el sueño (Schwierin y cols 1996). Se ha demostrado que la adenosina inhibe la actividad

de las células del complejo PPT/LTD (Rainnie y cols, 1994). Este hecho sugiere que el efecto inductor de sueño de la adenosina depende en parte de la inhibición de los sistemas colinérgicos que regulan la vigilia y el SMOR.

## **F. Metabolismo del Etanol y Acetaldehído**

El acetaldehído (ACH), es una molécula altamente reactiva, tiene un olor irritante y es soluble en agua y etanol. Es utilizado en la industria para la manufactura de paraldehído, ácido acético y perfumes. En seres humanos, existen concentraciones de ACH endógeno mínimas, muy por debajo de las que se alcanzan en hígado, sangre y cerebro después de la ingestión de etanol y se ha determinado que es mucho más tóxico que el etanol con una dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 1930 mg/kg por vía oral en ratas (Smyth y cols, 1951).

El ACH es el primer metabolito del etanol, es un compuesto biológicamente muy activo y recientemente se ha especulado que juega un papel muy importante en los efectos tóxicos provocados por la administración de etanol. Aunque muchos órganos muestran propiedades enzimáticas para la degradación del etanol, la mayor parte de este (más del 90%) se metaboliza en el hígado y del 2-10% es eliminado por pulmones y riñones (Lieber, 1997).

El primer paso en el metabolismo enzimático fundamental del etanol está mediado por la enzima citosólica alcohol-deshidrogenasa, la cual cataliza la conversión de etanol a ACH y está acoplada con la reducción de nicotinadenosin-dinucleótido ( $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ ). El siguiente paso del metabolismo está mediado principalmente por la acción de la aldehído-deshidrogenasa. Esta enzima rápidamente convierte el ACH a acetato. La aldehído-deshidrogenasa también usa  $\text{NAD}^+$  como cofactor en la oxidación del ACH. Finalmente, la acetato-tiocinasa metaboliza al acetato en acetil coenzima A que se

incorpora al ciclo de Krebs para formar CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O o bien es utilizada para la síntesis de ácidos grasos u otros constituyentes (Figura 1) (ref. ver Hunt, 1996).

Aparte del aparato enzimático mencionado, existen otros dos sistemas que catalizan la conversión de etanol a ACH: el citocromo P450 y la catalasa (Warner y Gustafsson, 1994; Aragon y cols, 1992; Lieber, 1997). El citocromo P450 es un complejo enzimático involucrado en la detoxificación de drogas y toxinas en el hígado y puede expresarse en varias formas. La forma mas involucrada en el metabolismo del etanol es el citocromo P450 2E1. Este citocromo ha sido identificado en el cerebro y puede ser encontrado en neuronas y glía (Hansson y cols, 1990). La catalasa funciona como regulador de los niveles de peroxido de hidrogeno y se ha demostrado que en presencia de este compuesto, el etanol puede ser oxidado hasta ACH *in vitro* por acción de la catalasa (Keilin y Martree, 1945).

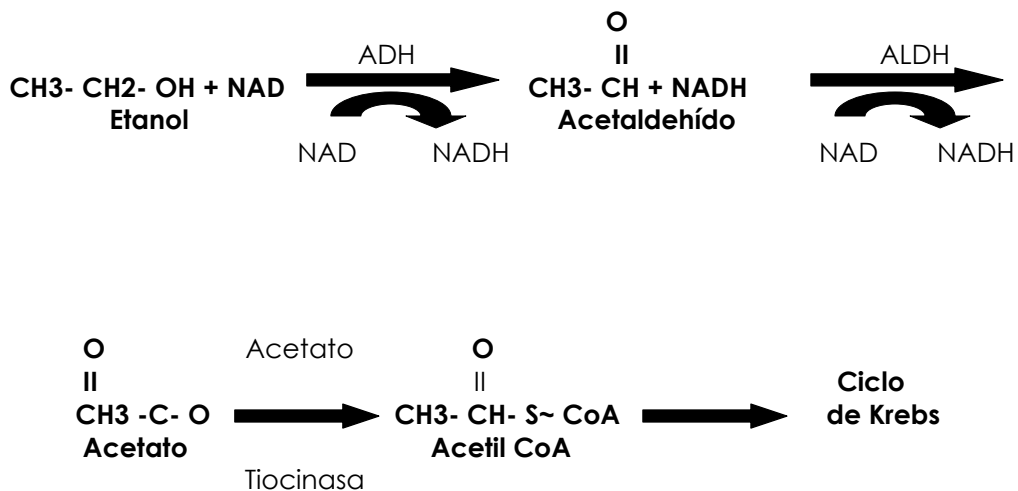


Figura 1. Esquema del metabolismo fundamental del etanol. La enzima citosólica alcohol-deshidrogenasa (ADH) cataliza la conversión de etanol hasta acetaldehído, esta reacción esta acoplada con un aceptor de hidrogeno NAD que es reducido hasta NADH. Después el acetaldehído es transformado a acetato a través de la aldehído-deshidrogenasa (ALDH) utilizando NAD como cofactor. Finalmente, la acetato-tiocinasa metaboliza al acetato en acetil coenzima A.

Se ha propuesto que el ACH derivado del metabolismo del etanol en el hígado penetra desde el torrente sanguíneo hasta el cerebro con dificultad debido a la presencia de la aldehído-deshidrogenasa en la barrera hematoencefálica (Zimatkin, 1991). Para sobrepasar dicha barrera metabólica son necesarias concentraciones muy altas de ACH ( $>100 \mu\text{M}$ ) (Tabakoff y cols, 1976). Estas concentraciones probablemente se alcanzan cuando se inyectan dosis altas de ACH por vía IP; incluso, se han observado niveles muy altos de ACH en ratas inyectadas con etanol después de la inhibición de la aldehído-deshidrogenasa (Jamal y cols, 2003). Por otro lado, en pacientes alcohólicos crónicos se han detectado niveles de ACH tan altos como  $30 \mu\text{M}$  (Hatake y cols, 1990), más aún existe un reporte de individuos japoneses con niveles de ACH en sangre equivalentes a  $548 \mu\text{M}$  (Watanabe y cols, 1985).

Existe discusión acerca de la capacidad del ACH para atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo, en varios estudios se ha comprobado la formación de ACH a través del metabolismo de etanol directamente en el cerebro. La evidencia experimental apunta hacia la oxidación central del etanol por medio del sistema catalasa- $\text{H}_2\text{O}_2$  como un factor importante para explicar los efectos neurotóxicos observados después de la administración de etanol. Se ha demostrado que el etanol es metabolizado a ACH en homogenizados de cerebro de rata (Aragon y cols, 1992) así como en cultivos de tejido neuronal (Hamby-Mason y cols, 1997) por medio de la actividad peroxidativa de la catalasa. Otras vías podrían estar también involucradas en el metabolismo del etanol y en la producción de ACH en el cerebro. Un estudio reciente reportó la presencia de alcohol-deshidrogenasa dentro de regiones muy específicas del cerebro de la rata como cerebelo, hipocampo y corteza, estos datos sugieren que esta enzima podría estar contribuyendo a la

producción de ACH en estas áreas (Martinez y cols, 2001). En conclusión, el ACH puede acumularse en el cerebro después de la inyección de dosis altas y mediante el propio metabolismo del etanol localizado en el cerebro.

### **G. Efectos del Acetaldehído en el cerebro**

En general se ha asumido que los efectos conductuales y neuroquímicos descritos después de la ingesta o administración de alcohol son debidos a la acción *per se* del etanol en el sistema nervioso central. Sin embargo, desde hace varios años muchos estudios han postulado el papel que podría tener el ACH sobre algunos de los efectos provocados por el etanol, no obstante aún no se ha establecido por completo la participación que tiene este metabolito.

La mayoría de los estudios de locomoción han reportado efectos depresivos después de la administración periférica de ACH. Holtzman y Schneider (1974) fueron los primeros en medir efectos depresivos locomotores en el primer minuto después de la administración intravenosa de ACH. Estudios posteriores han mostrado que los efectos depresivos del ACH aparecen con dosis mayores que 50 mg/kg de peso (Quertemont y cols, 2005). Las inyecciones IP de ACH inducen depresión locomotora dosis-dependiente en ratones de las cepas C57 y CD1. Incluso, se demostró que ratones pretratados con cianamida, un inhibidor de la aldehído-deshidrogenasa, presentan disminución en los niveles de actividad locomotora después de la administración de 2-3 g/kg de etanol (Quertemont y cols, 2004). Estos resultados muestran claramente que el incremento en la concentración de ACH en sangre y cerebro ocasionado por la inhibición de la enzima aldehído-deshidrogenasa potencia los efectos depresivos locomotores del etanol.

Estos resultados indican que el ACH es principalmente una droga depresora y que podría de esta forma contribuir con los efectos sedantes y depresores del etanol. Sin embargo, existe controversia por los efectos que se presentan ya que estos dependen de la vía de administración. De esta forma, el ACH parece ser principalmente depresor cuando se inyecta periféricamente, mientras que es un estimulante cuando se perfusa directamente en el cerebro. Se ha observado que el ACH administrado en los ventrículos laterales incrementa la actividad locomotora. Las infusiones ICV de ACH pueden producir un patrón de activación motora a dosis moderadamente bajas, inclusive, el ACH induce incremento en la conducta exploratoria (Correa y cols, 2003). Este resultado es similar al efecto producido por la administración ventricular de etanol. Aún no existe una explicación para comprender las discrepancias observadas en los resultados. Claramente se necesitan más estudios para entender las diferencias en los efectos observados después de la administración central o periférica de ACH.

La intoxicación por alcohol induce un amplio rango de efectos sobre la memoria, desde defectos en la memoria a corto plazo después del consumo de cantidades moderadas de etanol hasta lagunas o completa incapacidad para formar recuerdos a largo plazo. A nivel molecular, se ha sugerido que el etanol daña la memoria a través de la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP, siglas en inglés). El LTP es un incremento duradero de la eficacia sináptica y es a menudo descrito como la base molecular potencial de la memoria (Goosens y Maren, 2002). Varios estudios han mostrado que el etanol inhibe de manera dosis-dependiente el LTP tanto *in vivo* como *in vitro* (Blitzer y cols, 1990). Existen muy pocos estudios que han investigado el papel del ACH en el desajuste de la memoria inducido por el etanol. Quizá el más significativo



es el publicado por Abe en 1999, en donde se muestra que el ACH, al igual que el etanol, inhibe *in vivo* la inducción de LTP en el giro dentado de la rata. Este efecto fue visible después de la administración tanto IP como ICV de ACH, lo que indica que el ACH tiene un efecto directo sobre el cerebro y además que tiene la capacidad de dañar directamente la memoria.

Varios modelos animales han sido desarrollados para probar los efectos reforzadores de las drogas sobre la misma adicción; sin embargo, los protocolos de auto-administración de las drogas y el condicionamiento por un lugar son actualmente los más usados. Debido a la especulación que el ACH tiene un papel importante en el abuso del alcohol, se han realizado varios estudios para tratar de asignar un papel determinante del ACH sobre el reforzamiento de la adicción y la conducta de ingesta alta de etanol. Los primeros estudios reportaron que las ratas podían auto-administrarse ACH (1-5% v/v) directamente en los ventrículos cerebrales (Brown y cols, 1979). También se ha demostrado que la administración periférica de ACH induce la auto-administración en ratas (Myers y cols, 1984), lo cual contradice la hipótesis comúnmente aceptada que la acumulación de ACH en sangre es altamente aversiva. Estos estudios han demostrado que la auto-administración de ACH es mucho más fácil de establecer que la auto-administración de etanol, indicando que el ACH es un reforzador de la adicción más fuerte que su precursor el etanol. Recientemente, se propuso que el ACH es un reforzador de la adicción 1000 veces más potente que el etanol cuando se auto-administra en el área ventral tegmental (Rodd-Hendricks y cols, 2002). Dicha región del cerebro esta involucrada en las acciones reforzadoras del etanol sobre la adicción. Las propiedades reforzadoras del ACH también han sido estudiadas y confirmadas en modelos de condicionamiento por el lugar. Smith y cols

(1984) reportaron que múltiples infusiones ICV de ACH producen preferencia condicionada por el lugar, sugiriendo que el ACH administrado centralmente puede producir efectos reforzadores positivos. De igual forma, se ha descrito que las ratas también exhiben una fuerte preferencia por un lugar o un estímulo que ha sido asociado con inyecciones IP de ACH (20-50 mg/kg) (Quertemont y De Witte, 2001). En conclusión, el acetaldehído muestra principalmente propiedades reforzadoras de la adicción en ratas no importando la ruta de administración, ya sea sistémica o central.

Se ha sugerido que el ACH puede ejercer algunos de sus efectos conductuales a través de algunas alteraciones en la actividad y metabolismo de neurotransmisores; sin embargo esto permanece sin esclarecerse. Existen muy pocos reportes actuales que describan el efecto del ACH sobre el contenido de monoaminas. Los primeros experimentos revelaron que la administración aguda indujo una disminución significativa de NA (Thadani y Truitt, 1977) y de 5-HT (Duritz y Truitt, 1966). No existe evidencia que indique que el ACH interactúa significativamente con la neurotransmisión GABAérgica o glutamatérgica. Mediante la medición de los niveles extracelulares de aspartato, glutamato y GABA se observó que no había alteraciones después de la administración de ACH (Ward y cols, 1997). El sistema mesolímbico dopaminérgico está fuertemente involucrado en el desarrollo de la adicción, de esta forma se ha intentado especular que las propiedades reforzadoras del ACH están mediadas por un incremento en la liberación de dopamina dentro del núcleo accumbens y otras regiones límbicas. De acuerdo con esta idea, recientemente se mostró que el ACH incrementa la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (Foddai y cols, 2004). Se ha reportado que las ratas se auto-administran ACH en el área ventral

tegmental y que esta auto-infusión se reduce con la administración de un agonista de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> (Rodd y cols, 2004). Estos resultados sugieren que las propiedades reforzadoras del ACH están mediadas por la activación de las neuronas dopaminérgicas en el sistema mesolímbico.

Existen muchos estudios que describen la acción aguda y crónica del etanol sobre el ciclo sueño vigilia. Sin embargo, todavía no hay reportes que muestren detalles acerca de los efectos del ACH sobre los parámetros de sueño de la rata y solamente pocos reportes, y obsoletos, han encontrado que el ACH modifica el contenido de monoaminas implicadas en la regulación del sueño (Duritz y Truitt, 1966; Thadani y Truitt, 1977).

### **III. HIPÓTESIS**

La administración de ACH de manera sistémica y en ausencia de etanol, tendrá efectos significativos sobre el ciclo sueño vigilia de la rata disminuyendo el sMOR e incrementando el metabolismo de los neurotransmisores involucrados en la regulación y mantenimiento de los episodios de sMOR.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **A. General**

Establecer si existen modificaciones en el ciclo sueño-vigilia de la rata y en la concentración de monoaminas después de la administración de ACH por vía sistémica.

#### **B. Particulares**

Determinar las alteraciones en los tiempos de vigilia, SOL y sueño MOR en ratas tratadas aguda y crónicamente con ACH.

Evaluar si existe un efecto dosis-dependiente sobre el ciclo sueño vigilia de la rata mediante la utilización de cuatro dosis de ACH.

Establecer si existen alteraciones en la concentración de serotonina y noradrenalina después de la administración de ACH.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **A. Animales**

Para este estudio se utilizaron 144 ratas macho de la cepa Wistar (280-320 g). Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (12 h luz: 12 h oscuridad) y con libre acceso a comida y agua. Todos los animales fueron tratados con las medidas necesarias para minimizar el dolor o sufrimiento de acuerdo con las regulaciones especificadas por el Comité de Uso y Cuidado Animal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y también de acuerdo a los estándares de los Institutos Nacionales de Salud de México.

### **B. Implantación de electrodos**

Los animales fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) por vía IP y fueron colocados en el marco estereotáxico, se realizó una incisión para descubrir el cráneo y fueron implantados electrodos bipolares en la corteza sensoriomotora izquierda para los registros electroencefalográficos (EEG), en los músculos de la nuca para registrar el electromiograma (EMG) y en el borde externo de la órbita ocular para registrar los movimientos de los ojos (EOG). Los electrodos bipolares fueron diseñados con alambre de acero inoxidable cubierto de Teflón (0.005 pulgadas de diámetro) con las puntas descubiertas. Un electrodo fijado con un tornillo en el cráneo fue usado como una fuente indiferente o referencia. Previo a la cirugía, los electrodos fueron soldados a pines y fijados en una estructura rectangular (12 x 6 x 8 mm) la cual fue fijada al cráneo, durante la cirugía, con acrílico dental. Finalmente, las incisiones en la piel fueron suturadas y se aplicó gentamicina por vía intramuscular como medida profiláctica.

Las ratas implantadas con electrodos fueron divididas al azar en grupos agudos y crónicos. El protocolo de estudio agudo fue constituido por los siguientes grupos:

- a) control (n=6) inyectado con solución salina
- b) ACH-1 (n=6) inyectado con 1 mg/kg de ACH
- c) ACH-62.5 (n=6) inyectado con 62.5 mg/kg de ACH
- d) ACH-125 (n=6) inyectado con 125 mg/kg de ACH
- e) ACH-250 (n=6) inyectado con 250 mg/kg de ACH

El protocolo de estudio crónico estuvo constituido por los siguientes grupos:

- a) control (n=6) inyectado diariamente con solución salina durante 30 días
- b) cACH-1 (n=6) inyectado diariamente con 1 mg/kg de ACH durante 30 días
- c) cACH-250 (n=6) inyectado diariamente con 250 mg/kg de ACH durante 30 días.

Las soluciones de ACH fueron realizadas utilizando solución salina como vehículo. Tanto la administración aguda como la última inyección de los grupos crónicos fueron administradas 10 minutos antes del inicio del registro poligráfico de 24 h.

### **C. Estudios poligráficos**

Una semana después de la cirugía, las ratas fueron colocadas en cajas de acrílico (30 x 22 x 22 cm) a prueba de ruidos. Los electrodos fueron conectados a un polígrafo (Grass 78D) por medio de cables flexibles. A los animales se les permitió libre movimiento, libre acceso a comida y agua, además estaban sometidos a condiciones controladas de luz-oscuridad (8:00-

20:00 h luz; 20:00-8:00 h oscuridad). Las ratas fueron habituadas durante 48 h a estas condiciones del laboratorio. Los diferentes estadios del ciclo sueño-vigilia fueron calificados por el experimentador, quien no conocía que grupo se estaba examinando. Los criterios electrofisiológicos fueron los siguientes: vigilia, caracterizada por desincronización en el EEG y presencia de actividad muscular acentuada durante los movimientos; SOL, caracterizado por ondas lentas con un voltaje mayor que 75  $\mu$ V y disminución del tono muscular y SMOR caracterizado por desincronización en el EEG con la presencia de movimiento ocular rápido y atonía muscular. Todos los registros polisomnográficos comenzaron inmediatamente después de la inyección de solución salina o ACH según el grupo y se extendieron durante las siguientes 24 horas.

#### **D. Cuantificación de monoaminas**

El análisis neuroquímico fue realizado de acuerdo al siguiente protocolo: 48 ratas fueron inyectadas (8:00 am) con solución salina (vía IP) y ocho ratas fueron sacrificadas a diferentes tiempos (1, 3, 6, 9, 12 y 24 h después de la inyección) con el objetivo de constituir los grupos control. Otro lote de 48 ratas fueron administradas (8:00 am) con 250 mg/kg de ACH (vía IP) y ocho animales fueron sacrificados a diferentes tiempos (1, 3, 6, 9, 12 y 24 h después de la inyección) para formar los grupos experimentales y compararlos con los controles.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se extrajo el cerebro y se disectó el bulbo, puente, mesencéfalo e hipotálamo de acuerdo a la técnica descrita por Glowinsky e Iversen (1966). Las muestras fueron inmediatamente colocadas en hielo, sonicadas en 1 ml de solución de ácido perclórico 0.4 N con 0.1% (p/v) de metabisulfito de sodio y centrifugadas durante 10 minutos a

15 000 rpm y 4°C. Los sobrenadantes fueron separados y mantenidos en congelación a -70°C en espera del análisis cromatográfico. Los contenidos de NA, 5-HT y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) fueron analizados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado con un detector electroquímico. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer LC-250 con un detector electroquímico Metrohm. Los picos detectados fueron integrados con el software TotalChrom desarrollado por Perkin Elmer. Se utilizaron columnas analíticas para catecolaminas C18 100 mm x 4.8 mm con un tamaño de partícula de 3 µm. La fase móvil estaba constituida de una solución acuosa de búfer de fosfatos (0.1 M, pH 3.2) la cual contenía 0.2 mM de octil sulfato de sodio, 0.1mM de EDTA y 15% (v/v) de metanol. El flujo utilizado fue de 1.2 ml/min y el potencial fue fijado a 0.80 V contra Ag/AgCl electrodo de referencia.

#### **E. Análisis estadístico**

Los grupos control y experimentales usados en los protocolos agudo y crónico de estudios poligráficos fueron comparados con una ANOVA de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. El análisis de la duración de SOL y sMOR cada 3 horas durante 24 horas fue realizado con una ANOVA de dos vías y medidas repetidas considerando el tiempo y el tratamiento como factores. Las comparaciones *post hoc* fueron hechas utilizando una prueba de Tukey. El contenido de monoaminas fue analizado con una ANOVA de dos vías seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.



## VI. RESULTADOS

### A. Administración aguda de ACH y estudios poligráficos

En los estudios de sueño no se encontraron diferencias significativas entre los grupos administrados con las dosis bajas de ACH (1, 62.5 y 125 mg/kg) y el grupo control. Sin embargo, cuando se administró la dosis más alta de ACH (250 mg/kg) se detectaron varias alteraciones significativas en relación con el grupo control, entre ellas una disminución del tiempo total en vigilia,  $F(4,25)=5.70$ ,  $p<0.01$ , un incremento del tiempo total en SOL,  $F(4,25)=9.70$ ,  $p<0.001$ , y el decremento del tiempo total en sMOR,  $F(4,25)=8.10$ ,  $p<0.001$ , (Figura 2).

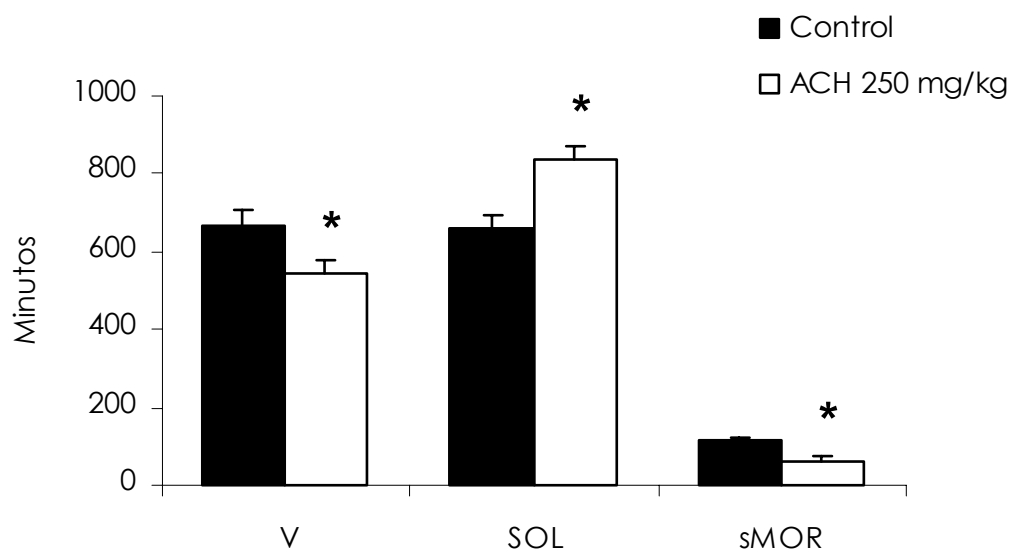


Figura 2. Duración de vigilia (V), sueño de ondas lentas (SOL) y sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR) en registros poligráficos de 24 h del grupo control y después de la inyección aguda de ACH. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  EEM de seis animales por grupo. El análisis estadístico fue llevado a cabo con una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey, \*  $p<0.01$ .

Para determinar en que etapa del ciclo se presentaron las alteraciones de las fases del sueño, se compararon los periodos de luz y oscuridad. Durante el periodo de luz, la administración de 250 mg/kg de ACH disminuyó el tiempo total en sMOR,  $F(4,25)=15.04$ ,  $p<0.001$ , el número de episodios de sMOR,  $F(4,25)=12.61$ ,  $p<0.001$ , y la duración media de los episodios de sMOR,  $F(4,25)=4.15$ ,  $p<0.01$ . Incluso, ambas dosis (125 y 250 mg/kg) de ACH incrementaron significativamente la latencia para presentar el primer episodio de sMOR,  $F(4,25)=49.50$ ,  $p<0.001$ .

También se hallaron alteraciones en el periodo de oscuridad; se encontró una disminución significativa del tiempo total en vigilia,  $F(4,25)=8.98$ ,  $p<0.001$ , y un incremento significativo del SOL,  $F(4,25)=13.37$ ,  $p<0.001$ . Incluso, la duración media de los episodios de SOL incremento significativamente,  $F(4,25)=4.51$ ,  $p<0.01$ . Todos estos efectos solamente se observaron con la administración de la dosis más alta de ACH (250 mg/kg) (Tabla 1).

Tabla 1

Parámetros de sueño registrados a lo largo de un ciclo de 12 h luz:12 h oscuridad in ratas Wistar adultas administradas con dosis agudas de ACH

	Control		ACH 1 mg/kg		ACH 62.5 mg/kg		ACH 125 mg/kg		ACH 250 mg/kg	
	Fase Luz	Fase Oscuridad	Fase Luz	Fase Oscuridad	Fase Luz	Fase Oscuridad	Fase Luz	Fase Oscuridad	Fase Luz	Fase Oscuridad
<b>V</b> (min)	274.5 ± 28.5	392.7 ± 21.0	280.3 ± 16.5	455.9 ± 23.6	287.7 ± 21.1	379.4 ± 20.0	233.8 ± 19.0	395.1 ± 20.8	261.9 ± 18.7	279.3 ± 20.9 <sup>b</sup>
<b>SOL</b> lat (min)	15.4 ± 3.3		29.7 ± 4.9		19.4 ± 4.1		22.4 ± 6.4		40.3 ± 10.4	
<b>SOL</b> (min)	378.8 ± 24.5	279.6 ± 18.1	376.6 ± 15.1	220.0 ± 18.6	371.8 ± 20.3	297.9 ± 15.1	425.0 ± 19.1	281.6 ± 17.6	434.9 ± 21.0	399.6 ± 19.4 <sup>b</sup>
<b>SOL</b> epis	95.7 ± 6.7	61.2 ± 4.0	87.7 ± 7.5	55.2 ± 5.9	82.7 ± 7.8	60.8 ± 1.4	89.2 ± 6.3	56.3 ± 2.9	101.8 ± 4.3	66.8 ± 2.9
<b>SOL</b> dm (min)	4.1 ± 0.5	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.5	4.6 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.1	4.3 ± 0.3	6.1 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>sMOR</b> lat (min)	55.9 ± 10.8		67.4 ± 12.1		56.9 ± 6.2		114.7 ± 19.2 <sup>b</sup>		277.3 ± 15.0 <sup>b</sup>	
<b>sMOR</b> (min)	66.7 ± 6.9	47.8 ± 5.5	63.1 ± 5.3	44.2 ± 6.5	60.5 ± 2.7	42.7 ± 5.4	61.2 ± 3.5	43.3 ± 5.0	23.3 ± 3.5 <sup>b</sup>	41.1 ± 7.7
<b>sMOR</b> epis	40.8 ± 4.1	28.5 ± 4.2	39.2 ± 3.1	27.3 ± 3.4	34.2 ± 1.2	27.5 ± 2.7	36.7 ± 1.4	31.5 ± 3.2	17.7 ± 2.1 <sup>b</sup>	30.0 ± 4.5
<b>sMOR</b> dm (min)	1.6 ± 0.06	1.7 ± 0.09	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.08	1.5 ± 0.09	1.7 ± 0.07	1.4 ± 0.05	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.09

Los resultados están expresados como las medias ± EEM de grupos independientes (n=6). El análisis estadístico fue llevado a cabo por una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ). <sup>a</sup>Estadísticamente diferente del control. <sup>b</sup>Estadísticamente diferente de todos los grupos. V, vigilia; SOL, sueño de ondas lentas; sMOR, sueño de movimientos oculares rápidos; min, minutos; lat, latencia al primer episodio; epis, episodios; dm, duración media de los episodios.

Para tratar de correlacionar los efectos sobre el sueño con las alteraciones en el contenido de monoaminas, se analizaron el SOL y el sMOR en bloques de 3 h a lo largo de todo un estudio de sueño de 24 h. Después de la administración aguda de ACH (250 mg/kg), el SOL se incrementó significativamente hasta 12 h después de la inyección de ACH, es decir se alteró en el periodo de oscuridad,  $F(1,286)=22.15, p<0.001$ . Por otra parte, también se confirmó que el sMOR disminuyó de forma significativa inmediatamente después de la aplicación IP de ACH y durante las primeras 12 h de registro, es decir a lo largo del periodo de luz,  $F(1,286)=32.70, p<0.001$ , (Figura 3).

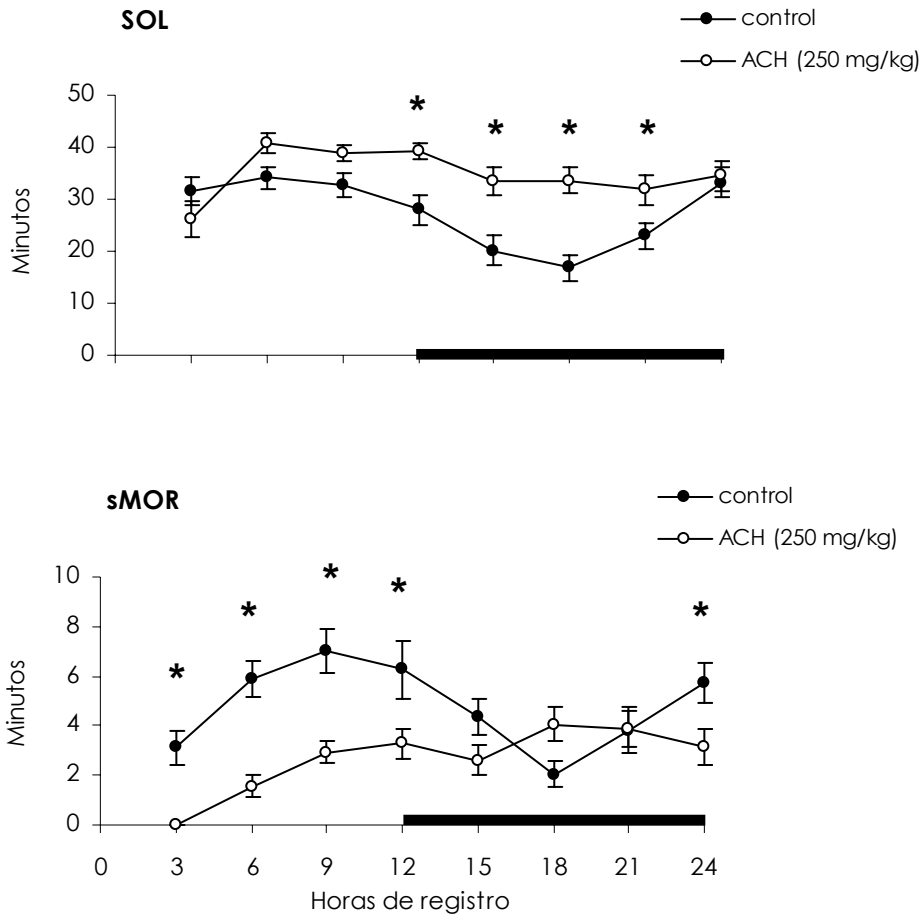


Figura 3. Efectos de la administración aguda de ACH (250 mg/kg) sobre el SOL y sMOR. La duración de SOL y sMOR fue evaluada cada 3 h a lo largo de un ciclo 12 h luz:12 h oscuridad. Los resultados

fueron comparados usando una ANOVA de dos vías medidas repetidas seguida de una prueba *post hoc* de Tukey, \*  $p < 0.01$ . La barra negra horizontal representa la fase oscura del ciclo.

## **B. Administración crónica de ACH y estudios poligráficos**

Para realizar el protocolo crónico se utilizaron dos dosis de ACH y el criterio para determinarlas fue a) la dosis con mayor efecto después de la administración aguda (250 mg/kg) y b) la dosis más baja y con menor efecto en el protocolo agudo (1 mg/kg). No se encontraron diferencias en el tiempo total de vigilia después de 30 días de tratamiento con ACH. Sin embargo, se observó que el tiempo total en SOL estaba significativamente aumentado en el grupo tratado durante 30 días con 250 mg/kg de ACH,  $F(2,15)=7.44$ ,  $p<0.01$ . De igual forma, el tiempo total en sMOR se encontró disminuido después de 30 días de tratamiento con 1 y 250 mg/kg de ACH,  $F(2,15)=43.76$ ,  $p<0.001$ , (Figura 4).

El análisis por separado de los periodos de luz y oscuridad reveló que durante la fase de luz el tiempo total en sMOR disminuyó significativamente después de la administración crónica de las dos dosis (1 y 250 mg/kg) de ACH,  $F(2,15)=13.03$ ,  $p<0.01$ , dicha alteración se debió a un decremento en los episodios de sMOR,  $F(2,15)=13.96$ ,  $p<0.001$ . Ambos grupos experimentales presentaron un incremento en la latencia para presentar el primer episodio de sMOR, pero solamente en el grupo que recibió 250 mg/kg de ACH se observó significancia estadística,  $F(2,15)=20.90$ ,  $p<0.001$ .

Durante la fase de oscuridad el sMOR continuó disminuido,  $F(2,15)=10.10$ ,  $p<0.05$ , y también se observó una disminución de los episodios de sMOR después del tratamiento con ambas dosis,  $F(2,15)=4.85$ ,  $p<0.05$ . Finalmente, la prueba estadística reveló un decremento de la vigilia,  $F(2,15)=3.84$ ,  $p<0.05$ , y un incremento del tiempo total en SOL después de la administración de 250 mg/kg de ACH durante 30 días,  $F(2,15)=5.64$ ,  $p<0.05$ , (Tabla 2).

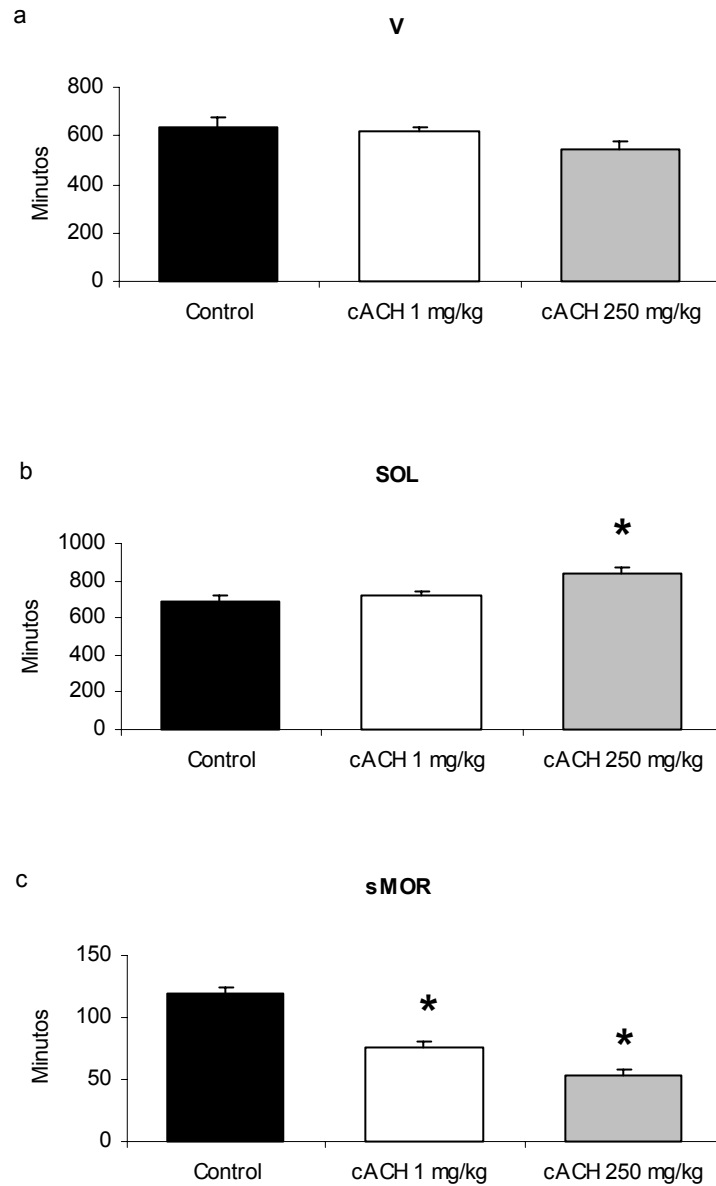


Figura 4. Duración de V, SOL y s MOR en registros polisomnográficos de 24 h después de la administración crónica de ACH. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Tukey, \*  $p < 0.01$ .

Tabla 2

Parámetros de sueño registrados a lo largo de un ciclo de 12 h luz:12 h oscuridad en ratas Wistar adultas administradas crónicamente con ACH

	Control		ACH 1 mg/kg (30 días)		ACH 250 mg/kg (30 días)	
	Fase Luz	Fase Oscuridad	Fase Luz	Fase Oscuridad	Fase Luz	Fase Oscuridad
<b>V</b> (min)	263.9 ± 31.9	371.7 ± 14.3	268.2 ± 17.9	346.6 ± 14.1	237.3 ± 20.6	309.2 ± 19.3 <sup>a</sup>
<b>SOL</b> lat (min)	14.3 ± 3.6		29.0 ± 9.0		13.1 ± 2.7	
<b>SOL</b> (min)	384.9 ± 26.1	300.2 ± 12.9	392.2 ± 15.1	329.8 ± 23.5	454.2 ± 19.1	386.5 ± 17.4 <sup>a</sup>
<b>SOL</b> epis	99.3 ± 6.7	63 ± 2.8	83.2 ± 5.2	47.5 ± 4.2	81.0 ± 7.1	56.6 ± 8.7
<b>SOL</b> dm (min)	4.0 ± 0.5	4.9 ± 0.3	4.8 ± 0.4	7.3 ± 0.9	5.8 ± 0.6	7.4 ± 0.8
<b>sMOR</b> lat (min)	59.9 ± 9.2		86.4 ± 23.4		198.5 ± 11.9 <sup>b</sup>	
<b>sMOR</b> (min)	71.3 ± 8.2	48.1 ± 5.4	49.6 ± 2.4 <sup>a</sup>	26.9 ± 4.1 <sup>a</sup>	28.7 ± 5.7 <sup>b</sup>	24.1 ± 2.1 <sup>a</sup>
<b>sMOR</b> epis	44.0 ± 4.8	28.7 ± 4.1	33.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	19.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	18.0 ± 3.3 <sup>b</sup>	16.0 ± 1.2 <sup>a</sup>
<b>sMOR</b> dm (min)	1.6 ± 0.05	1.7 ± 0.09	1.5 ± 0.05	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.04

Los resultados están expresados como las medias ± EEM de grupos independientes (n=6). El análisis estadístico fue llevado a cabo por una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ). <sup>a</sup>Estadísticamente diferente del control. <sup>b</sup>Estadísticamente diferente de todos los grupos. V, vigilia; SOL, sueño de ondas lentas; sMOR, sueño de movimientos oculares rápidos; min, minutos; lat, latencia al primer episodio; epis, episodios; dm, duración media de los episodios.



### C. Administración aguda de ACH y contenido de monoaminas

Para analizar el contenido de NA, 5-HT y 5-HIAA (principal metabolito de la serotonina) se utilizó la dosis aguda de ACH que alteró los parámetros de sueño (250 mg/kg). Las regiones analizadas (bulbo, puente, mesencéfalo e hipotálamo) se seleccionaron porque allí se localizan los principales núcleos noradrenérgicos y serotoninérgicos, el hipotálamo recibe importantes proyecciones noradrenérgicas y se ha sugerido que participa de manera importante en el mantenimiento de la vigilia.

Como se muestra en la figura 5, en el bulbo se encontró que las concentraciones de NA y 5-HT no sufren alteraciones en ninguno de los tiempos analizados después de la administración aguda de ACH. Sin embargo, el análisis cromatográfico y estadístico demostró que el contenido de 5-HIAA,  $F(1,94)=25.59$ ,  $p<0.001$ , y la relación 5-HIAA/5-HT,  $F(1,94)=42.21$ ,  $p<0.001$ , se incrementaron significativamente en las primeras 12 h analizadas.

En el puente, los contenidos de NA y 5-HT no se alteraron significativamente a lo largo del tiempo después de la inyección del principal metabolito del etanol. De manera comparable con el bulbo, la concentración de 5-HIAA también se incrementó pero solamente 12 y 24 h después de la inyección de ACH,  $F(1,94)=8.29$ ,  $p<0.01$ . En esta misma estructura se descubrió que la tasa de recambio 5-HIAA/5-HT también presentó cambios significativos. Se observó una tendencia hacia el incremento de la tasa; sin embargo, la ANOVA de dos vías mostró que la significancia solo se alcanzó 6 y 9 h después de la administración de ACH,  $F(1,94)=18.01$ ,  $p<0.001$ , (Figura 6).

El mesencéfalo fue otra región en la que se analizó el contenido de monoaminas. En esta región se cuantificaron niveles importantes de NA, 5-HT y 5-HIAA; sin embargo, el análisis estadístico mostró que no existe ningún índice de significancia en los tiempos analizados después de la administración de ACH (Figura 7).

En el hipotálamo no se encontraron cambios en los contenidos de las monoaminas analizadas; no obstante, se observó un incremento no significativo de NA en las primeras horas después de la inyección de ACH (Figura 8).

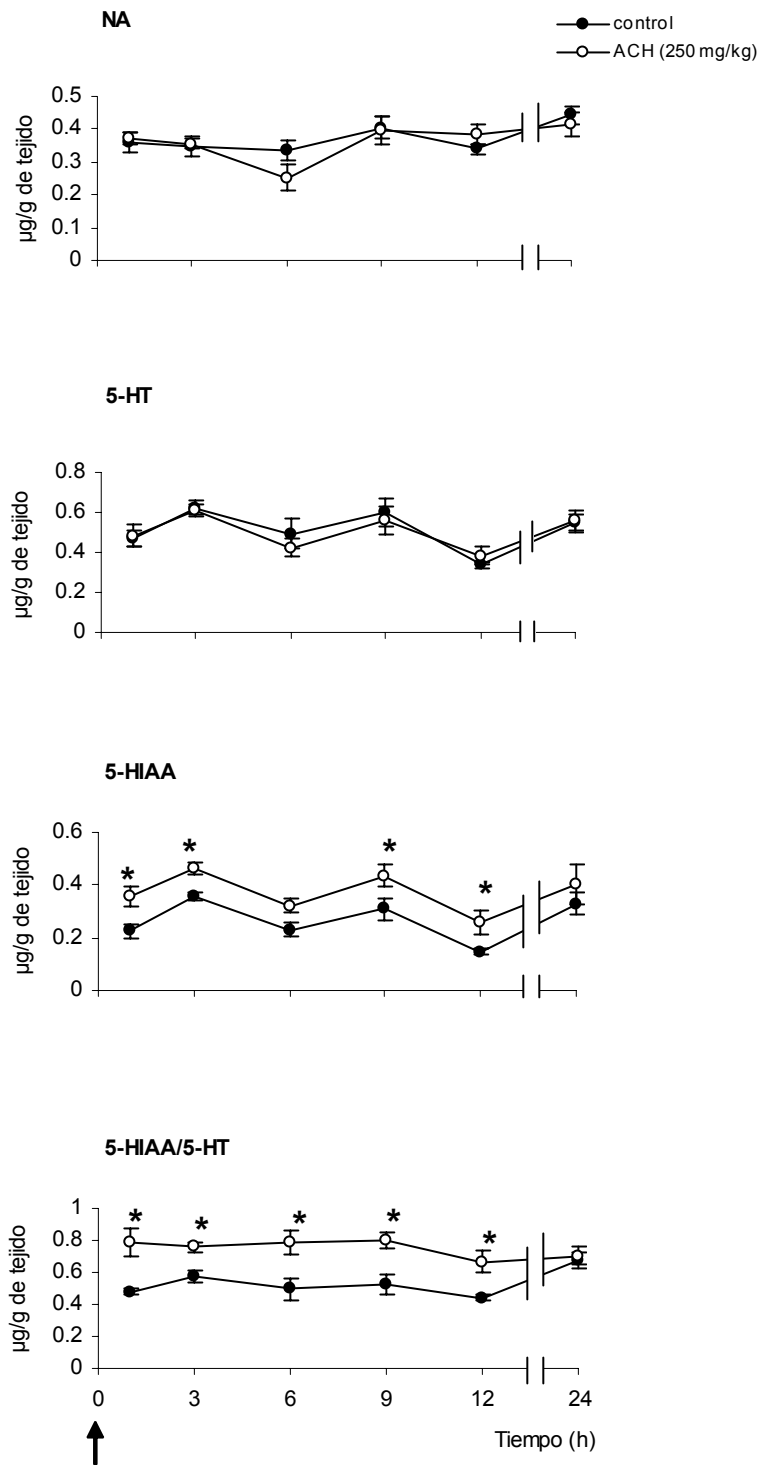


Figura 5. Concentración de NA, 5-HT, 5-HIAA y tasa 5-HIAA/5-HT en el **bulbo** de ratas control y administradas con ACH (250 mg/kg, vía IP). \*  $p < 0.05$  estadísticamente significativo con respecto al

control en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* de Tukey. La flecha indica el tiempo de inyección IP de solución salina o ACH según el grupo.

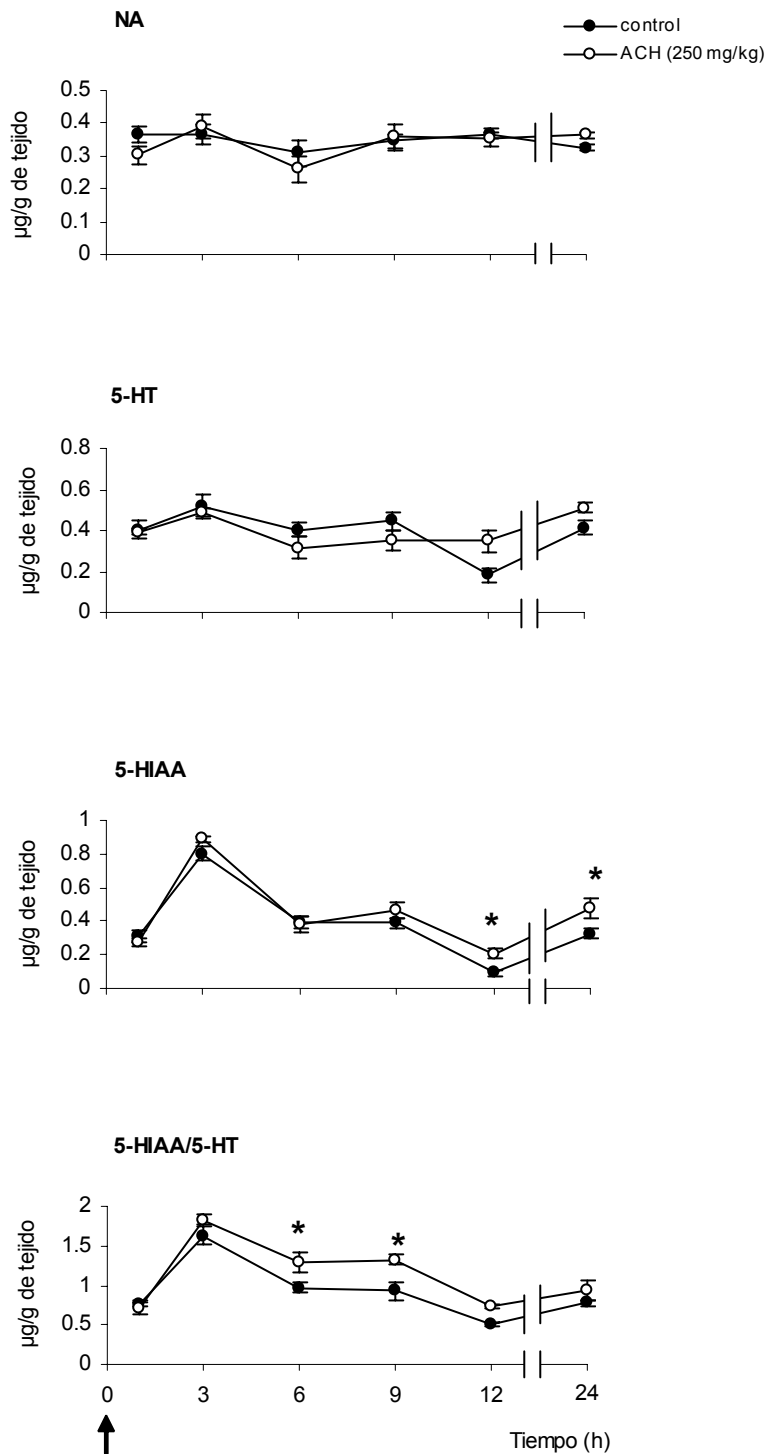


Figura 6. Concentración de NA, 5-HT, 5-HIAA y tasa 5-HIAA/5-HT en el **punto** de ratas control y suministradas con ACH (250 mg/kg, vía IP). \*  $p < 0.05$  estadísticamente significativo con respecto al control en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* de Tukey. La flecha indica el tiempo de inyección IP de solución salina o ACH según el grupo.

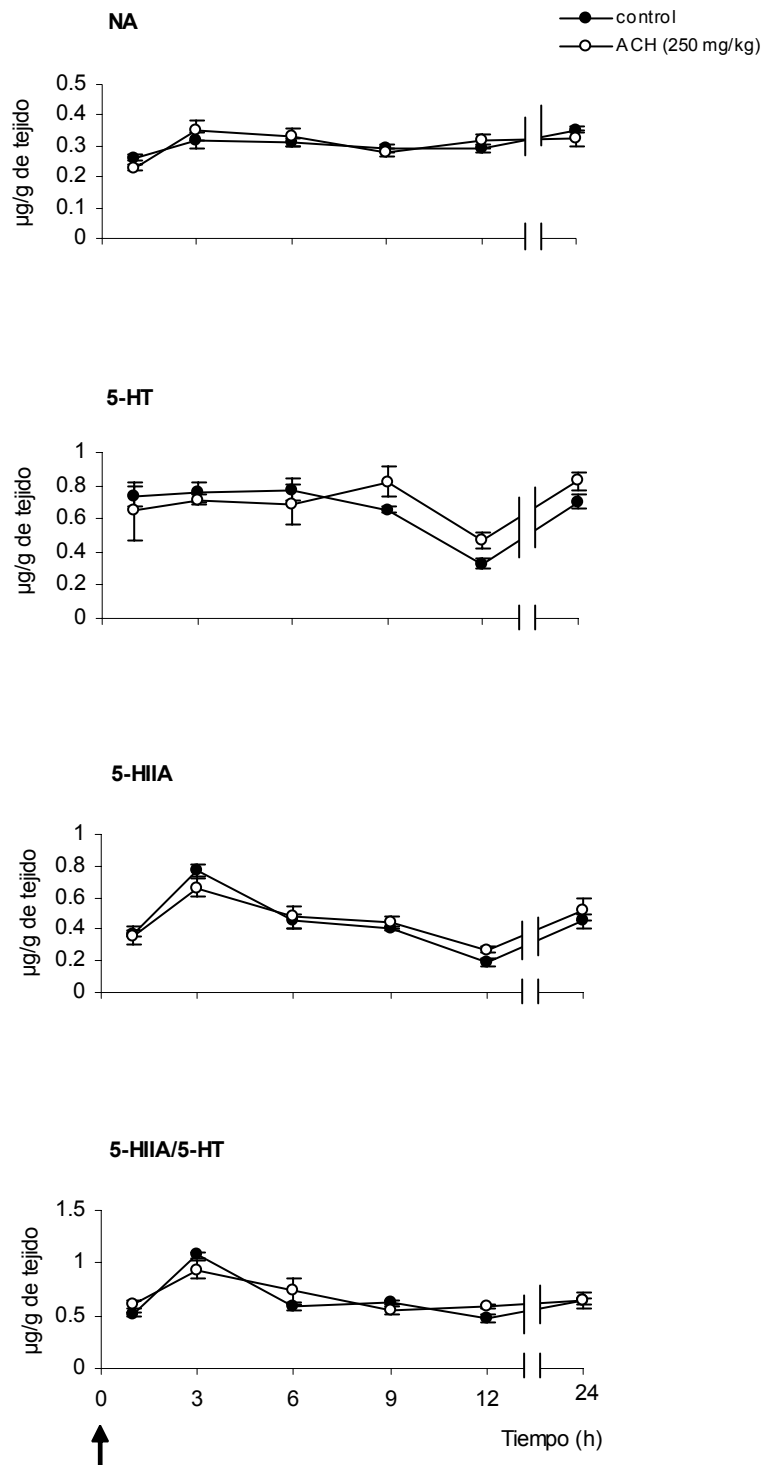


Figura 7. Concentración de NA, 5-HT, 5-HIAA y tasa 5-HIAA/5-HT en el **mesencéfalo** de ratas control y suministradas con ACH (250 mg/kg, vía IP). La ANOVA de dos vías reveló que no existen diferencias entre los grupos. La flecha indica el tiempo de inyección IP de solución salina o ACH según el grupo.

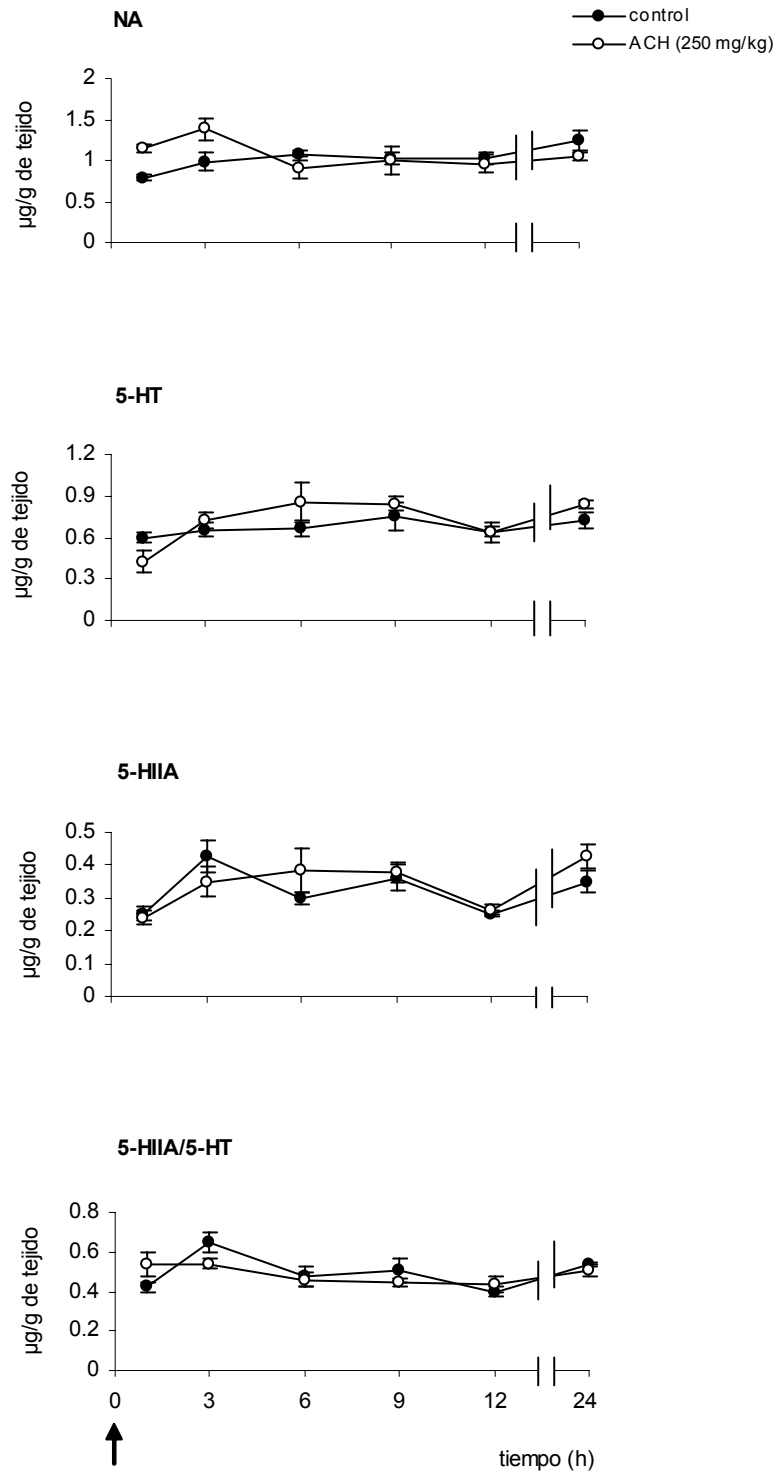


Figura 8. Concentración de NA, 5-HT, 5-HIAA y tasa 5-HIAA/5-HT en el **hipotálamo** de ratas control y suministradas con ACH (250 mg/kg, vía IP). La estadística reveló que no existen diferencias entre los grupos. La flecha indica el tiempo de inyección IP de solución salina o ACH según el grupo.

## VII. DISCUSIÓN

El alcoholismo es un problema agudo de salud pública a lo largo de todo el mundo. El consumo de alcohol está ligado a la ocurrencia de muchas condiciones patológicas como varias formas de cáncer, enfermedades hepáticas, daño cerebral y alteraciones fetales durante el embarazo. Se ha establecido que el ACH participa de forma importante en los efectos tóxicos del etanol y muchos de los estudios sobre el metabolismo del etanol se han llevado a cabo para examinar los efectos del ACH en diferentes condiciones patológicas.

En el presente estudio las ratas se sometieron a inyecciones agudas o crónicas de ACH y posteriormente se les realizaron estudios polisomnográficos. Asimismo, se estudiaron las alteraciones en el contenido de NA, 5-HT y 5-HIAA después de la administración de una dosis aguda de ACH. En general, el ACH alteró el ciclo sueño vigilia y el metabolismo serotoninérgico, el cual está implicado en la regulación de dicho ciclo.

El ACH es el principal metabolito del etanol y es mucho más tóxico que su precursor ya que presenta una LD<sub>50</sub> de 1930 mg/kg por vía oral en ratas, la cual es aproximadamente 5 veces más tóxica en comparación con el etanol (LD<sub>50</sub> 10257 mg/kg) (Brecher y cols, 1997; Smyth y cols, 1951). A pesar de todas las controversias, es bien conocido que el ACH puede atravesar la barrera hematoencefálica después de una sola dosis periférica. Heap y cols (1995) detectaron ACH en el cerebro después de una sola dosis IP de ACH (5 mM/kg). De igual forma, se ha publicado que el ACH es detectable en el cerebro tan solo 10 minutos después de la administración periférica de 20 hasta 100 mg/kg (Ward y cols, 1997). Estos estudios han reforzado la hipótesis que propone a este metabolito



como un mediador para algunos de los efectos conductuales y farmacológicos del etanol.

Existen muchos estudios que describen que el etanol causa cambios en el EEG y alteraciones en los parámetros de sueño (Brower, 2001; Roehrs y Roth, 2001). Sin embargo, todavía no hay reportes que muestren detalles acerca de los efectos del ACH sobre el ciclo sueño vigilia. Nuestros resultados muestran que la administración aguda de ACH altera el ciclo sueño vigilia disminuyendo el tiempo total en vigilia y SMOR e incrementando el tiempo total en SOL. Estas alteraciones fueron observadas solamente cuando se inyectó la dosis más alta de ACH (250 mg/kg), probablemente debido a la presencia de concentraciones significativas de ACH en el cerebro. Algunos estudios han cuestionado la capacidad del ACH para atravesar la barrera hematoencefálica y la principal razón para esta duda es la presencia de actividad enzimática de la aldehído-deshidrogenasa en las paredes de los capilares cerebrales (Eriksson y Sippel, 1977). Se ha demostrado que la inyección de 220 mg/kg de ACH permite a este atravesar la barrera hematoencefálica (Heap y cols, 1995), esto sugiere que altas concentraciones de ACH en sangre pueden saturar la enzima aldehído-deshidrogenasa en los capilares cerebrales y de esta forma permitirle el paso a través de la barrera hematoencefálica. Otro estudio señaló que el tratamiento con etanol y disulfiram, un inhibidor de la aldehído deshidrogenasa, causa un marcado incremento de ACH en sangre proporcional al incremento de ACH en cerebro (Westcott y cols, 1980). Estos resultados nos dan indicios de que probablemente sea necesaria la inhibición o saturación de la enzima aldehído-deshidrogenasa para detectar ACH en el cerebro.

En este trabajo se encontró que la administración de 250 mg/kg de ACH disminuyó el tiempo total en sMOR durante las primeras 12 h o durante la fase de luz seguido por un incremento significativo del SOL. Estos descubrimientos están correlacionados con un incremento del metabolismo de serotonina el cual fue observado inmediatamente después de la administración de ACH. Se puede proponer que después de la inyección de 250 mg/kg de ACH, las concentraciones de este metabolito en sangre y por lo tanto en cerebro se encontraban mucho más allá de niveles fisiológicos normales. En ratas, se ha demostrado que después de una inyección vía IP de ACH (220 mg/kg) existen concentraciones de ACH en sangre y cerebro que alcanzan los 50 nM (Heap y cols, 1995). Tomando en cuenta que en este trabajo se administro una dosis similar de ACH (250 mg/kg), se puede especular que el contenido de ACH en sangre y cerebro podría ser similar al mencionado en el trabajo previo. Se han realizado varios intentos para determinar en pacientes alcohólicos los valores de ACH en sangre y algunos han sido ineficaces; sin embargo, se han encontrado niveles de ACH hasta 2.5  $\mu$ M en sangre de sujetos después del consumo agudo de etanol (Hatake y cols, 1990). En sujetos alcohólicos crónicos se han detectado niveles de ACH tan altos como 30  $\mu$ M (Panés y cols, 1992), incluso, en Japón se reportaron dos alcohólicos con niveles inusuales de ACH de hasta 548  $\mu$ M (Watanabe y cols, 1985). Es difícil establecer esquemas de concentraciones de ACH en sangre y cerebro después de la ingesta aguda o crónica de ACH, lo que queda claro es que el ACH se acumula después de la ingesta de etanol y de la misma administración sistémica de ACH. Los resultados de este trabajo proporcionan información relevante que indica que el ACH puede alterar las concentraciones de monoaminas en el cerebro y de esta

forma modificar el patrón normal de sueño. Estos hallazgos son similares a los reportados previamente en donde se indica que el consumo de etanol induce efectos fundamentales sobre el sueño de pacientes alcohólicos (Brower, 2001; Roehrs y Roth, 2001). De esta manera, los resultados de este trabajo pueden proporcionar información adicional acerca de la posible participación del ACH en las alteraciones del ciclo sueño vigilia observadas en pacientes alcohólicos.

Experimentalmente, estudios previos han demostrado que la administración aguda de etanol en ratas, tanto por vía oral como IP, reduce el tiempo total en SMOR en una forma dosis-dependiente (Hattan y Eacho, 1978; Mendelson y Hill, 1978) e incrementa la latencia para la presencia del primer episodio de SMOR (Prospero y cols, 1994) así como el tiempo total en SOL (Hill y Reyes, 1978). En este estudio se observaron resultados similares después de la administración aguda de una dosis de ACH (250 mg/kg). Esto nos indica o sugiere que el ACH podría estar regulando las alteraciones observadas en el ciclo sueño vigilia después de la administración aguda de etanol.

Por otra parte, existen pocos trabajos experimentales acerca de esquemas crónicos de etanol y los resultados dependen de la vía de administración. Ehlers y Slawecki (2000) describieron que después de seis semanas de exposición a vapores de etanol no se presentan alteraciones en los parámetros de sueño de la rata; sin embargo, la ingestión de etanol durante dos a tres semanas incrementa significativamente el tiempo total en SOL durante la fase de oscuridad y suprime completamente el SMOR durante la fase de luz (Kubota y cols, 2002). En el presente trabajo, se observó que el ACH administrado crónicamente durante treinta días altera el ciclo sueño vigilia de forma similar a lo descrito con el ACH agudo. No

obstante, un descubrimiento importante fue que la dosis más baja de ACH utilizada (1 mg/kg), también disminuye el tiempo total en sMOR bajo un esquema crónico. Esto sugiere que el ACH podría acumularse en el cerebro después de inyecciones repetidas de dosis bajas. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar los posibles mecanismos de este efecto, incluso es necesario realizar mediciones de ACH en el cerebro para comprobar si este metabolito del etanol se acumula después de protocolos crónicos de administración. Lo que se puede confirmar es que la disminución del tiempo total en sMOR, presentada en los grupos inyectados con ACH durante treinta días, no es debida al estrés de la inyección. Esto se puede comprobar porque no se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos control tanto agudo como crónico. Los efectos del ACH crónico sobre el sMOR fueron mucho más dramáticos por que se observó un decremento a lo largo de las 24 h que duraron los registros polisomnográficos. Estas observaciones sugieren un estado de privación de sMOR ocasionado por el ACH crónico y probablemente la presencia de un rebote de sMOR después del efecto del ACH.

Se ha demostrado ampliamente que el etanol altera varios sistemas de neurotransmisión a nivel central afectando su metabolismo (síntesis, liberación y tasa de recambio) y que estos cambios son tiempo y dosis-dependientes (Eisenhofer y cols, 1990; Fadda y cols, 1980; Milio y Hadfield, 1992). En cambio, existen muy pocos reportes que aborden el efecto del ACH sobre el contenido de monoaminas en diferentes regiones del cerebro. Se ha reportado que la administración de dosis altas de ACH (300 mg/kg) causa disminución significativa de NA en el cerebro completo (Duritz y Truitt, 1966) y un incremento en la liberación

y en la tasa de recambio de NA (Thadani y Truitt, 1977). También se han realizado trabajos con microdiálisis y administración de dosis bajas de ACH (20-100 mg/kg), en donde se han descrito reducciones significativas del contenido extracelular de dopamina, ácido homovalínico y 5-HT en el núcleo acumbens de la rata (Ward y cols, 1997). Incluso, con modelos de inhalación de ACH se han determinado decrementos de NA y dopamina en la corteza y en el tallo cerebral (Hashimoto y cols, 1989).

Las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe son más activas durante la vigilia, disminuyen su actividad durante el SOL y están virtualmente silentes durante el SMOR (Jacobs y cols, 1991; Levine y cols, 1992). Asimismo, se ha determinado con microdiálisis en el rafe dorsal y sus áreas de proyección que los niveles de 5-HT son los más altos durante la vigilia, intermedios durante el SOL y los más bajos durante el SMOR (Portas y cols, 2000). Las mediciones de los niveles del principal metabolito de la 5-HT, el 5-HIAA, también indican que la tasa de recambio de la 5-HT (5-HIAA/5-HT) se incrementa en áreas serotoninérgicas durante la vigilia en comparación con el SOL y el SMOR (Imeri y cols, 1994). La 5-HT es transportada en el axón terminal, metabolizada intraneuronalmente hasta 5-HIAA y finalmente este metabolito es removido en el espacio extracelular durante el estado de reposo de la neurona. De esta manera, se ha asumido que las concentraciones de 5-HIAA en los homogenados de tejido reflejan directamente la liberación y metabolismo de 5-HT. En este estudio se midieron los niveles de NA, 5-HT y 5-HIAA a varios tiempos después de una inyección aguda de ACH (250 mg/kg) con el objetivo de relacionar las alteraciones observadas en el sueño con cambios en el contenido de monoaminas en varias regiones del cerebro. En general, después de la

administración de ACH se encontró una disminución significativa de sMOR, altos niveles de 5-HIAA y una tasa de recambio elevada en algunas de las regiones analizadas. Estos resultados podrían apoyar la hipótesis de la existencia de neuronas sMOR-on y neuronas sMOR-off. Se ha propuesto que las proyecciones serotoninérgicas y noradrenérgicas hacia las neuronas colinérgicas son inhibitorias. Es decir, cuando la actividad del rafe dorsal y LC (neuronas sMOR-off) disminuye, se activan los núcleos colinérgicos (neuronas sMOR-on) relacionados con la generación de los episodios de sMOR (Hobson y cols, 1975; Steriade, 1992). En otras palabras, el elevado metabolismo de 5-HT encontrado en algunas regiones del cerebro de ratas inyectadas con ACH, podría estar ejerciendo efectos inhibitorios, a diferentes tiempos, sobre los núcleos colinérgicos necesarios para la aparición del sMOR. Más aún, recientemente se ha descrito que el ACH por sí solo tiene la capacidad de disminuir la liberación de acetilcolina (Jamal y cols, 2005), esta pérdida de la función colinérgica podría también colaborar en la inhibición de la generación de los episodios de sMOR.

Los sistemas de neurotransmisión serotoninérgica y noradrenérgica son muy importantes en la neurobiología del sueño; sin embargo, los patrones normales de sueño dependen de la compleja interacción de varios sistemas de neurotransmisión, hormonales y probablemente de algunas moléculas denominadas factores inductores de sueño (ref. ver García-García y Drucker-Colín, 1999). Algunos datos indican que la administración de etanol y cianamida, un tratamiento que inhibe la aldehído-deshidrogenasa e incrementa la concentración de ACH en sangre, ocasiona un aumento significativo de los niveles de ARNm del factor liberador de corticotropina (FLC) (Kinoshita y cols, 2001). Por

otro lado, se ha demostrado en modelos animales que el FLC puede afectar la calidad del sueño produciendo insomnio y un estado de alerta (Ehlers y cols, 1986).

Todos estos resultados son de relevancia porque nos aportan información adicional acerca de la participación del ACH sobre los efectos en la arquitectura del sueño reportados con la ingesta de etanol.

## VIII. CONCLUSIÓN

La administración de ACH altera los parámetros de sueño de la rata disminuyendo el sMOR. Estos resultados son similares a los reportados después de la ingesta de etanol.

El ACH incrementa, principalmente en el bulbo, el metabolismo serotoninérgico el cual está implicado en la regulación de sueño. Este incremento podría explicar las alteraciones observadas en el ciclo sueño vigilia.

No se observó un efecto claro de dosis-dependencia sobre los parámetros de sueño después de la utilización de cuatro dosis de ACH.

Los resultados indican que el ACH podría estar regulando las alteraciones observadas en el ciclo sueño vigilia después de la administración aguda de etanol.



**IX. APENDICE**

**A. Artículo publicado**

Research report

## Sleep and brain monoamine changes produced by acute and chronic acetaldehyde administration in rats

Javier Franco-Pérez, Mónica Padilla, Carlos Paz\*

*Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269 México, D.F., México*

Received 11 May 2006; received in revised form 7 July 2006; accepted 10 July 2006  
Available online 21 August 2006

### Abstract

Acetaldehyde, the most toxic metabolite of ethanol, has been implicated in many toxic effects of ethanol. In the present study, we used rats to investigate the possible changes on the sleep–wake cycle and brain regional concentrations of noradrenaline and serotonin after intraperitoneal administration of several doses of acetaldehyde. Results showed that acetaldehyde significantly decreases the time spent in rapid eye movements sleep and wakefulness and increases the time spent in slow-wave sleep. The neurochemical analysis showed that acetaldehyde significantly increases the 5-hydroxyindolacetic acid content and 5-hydroxyindolacetic acid/serotonin ratio at the bulb and pons. These results suggest that acetaldehyde modifies the metabolism of serotonin which has been implicated in the onset and sustaining of the sleep episodes occurring along the sleep–wake cycle.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Sleep–wake cycle; Acetaldehyde; Ethanol; 5-HT; NA

### 1. Introduction

Ethanol causes significant changes in the electroencephalogram (EEG) and sleep pattern disturbance [3,32]. Acetaldehyde (ACH), the main metabolite of ethanol, has been assessed in blood and brain in early studies [9,22,31,33,37,43]. However, the current view is that only low ACH concentrations are found in blood after ethanol consumption, whereas brain ACH concentrations are debated [30]. ACH is the first product formed in the ethanol metabolism and several reports have suggested it plays a role in the effects of ethanol on the brain [19,29,34].

There are a few studies about the effects of ACH on the content of neurotransmitters. It has been demonstrated that repeated inhalations [13] and intraperitoneal (i.p.) injections of ACH [5,16,41] decrease noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT) concentrations in the brain. Both NA and 5-HT are two of the main neurotransmitters involved in sleep regulation [20]. It has been demonstrated that noradrenergic neurons in locus coeruleus and serotonergic neurons in raphe nuclei dis-

play state-dependent neuronal activity, showing high rates of firing during wakefulness, lower rates during slow-wave sleep (SWS) and remain almost inactive during rapid eye movements sleep (REMs) [1,11,27,39].

There are many studies of acute and chronic action of ethanol on sleep–wake cycle. However, no studies have yet shown a description about the effects of ACH, the main metabolite of ethanol, on the sleep parameters and only few reports have found that ACH modifies the content of the monoamines implicated in sleep generation. For this reason, we suppose that such monoamines disturbance produced by the ACH administration could induce changes in the sleep pattern. Therefore, the aim of this study was to determine the modifications in the sleep–wake cycle and changes of 5-HT and NA concentrations in the rat brain after i.p. ACH administration.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Animals

One hundred and forty-four male Wistar rats (280–320 g) were used for this study. Animals were maintained under controlled conditions (12-h light:12-h darkness) and access to food and water ad libitum. All animals were treated with suitable measures to minimize pain or discomfort according to the regulations

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5606 38 22; fax: +52 55 5424 08 08.  
E-mail address: [paztres@servidor.unam.mx](mailto:paztres@servidor.unam.mx) (C. Paz).

specified by the Animal Care and Use Committee of our Institution, as well as following the standards of the National Institutes of Health of Mexico.

## 2.2. Electrodes implantation

Animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, i.p.); afterwards, bipolar electrodes were implanted in the left sensorimotor cortex for the electroencephalographic recordings (EEG), in the neck muscles to record the electromyogram (EMG) and in the external edge of the frontal bone to record eye movements (EOG). The bipolar electrodes were made of stainless-steel Teflon-coated wires (0.005 in. diameter) with uncoated tips. An electrode implanted with a screw in the skull was used as an indifferent source of reference. The electrodes were soldered to pins and fixed to a rectangular plug which was secured to the skull with dental acrylic. Skin cuts were sutured and gentamicin was administered as infection prophylaxis.

## 2.3. Polygraphic studies

One week after surgery, rats were connected to a polygraph (Grass78D) by means of flexible cables, allowing the animals to move freely in a sound-proof recording cage (30 cm × 22 cm × 22 cm) provided with free access to food and water and under controlled light–dark conditions (8:00–20:00 h light, 20:00–8:00 h dark). Rats were habituated during 48 h to these laboratory conditions. Saline or ACH solution was intraperitoneally injected during 30 days (chronic groups) or 1 h (acute groups) previous to a 24 h sleep study. For the chronic protocol, the last injection was administered 1 h before the polygraphic study. The different states of the sleep–wake cycle were blindly analyzed by a single experimenter, whom did not know the drugs treatments, using the following electrophysiological criteria: wakefulness (W), characterized by EEG desynchronization and presence of accentuated EMG activity during movements; SWS, characterized by slow waves with a voltage higher than 75  $\mu$ V and decreased EMG voltage; and REMs characterized by EEG desynchronization with the presence of rapid eye movements in the EOG and absence of voltage in the EMG.

Rats implanted with electrodes were randomly divided into an acute and a chronic study protocols. The acute study protocol was constituted by the following groups: control ( $n=6$ ) injected with saline solution; ACH-1 ( $n=6$ ) injected with 1 mg/kg of ACH; ACH-62.5 ( $n=6$ ) injected with 62.5 mg/kg of ACH; ACH-125 ( $n=6$ ) injected with 125 mg/kg of ACH and ACH-250 ( $n=6$ ) injected with 250 mg/kg of ACH. The chronic study protocol was constituted by the following groups: control ( $n=6$ ) injected daily during 30 days with saline solution; cACH-1 ( $n=6$ ) injected daily with 1 mg/kg of ACH during 30 days; cACH-250 ( $n=6$ ) injected daily with 250 mg/kg of ACH during 30 days.

## 2.4. Monoamines quantification

Neurochemical analysis was done according to the following protocol: 48 rats were injected with saline solution (i.p.) and eight animals were sacrificed at each of the time point, 1, 3, 6, 9, 12 and 24 h, in order to constitute the control groups. While another 48 rats were administered with ACH (250 mg/kg, i.p.) and eight animals were sacrificed at each of the time point, 1, 3, 6, 9, 12 and 24 h, in order to constitute the experimental groups.

Rats were sacrificed by decapitation; the bulb, pons, midbrain and hypothalamus were dissected out according to the Glowinsky and Iversen technique [12], the respective samples were immediately placed on ice and sonicated in 1000  $\mu$ l of perchloric acid 0.4N with 0.1% (w/v) sodium metabisulphite, followed by 10 min of centrifugation at 15 000 rpm and 4 °C. Supernatants were kept frozen at –70 °C until chromatographic analysis was performed. The contents of NA and 5-HT and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) were analyzed by high resolution liquid chromatography with an electrochemical detector as it has been described previously [4]. A Perkin-Elmer LC-250 liquid chromatograph with a Metrohm electrochemical detector was used. Peaks were integrated with TotalChrom software developed by Perkin-Elmer. We used a C18 100 mm × 4.8 mm Alltech adsorbosphere catecholamine analytical column with 3  $\mu$ m of particle size. The mobile phase consisted of an aqueous phosphate buffer solution (0.1 M, pH 3.2) containing 0.2 mM sodium octyl sulphate, 0.1 mM of EDTA and 15% (v/v) methanol. Flow rate

was 1.2 ml/min. Potential was fixed at 0.80 V against Ag/AgCl reference electrode.

## 2.5. Statistical analysis

Control and experimental groups used in acute and chronic sleep studies were compared with one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test. SWS and REMs were analyzed by a two-way repeated measures ANOVA over a 24 h cycle considering saline and ACH conditions. Subsequent comparisons within conditions were made using a Tukey's test. While monoamine contents were analyzed by a two-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test.

## 3. Results

### 3.1. Polygraphic studies in acute ACH administration

We did not find any significant differences in sleep studies when groups acutely administered with the lower doses of ACH (1, 62.5 and 125 mg/kg) were compared to controls. However, when we injected 250 mg/kg of ACH we found a significant decrease of the total time spent in wakefulness recorded over a 24 h period,  $F(4, 25)=5.70$ ,  $p<0.01$ , while the time spent in SWS was longer,  $F(4, 25)=9.70$ ,  $p<0.001$ , and time spent in REMs was shorter,  $F(4, 25)=8.10$ ,  $p<0.001$ , when compared to control group (Fig. 1). Nevertheless, both 125 and 250 mg/kg of ACH significantly increased the latency to show the first REMs episode,  $F(4, 25)=49.50$ ,  $p<0.001$ .

When light and dark sleep periods were compared, we found a significant decrease of the time spent in wakefulness,  $F(4, 25)=8.98$ ,  $p<0.001$ , and a significant increase in SWS,  $F(4, 25)=13.37$ ,  $p<0.001$  during the dark period only after injection of highest dose of ACH (250 mg/kg). Although, the mean duration of SWS episodes increased significantly in the dark period,  $F(4, 25)=4.51$ ,  $p<0.01$ . Contrary, during the light period 250 mg/kg of ACH decreased the time spent in REMs,  $F(4, 25)=15.04$ ,  $p<0.001$ , the number of REMs episodes,  $F(4, 25)=12.61$ ,  $p<0.001$ , and the mean duration of REMs episodes,  $F(4, 25)=4.15$ ,  $p<0.01$  (Table 1). We analyzed the effects of ACH (250 mg/kg) on SWS and REMs duration each 3 h along a 24 h sleep study and found that SWS increased significantly after 12 h of ACH treatment,  $F(1, 286)=22.15$ ,  $p<0.001$ . By

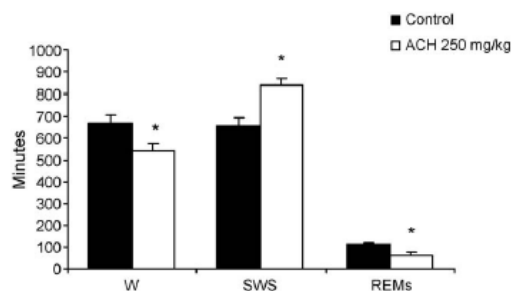


Fig. 1. Duration of W, SWS and REMs on 24 h polygraphic recordings in control group and after acute ACH (250 mg/kg, i.p.) injection. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of six animals per group, statistical analysis was carried out by a one-way ANOVA followed by a Tukey's test; \* $p<0.01$ .



Table 1  
Sleep parameters recorded throughout a 12 h light/12 h darkness cycle in adult rats administered with several acute doses of ACH

	Control		ACH (1 mg/kg)		ACH (62.5 mg/kg)		ACH (125 mg/kg)		ACH (250 mg/kg)	
	Light period	Dark period	Light period	Dark period	Light period	Dark period	Light period	Dark period	Light period	Dark period
W (min)	274.5 ± 28.5	392.7 ± 21.0	280.3 ± 16.5	455.9 ± 23.6	287.7 ± 21.1	379.4 ± 20.0	233.8 ± 19.0	395.1 ± 20.8	261.9 ± 18.7	279.3 ± 20.9 <sup>a</sup>
SWS latency (min)	15.4 ± 3.3	29.7 ± 4.9	29.7 ± 4.9	19.4 ± 4.1	19.4 ± 4.1	37.18 ± 20.3	22.4 ± 6.4	40.3 ± 10.4	40.3 ± 10.4	40.3 ± 10.4
SWS (min)	378.8 ± 24.5	279.6 ± 18.1	376.6 ± 15.1	220.0 ± 18.6	371.8 ± 20.3	297.9 ± 15.1	425.0 ± 19.1	281.6 ± 17.6	434.9 ± 21.0	399.6 ± 19.4 <sup>b</sup>
SWS episodes	95.7 ± 6.7	61.2 ± 4.0	87.7 ± 7.5	55.2 ± 5.9	82.7 ± 7.8	60.8 ± 1.4	89.2 ± 6.3	56.3 ± 2.9	101.8 ± 4.3	66.8 ± 2.9
SWS m/d (min)	4.1 ± 0.5	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.5	4.6 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.1	4.3 ± 0.3	6.1 ± 0.4 <sup>b</sup>
REMS latency (min)	55.9 ± 10.8	67.4 ± 12.1	67.4 ± 12.1	44.2 ± 6.5	56.9 ± 6.2	42.7 ± 5.4	114.7 ± 19.2 <sup>a</sup>	43.3 ± 5.0	277.3 ± 15.0 <sup>a</sup>	41.1 ± 7.7
REMS (min)	66.7 ± 6.9	47.8 ± 5.5	63.1 ± 5.3	44.2 ± 6.5	60.5 ± 2.7	27.5 ± 2.7	61.2 ± 3.5	31.5 ± 3.2	23.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	30.0 ± 4.5
REMS episodes	40.8 ± 4.1	28.5 ± 4.2	39.2 ± 3.1	27.3 ± 3.4	34.2 ± 1.2	27.5 ± 2.7	36.7 ± 1.4	1.4 ± 0.07	17.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>b</sup>
REMS m/d (min)	1.6 ± 0.06	1.7 ± 0.09	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.08	1.5 ± 0.09	1.7 ± 0.07	1.4 ± 0.05	1.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.09

Results are expressed as mean ± S.E.M. of  $n=6$  independent experiments. Statistical analysis was carried out by a one-way ANOVA followed by a Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

<sup>a</sup> Statistically different from all groups. W, wakefulness; SWS, slow-wave sleep; REMs, rapid eye movements sleep; m/d, episode mean duration.

<sup>b</sup> Statistically different from control.

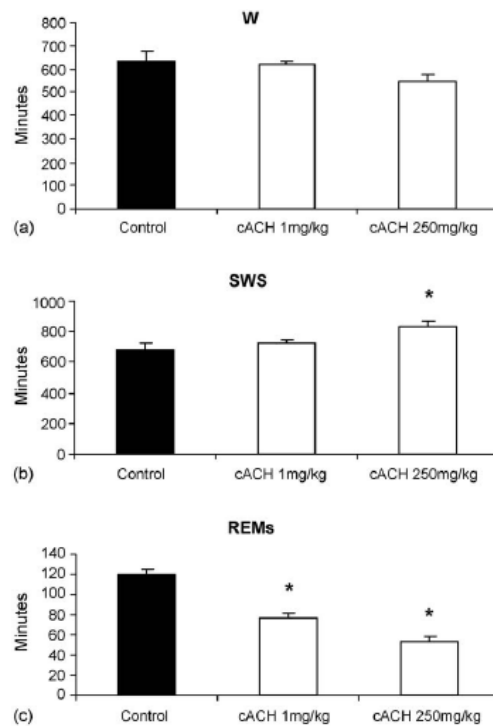


Fig. 2. Duration of W, SWS and REMs on 24 polygraphic recordings in control group and after chronic ACH administration. Results are expressed as mean ± S.E.M. of six animals per group, statistical analysis was carried out by a one-way ANOVA followed by a Tukey's test; \* $p < 0.01$ .

contrast, REMs decreased significantly immediately after ACH treatment,  $F(1, 286) = 32.70$ ,  $p < 0.001$  (Fig. 3).

### 3.2. Polygraphic studies in chronic ACH administration

We did not find any significant differences in the total time spent in wakefulness after 30 days of treatment with ACH. However, the total time spent in SWS was significantly longer in the group receiving 250 mg/kg of ACH,  $F(2, 15) = 7.44$ ,  $p < 0.01$ . The total time spent in REMs decreased after 30 days of treatment with 1 and 250 mg/kg of ACH,  $F(2, 15) = 43.76$ ,  $p < 0.001$  (Fig. 2). Both experimental groups presented an increase of the latency to show the first REMs episode, but only in the group receiving 250 mg/kg of ACH had statistically significant differences,  $F(2, 15) = 20.90$ ,  $p < 0.001$ .

Analysis of light and dark periods revealed a decrease of wakefulness during the dark period,  $F(2, 15) = 3.84$ ,  $p < 0.05$ , while the total time spent in SWS significantly increased,  $F(2, 15) = 5.64$ ,  $p < 0.05$ , after 30 days of treatment with 250 mg/kg of ACH. Furthermore, the total time spent in REMs during both light and dark periods decreased [ $F(2, 15) = 13.03$ ,  $p < 0.01$  and  $F(2, 15) = 10.10$ ,  $p < 0.05$ , respectively], while the number of REMs episodes during the light and dark episodes decreased

Table 2  
Sleep parameters recorded throughout a 12h light:12h darkness cycle in adult rats chronically receiving ACH

	Control		cACH (1 mg/kg, 30 days)		cACH (250 mg/kg, 30 days)	
	Light period	Dark period	Light period	Dark period	Light period	Dark period
W (min)	263.9 ± 31.9	371.7 ± 14.3	268.2 ± 17.9	346.6 ± 14.1	237.3 ± 20.6	309.2 ± 19.3 <sup>a</sup>
SWS latency (min)	14.3 ± 3.6		29.0 ± 9.0		13.1 ± 2.7	
SWS (min)	384.9 ± 26.1	300.2 ± 12.9	392.2 ± 15.1	329.8 ± 23.5	454.2 ± 19.1	386.5 ± 17.4 <sup>a</sup>
SWS episodes	99.3 ± 6.7	63 ± 2.8	83.2 ± 5.2	47.5 ± 4.2	81.0 ± 7.1	56.6 ± 8.7
SWS m/d (min)	4.0 ± 0.5	4.9 ± 0.3	4.8 ± 0.4	7.3 ± 0.9	5.8 ± 0.6	7.4 ± 0.8
REMs latency (min)	59.9 ± 9.2		86.4 ± 23.4		198.5 ± 11.9 <sup>b</sup>	
REMs (min)	71.3 ± 8.2	48.1 ± 5.4	49.6 ± 2.4 <sup>a</sup>	26.9 ± 4.1 <sup>a</sup>	28.7 ± 5.7 <sup>b</sup>	24.1 ± 2.1 <sup>a</sup>
REMs episodes	44.0 ± 4.8	28.7 ± 4.1	33.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	19.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	18.0 ± 3.3 <sup>b</sup>	16.0 ± 1.2 <sup>a</sup>
REMs m/d (min)	1.6 ± 0.05	1.7 ± 0.09	1.5 ± 0.05	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.04

Results are expressed as mean ± S.E.M. of *n* = 6 independent experiments. Statistical analysis was carried out by a one-way ANOVA followed by a Tukey's test (*p* < 0.05).

<sup>a</sup> Statistically different from control.

<sup>b</sup> Statistically different from control and cACH (1 mg/kg) group; W, wakefulness; SWS, slow-wave sleep; REMs, rapid eye movements sleep; m/d, episode mean duration.

[*F*(2, 15) = 13.96, *p* < 0.001 and *F*(2, 15) = 4.85, *p* < 0.05, respectively] at 1 and 250 mg/kg of ACH (Table 2).

### 3.3. Monoamine contents

In the bulb, we found that NA and 5-HT contents did not suffer important changes after ACH administration (250 mg/kg). However, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratio significantly increased, *F*(1, 94) = 25.59, *p* < 0.001 and *F*(1, 94) = 42.21, *p* < 0.001, respectively, during the first 12 h (Fig. 4). In the pons, NA and 5-HT contents did not alter significantly after ACH injection. Nevertheless, the 5-HIAA content only increased after 12 and 24 h, *F*(1, 94) = 8.29, *p* < 0.01, of ACH injection. We found that 5-HIAA/5-HT ratio showed significant changes at 6 and 9 h after ACH administration, *F*(1, 94) = 18.01, *p* < 0.001 (Fig. 5).

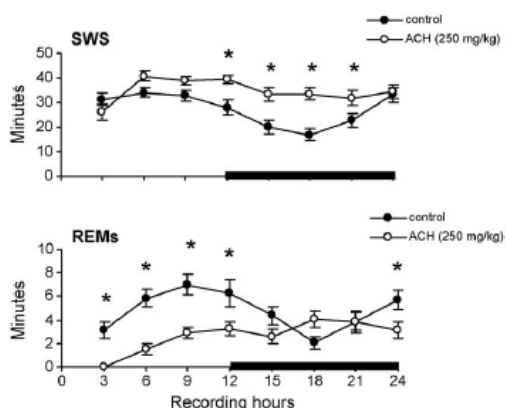


Fig. 3. Effects of acute administration of ACH (250 mg/kg, i.p.) on SWS and REMs in rats. The duration of SWS and REMs were assessed every 3 h throughout one 12-h light:12-h darkness cycle. The results were compared statistically using a two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey's test; \**p* < 0.01. The horizontal black bars on the X-axis represent the dark phase of the cycle.

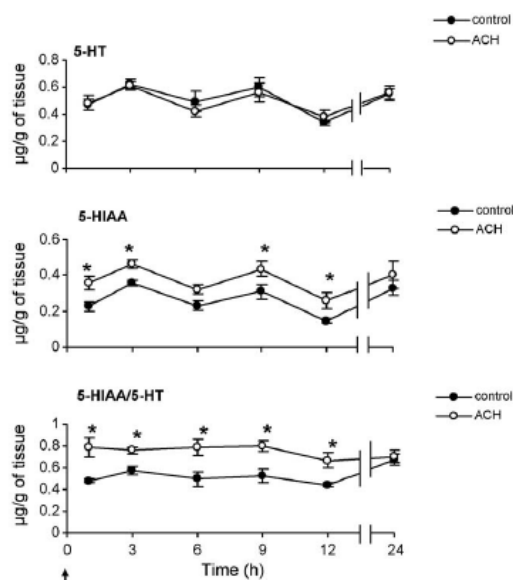


Fig. 4. Concentration of 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratio in bulb of control rats and administered with ACH (250 mg/kg, i.p.); \**p* < 0.05. Statistically significant with respect to control in two-way ANOVA followed by a Tukey's test. The arrow indicates the ACH or saline solution i.p. injection time.

By contrast, we did not find any changes on NA, 5-HT and 5-HIAA contents as well as 5-HIAA/5-HT ratio in the midbrain and hypothalamus (data not shown).

### 4. Discussion

Acetaldehyde, the principal metabolite of ethanol, is far more toxic than ethanol with an LD<sub>50</sub> in rats of 1930 mg/kg upon oral administration [2,35]. It is known that ACH can cross the



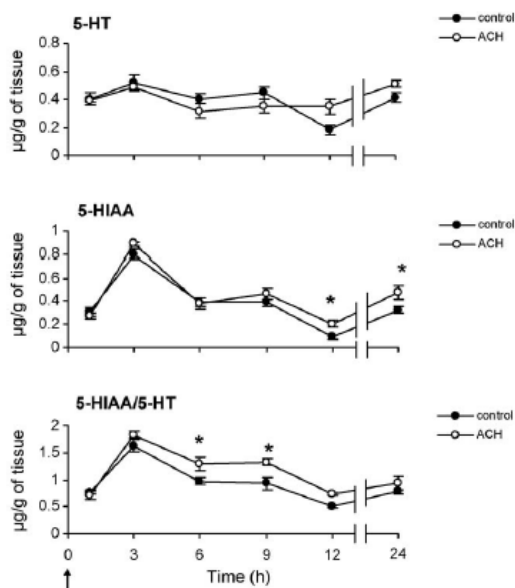


Fig. 5. Concentration of 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratio in pons of control rats and those treated with ACH (250 mg/kg, i.p.);  $p < 0.05$ . Statistically significant with respect to control in two-way ANOVA followed by a Tukey's test. The arrow indicates the ACH or saline solution i.p. injection time.

blood–brain barrier after a single intraperitoneal dose [16,41]. This metabolite has been implicated as a mediator for some behavioural and pharmacological effects of ethanol. There are some studies indicating that ethanol can cause changes in the EEG and sleep pattern disturbance [3,32]. However little is known about the effects of ACH on the sleep–wake cycle.

Our results showed that acute ACH administration alters the sleep–wake cycle decreasing the total time in wakefulness and REMs and increasing the time spent in SWS. These alterations were observed only when the highest dose of ACH was injected (250 mg/kg), most likely due to the presence of significant concentrations of ACH on the brain. Some studies have questioned the capacity of ACH to cross the blood–brain barrier and the main reason for this query is the presence of aldehyde dehydrogenase activity in the cerebral capillary walls [9]. It has been shown that treatment with disulfiram, an aldehyde dehydrogenase inhibitor, causes a marked increase in blood ACH after ethanol administration, with brain ACH increasing proportionately in relation to blood ACH [43]. This suggests that high blood ACH concentrations could saturate the enzyme aldehyde dehydrogenase in the brain capillaries and therefore enable it to cross the blood–brain barrier.

We found that 250 mg/kg ACH decrease the time spent in REMs during the first 12 h after ACH administration followed by a significant increase in SWS (Fig. 3). These findings are correlated with an increase of 5-HT metabolism observed immediately after ACH administration (Fig. 4). Then, we hypothesize that after injection of 250 mg/kg ACH, the blood and brain concentrations of ACH are probably far above the normal physio-

logical levels. Low ACH concentrations has been found (50 nM) in blood and brain after a single intraperitoneal injection of 220 mg/kg ACH [16]. Taking in account that in our experiments an equivalent dose of ACH (250 mg/kg) was injected, we speculate that similar ACH concentrations could be assess in blood and brain. In addition, 2.5  $\mu$ M ACH levels were found in blood in healthy subjects after ethanol consumption [14]. Moreover, unusual ACH values in blood as high as 548  $\mu$ M has been assessed in alcoholic patients [42]. Consequently, our results provide additional information indicating that 250 mg/kg ACH can changes the brain monoamine concentrations and therefore modify the normal sleep pattern. Such finding support previously results indicating that ethanol consumption induce substantial effects on sleep in alcoholics [3,32]. Then, these results can provide information about the possible involvement of ACH in the alterations of sleep–wake cycle and brain monoamines in alcoholic patients.

Experimentally, previous studies have demonstrated that acute ethanol administration in rats, orally or intraperitoneally, reduces the time spent in REMs in a dose-dependent manner [15,24] and increases the latency for the first REMs episode [28], as well as the total time in SWS [17,40]. We observed similar results with the acute ACH injection. This suggests that ACH could regulate the alterations observed in the sleep–wake cycle after acute ethanol administration.

However, the results observed after chronic ethanol administration are controversial; while 6 weeks of ethanol vapours exposure did not produce sleep alterations [7], ethanol ingestion for 2 and 3 weeks significantly increased the SWS in the dark period and suppressed REMs during the light period [23].

Our results showed that ACH chronically administered during 30 days alters the sleep–wake cycle in the same way that acute ACH does. Nevertheless, an important finding was that a low dose of ACH (1 mg/kg) also decreases the total time in REMs. This suggests that ACH could accumulate in the brain after repeated injections of low doses. However, more studies are necessary to determine the possible mechanism of this effect. We can confirm that the decrease of time spent in REMs in the groups administered with ACH during 30 days is not due to stress originated by the injection *per se* since significant differences on sleep parameters between acute and chronic control groups were not observed. The effects of chronic ACH on REMs were much more dramatic because we observed a decrease along 24 h. These observations suggest a state of REMs deprivation occasioned by chronic ACH and probably the presence of REMs rebound after ACH effect.

It has been shown that ethanol affects several central neurotransmission systems [8,10,25,26] and these changes are both dose and time-dependent. However, very few studies exist about the effect of ACH *per se* on the monoamines content in different regions of the brain. Reductions on the NA content have been reported at higher doses of ACH (300 mg/kg) [5,38]. At lower doses of ACH (20–100 mg/kg) studies with microdialysis have shown a decrease on the levels of 5-HT, dopamine and homovanillic acid [41], as well as a decrease of NA and dopamine in cortex and brain stem with models of ACH inhalation [13].



The 5-HT is metabolized to 5-HIAA and this metabolite is removed to the extracellular space. Therefore, it has been assumed that 5-HIAA concentrations in tissue homogenates reflect the 5-HT release and metabolism. In the present study, we measured the levels of NA, 5-HT and 5-HIAA after a single injection of ACH (250 mg/kg) at different times in order to relate the sleep alterations with changes on monoamine content in several brain regions. In general, we found a significant decrease of REMs and high levels of 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratio in some of the brain areas analyzed after ACH administration. These results could support the REM-on and REM-off hypothesis; it has been proposed that serotonergic and noradrenergic inputs to cholinergic neurons are inhibitory. Accordingly, when the dorsal raphe and locus coeruleus (neurons REM-off) activity decreases, the activation of cholinergic nuclei (neurons REM-on) related to the REMs generation is allowed [18,36]. Thus, the increased metabolism of 5-HT found in some brain regions of rats injected with ACH may be exerting inhibitory effects at different times on the cholinergic nuclei necessary for the appearance of REMs.

The noradrenergic and serotonergic neurotransmission systems are very important in the neurobiology of the sleep; however, the normal patterns of sleep depend on the complex interaction of several neurotransmission systems and sleep factors. Some data suggest that ethanol plus cyanamide, a treatment that increases the concentration of ACH in blood, originates a significant increase in corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA [21]. It has been demonstrated in animal models that CRF can affect the sleep quality, producing insomnia and a hyperarousal state [6].

In conclusion, this study suggests that acute and chronic ACH administration produces effects in REMs; however, the effects are most likely due to alterations in the metabolism of 5-HT in those regions with the largest serotonergic neuronal population.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by the fellowship number 182679 to Javier Franco-Pérez from CONACyT-México. We thank to Francisco Gutierrez for his technical assistance and Daniela Morales for reviewing the manuscript.

#### References

- Aston-Jones G, Bloom FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1981;1:876–86.
- Brecher AS, Hellman K, Busista MH. A perspective on acetaldehyde concentrations and toxicity in man and animals. *Alcohol* 1997;14:493–6.
- Brower KJ. Alcohol's effects on sleep in alcoholics. *Alcohol Res Health* 2001;25:110–25.
- Diggory GL, Buckett WR. An automated method to measure monoamines and metabolites using elevated temperature reversed phase HPLC with electrochemical detection. Application to striatal dopamine and hippocampal serotonin turnover. *J Pharmacol Meth* 1984;11:207–17.
- Duritz G, Trullit EB. Importance of acetaldehyde in the action of ethanol on brain norepinephrine and 5-hydroxytryptamine. *Biochem Pharmacol* 1966;15:711–21.
- Ehlers CL, Reed TK, Henriksen SJ. Effects of corticotrophin-releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology* 1986;42:467–74.
- Ehlers CL, Slawewski CJ. Effects of chronic ethanol exposure on sleep in rats. *Alcohol* 2000;20:173–9.
- Eisenhofer G, Szabo G, Hoffman PL. Opposite changes in turnover of noradrenaline and dopamine in the CNS of ethanol-dependent mice. *Neuropharmacology* 1990;29:37–45.
- Eriksson CJP, Sippel HW. The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation. I. The distribution of acetaldehyde in liver, brain, blood and breath. *Biochem Pharmacol* 1977;26:241–7.
- Fadda F, Argiolas A, Melis MR, Serra G, Gessa GL. Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci* 1980;27:979–86.
- Foot SL, Aston-Jones G, Bloom FE. Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3033–7.
- Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of <sup>3</sup>H-norepinephrine, <sup>3</sup>H-dopamine, and <sup>3</sup>H-DOPA in various regions of the brain. *J Neurochem* 1966;13:655–69.
- Hashimoto T, Ueha T, Kuriyama T, Katsura M, Kuriyama K. Acetaldehyde-induced alterations in metabolism of monoamines in mouse brain. *Alcohol* 1989;24:91–9.
- Hatake K, Taniguchi T, Ouchi H, Sakaki N, Hishida S, Ijiri I. Possible involvement of kinins in cardiovascular changes after alcohol intake. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;35:437–42.
- Hattan DG, Eacho PI. Relationship of ethanol blood level to REM and non-REM sleep time and distribution in the rat. *Life Sci* 1978;22:839–46.
- Heap L, Ward RJ, Abiaka C, Dexter D, Lawlor M, Pratt O, et al. The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem Pharmacol* 1995;50:263–70.
- Hill SY, Reyes RB. Effects of L-tryptophan and ethanol on sleep parameters in the rat. *Psychopharmacology* 1978;58:229–33.
- Hobson JA, McCarley RW, Wyzinsky PW. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 1975;189:55–8.
- Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain—a review. *Alcohol* 1996;13:147–51.
- Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 1969;163:32–41.
- Kinoshita H, Jessop DS, Finn DP, Coventry TL, Roberts DJ, Ameno K, et al. Acetaldehyde, a metabolite of ethanol, activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Alcohol* 2001;36:59–64.
- Korsten MA, Matsuzaki S, Feinman L, Lieber CS. High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. *New Engl J Med* 1975;292:386–9.
- Kubota T, De A, Brown RA, Simasko SM, Krueger JM. Diurnal effects of acute and chronic administration of ethanol on sleep in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1153–61.
- Mendelson WB, Hill SY. Effects of the acute administration of ethanol on the sleep of the rat: a dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav* 1978;8:723–6.
- Milio C, Hadfield MG. Ethanol alters monoamines in specific mouse brain regions. *Brain Res Bull* 1992;29:599–603.
- Palencia G, Ríos C, Sotelo J. Clomipramine increases the striatal concentrations of dopamine and homovanillic acid in rats chronically consuming alcohol. *J Stud Alcohol* 2001;62:724–9.
- Portas CM, Bjorvatn B, Fagerland S, Gronli J, Mundal V, Sorensen E, et al. On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat. *Neuroscience* 1998;83:807–14.
- Prospero O, Criado JR, Henriksen SJ. Pharmacology of ethanol and glutamate antagonists on rodent sleep: a comparative study. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:413–6.
- Quertemont E, Grant KA, Correa M, Ariziz MN, Salamone JD, Tambour S, et al. The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:221–34.



- [30] Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol* 2005;75:247–74.
- [31] Ridge JW. The metabolism of acetaldehyde by the brain in vivo. *Biochem J* 1963;88:95–9.
- [32] Roehrs T, Roth T. Sleep, sleepiness and alcohol use. *Alcohol Res Health* 2001;25:101–9.
- [33] Sippel HW. The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *J Neurochem* 1974;23:451–2.
- [34] Smith BR, Aragon CMG, Amit Z. Catalase and the production of brain acetaldehyde: a possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. *Addict Biol* 1997;2:277–89.
- [35] Smyth HF, Carpenter CP, Weil CS. Range-finding toxicity data: List IV. *Arch Ind Hyg Occup Med* 1951;4:119–22.
- [36] Steriade M. Basic mechanisms of sleep generation. *Neurology* 1992;42(Suppl 6):9–17.
- [37] Tabakoff B, Anderson RA, Ritzmann RF. Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 1976;25:1305–9.
- [38] Thadani PV, Truitt EB. Effect of acute ethanol or acetaldehyde administration on the uptake, release, metabolism and turnover rate of norepinephrine in rat brain. *Biochem Pharmacol* 1977;26:1147–50.
- [39] Trulson ME, Jacobs BL. Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioural arousal. *Brain Res* 1979;163:135–50.
- [40] Vitiello MV. Sleep, alcohol and alcohol abuse. *Addict Biol* 1997;2:151–8.
- [41] Ward RJ, Colantuoni C, Dahchour A, Quertemont E, De Witte P. Acetaldehyde-induced changes in the monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 1997;36:225–32.
- [42] Watanabe A, Kobayashi M, Hobaru M, Nakatsukasa H, Nagashima H, Fujimoto A. A report of unusually high blood ethanol and acetaldehyde levels in two surviving patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1985;9:14–6.
- [43] Westcott JY, Weiner H, Shultz J, Myers RD. *In vivo* acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. *Biochem Pharmacol* 1980;29:411–7.

## X. BIBLIOGRAFIA

Abe K, Yamaguchi S, Sugiura M, Saito H. (1999) The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Br J Pharmacol.* 127: 1805-1810.

Allada R, Emery P, Takehashi J, Robash M. (2001) Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu Rev Neurosci.* 24: 1091-1119.

Aragon C, Rogan F, Amit Z. (1992) Ethanol metabolism in rat brain homogenates by catalase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochem Pharmacol.* 44: 93-98.

Aston-Jones G, Bloom F. (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci.* 1: 876-886.

Aston-Jones G. (2005) Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep Med.* 6 Suppl. 1: 53-57.

Baghdoyan H. (1997) Location and quantification of muscarinic receptor subtypes in rat pons: implications for REM sleep generation. *Am J Physiol.* 273: R896-R904.

Batini C, Moruzzi G, Palestini G, Rossi F, Zanchetti A. (1958) Persistent patterns of wakefulness in the pretectal midpontine preparation. *Science.* 128: 30-32.

Berridge C, Foote S. (1991) Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J Neurosci.* 11: 3135-3145.

Berridge C, Abercrombie E. (1999) Relationship between locus coeruleus discharge rates and rates of norepinephrine release within neocortex as assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience.* 93: 1263-1270.

Berridge C, España R. (2000) Synergistic sedative effects of noradrenergic alpha(1)- and beta-receptor blockade on forebrain electroencephalographic and behavioral indices. *Neuroscience.* 99: 495-505.

Berridge C, Isaac S, Espana R. (2003a) Additive wake-promoting actions of medial basal forebrain noradrenergic alpha1- and beta-receptor stimulation. *Behav Neurosci.* 117: 350-359.

Berridge C, Waterhouse B. (2003b) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev.* 42: 33-84.

Blitzer R, Gil O, Landau E. (1990) Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol. *Brain Res.* 537: 203-208.

Borbély A, Tobler I. (1989) Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol Rev.* 69: 605-670.

Brecher A, Hellman K, Basista M. (1997) A perspective on acetaldehyde concentrations and toxicity in man and animals. *Alcohol*. 14: 493-496.

Brower K. (2001) Alcohol's effects on sleep in alcoholic. *Alcohol Res Health*. 25: 110-125.

Brown Z, Amit Z, Rockman G. (1979) Intraventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive laboratory rats. *Psychopharmacology*. 64: 271-276.

Coleman C, Lydic R, Baghdoyan H. (2004) M2 muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation. *Neuroscience*. 126: 821-830.

Correa M, Arizzi M, Betz A, Mingote S, Salamone J. (2003) Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Res Bull*. 62: 197-202.

Curtis D, Hosli L, Johnston G, Johnston I. (1968) The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Exp Brain Res*. 5 : 235-258.

De Lecea L, Kilduff T, Peyron C, Gao X, Foye P, Danielson P. (1998) The hypocretins : hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *PNAS*. 95: 322-327.

Derbyshire A, Rempel B, Forbes R. (1936) The effect of anesthetics on action potentials in cerebral cortex of the cat. *Am J Physiol*. 116: 557-596.

Dugovic C, Wauquier A, Leysen J, Marrannes R, Janssen P. (1989) Functional role of 5-HT2 receptors in the regulation of sleep and wakefulness in the rat. *Psychopharmacology*. 97: 436-442.

Duritz G, Truitt B. (1966) Importance of acetaldehyde in the action of ethanol on brain norepinephrine and 5-hydroxytryptamine. *Biochem Pharmacol*. 15: 711-721.

Dzoljic M, Ukponmwan O, Saxena P. (1992) 5-HT1-like receptor agonists enhance wakefulness. *Neuropharmacology*. 31: 623-633.

Ehlers C, Reed T, Henriksen S. (1986) Effects of corticotrophin-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology*. 42: 467-474.

Ehlers C, Slawewski C. (2000) Effects of chronic ethanol exposure on sleep in rats. *Alcohol*. 20: 173-179.

Eisenhofer G, Szabo G, Hoffman P. (1990) Opposite changes in turnover of noradrenaline and dopamine in the CNS of ethanol-dependent mice. *Neuropharmacology*. 29: 37-45.

Eriksson C, Sippel H. (1977) The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation. The distribution of acetaldehyde in liver, brain, blood and breath. *Biochem Pharmacol*. 26: 241-247.

Estabrooke I, McCarthy M, Ko E, Chou T, Chemelli R, Yanagisawa M, Saper C, Scammell T. (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci*. 21: 1656-1662.

Fadda F, Argiolas A, Melis M, Serra G, Gessa G. (1980) Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci.* 27: 979-986.

Foddai M, Dosia G, Spiga S, Diana M. (2004) Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology.* 29: 530-536.

Foote S, Bloom F, Aston-Jones G. (1983) Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev.* 63: 844-913.

Gallopín T. (2004) Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the ventrolateral preoptic nucleus: an *in vitro* pharmacologic study. *Sleep.* 27: 19-25.

Garau C, Aparicio S, Rial R, Esteban S. (2005) La evolución del sueño: las aves en la encrucijada entre mamíferos y reptiles. *Rev Neurol.* 40: 423-430.

García-García F, Drucker-Colín R. (1999) Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Prog Neurobiol.* 58: 297-314.

Gauthier P, Arnaud C, Stutzmann J, Gottesmann C. (1997) Influence of zopiclone, a new generation hypnotic, on the intermediate stage and paradoxical sleep in the rat. *Psychopharmacology.* 130: 139-143.

Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi P. (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci.* 20: 4217-4225.

González M, Aston-Jones G. (2006) Circadian regulation of arousal: role of the noradrenergic locus coeruleus system and light exposure. *Sleep.* 29: 1327-1336.

Goodwin G, Grenn A. (1985) A behavioral and biochemistry study in mice and rats of putative selective agonists and antagonists for 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Br J Pharmacol.* 84: 743-753.

Goosens K, Maren S. (2002) Long term potentiation as a substrate for memory: evidence from studies of amygdaloid plasticity and Pavlovian fear conditioning. *Hippocampus.* 12: 592-599.

Gottesman C, Gandolfo G, Arnaud C, Gauthier P. (1998) The intermediate stage and paradoxical sleep in the rat: influence of three generations of hypnotics. *Eur J Neurosci.* 10: 409-414.

Hagan J, Leslie R, Patel S, Evans M, Wattam T, Holmes S, Benham C, Taylor S, Routledge C, Hemmati P, Munton R, Ashmeade T, Shah A, Hatcher J, Hatcher P, Jones D, Smith M, Piper D, Hunter A, Porter R, Upton N. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *PNAS.* 96: 10911-10916.

Hamby-Mason R, Chen J, Schenker S, Perez A, Henderson G. (1997) Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 21: 1063-1072.

Hansson T, Tindberg N, Ingelman M, Kohler C. (1990) Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 34: 451-463.

Harris C. (2005) Neurophysiology of sleep and wakefulness. *Respir Care Clin N Am*. 11: 567-586.

Hashimoto T, Ueha T, Kuriyama T, Katsura M, Kuriyama K. (1989) Acetaldehyde-induced alterations in metabolism of monoamines in mouse brain. *Alcohol Alcohol*. 24: 91-99.

Hatake K, Taniguchi T, Ouchi H, Sakaki N, Hishida S, Ijiri I. (1990) Possible involvement of kinins in cardiovascular changes after alcohol intake. *Pharmacol Biochem Behav*. 35: 437-442.

Hattan D, Eacho P. (1978) Relationship of ethanol blood level to REM and non-REM sleep time and distribution in the rat. *Life Sci*. 22: 839-846.

Heap L, Ward R, Abiaka C, Dexter D, Lawlor M, Oliver P, Thomson A, Shaw K, Peters T. (1995) The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem Pharmacol*. 50: 263-270.

Hernández-Peón R. (1962) Sleep induced by localized electrical or chemical stimulation of the forebrain. *EEG Clin Neurophysiol*. 14: 423-424.

Hess R, Koella W, Akert K. (1953) Cortical and subcortical recordings in natural and artificially induced sleep in cats. *EEG Clin Neurophysiol*. 5: 75-90.

Hill S, Reyes B. (1978) Effects of L-tryptophan and ethanol on sleep parameters in the rat. *Psychopharmacology*. 58: 229-233.

Hiriart M. (1998) Mensajeros químicos y regulación neuroendocrina. En: Fanjul M, Hiriart M, Fernández de Miguel F. (Eds). *Biología funcional de los animales*. pp 235-238. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Hobson J, McCarley R, Wyzinsky P. (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*. 189: 55-58.

Holtzman S, Scheneider F. (1974) Comparison of acetaldehyde and ethanol: depression in motor activity in mice. *Life Sci*. 14: 1243-1250.

Hunt W. (1996) Role of acetaldehyde in the action of ethanol on the brain – a review. *Alcohol*. 13: 147-151.

Imeri L, Bianchi S, Angeli P, Mancina M. (1994) Selective blockade of different brain stem muscarinic receptor subtypes: effects on the sleep-wake cycle. *Brain Res*. 636: 68-72.

Imeri L, De Simoni M, Giglio R, Clavenna A, Mancina M. (1994) Changes in the serotonergic system during sleep-wake cycle: simultaneous polygraphic and voltammetric recordings in hypothalamus using a telemetry system. *Neuroscience*. 58: 353-358.

Jacobs B, Fornal C. (1991) Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animals. *Pharmacol Rev*. 43: 563-578.

Jamal M, Ameno K, Kumihashi M, Ameno S, Kubota T, Wang W, Ijiri I. (2003) Microdialysis for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in the striatum of freely moving rats. *J Chromatog.* 798: 155-158.

Jamal M, Ameno K, Wang W, Kumihashi M, Ameno S, Ikuo U, Shinji A, Ijiri I. (2005) Inhibition of acetaldehyde metabolism decreases acetylcholine release in medial frontal cortex of freely moving rats. *Brain Res.* 1039: 90-96.

John J, Wu M, Boehmer L, Siegel J. (2004) Cataplexy-active neurons in the hypothalamus: implications for the role of histamine in sleep and waking behavior. *Neuron.* 42: 619-634.

Jouvet M. (1967) Neurophysiology of states of sleep. *Physiol Rev.* 47: 117-177.

Jouvet M. (1969) Biogenic amines and the states of sleep. *Science.* 163: 32-41.

Keilin D, Martree E. (1945) Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohol. *Biochem J.* 39: 293-301.

Kinoshita H, Jessop D, Finn D, Coventry T, Roberts D, Ameno K. (2001) Acetaldehyde, a metabolite of ethanol, activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Alcohol Alcohol.* 36: 59-64.

Kubota T, De A, Brown R, Simasko S, Krueger J. (2002) Diurnal effects of acute and chronic administration of ethanol on sleep in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 26: 1153-1161.

Lancel M, Grönlein T, Faulhaber J. (1996) Role of GABA<sub>A</sub> receptors in sleep regulation. Differential effects of muscimol and midazolam on sleep in rats. *Neuropsychopharmacology.* 15: 63-74.

Lancel M. (1997) The GABA<sub>A</sub> agonist THIP increases non-REM sleep and enhances non-REM sleep-specific delta activity in the rat during dark period. *Sleep.* 20: 1099-1104.

Lee M, Hassani O, Jones B. (2005) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci.* 25: 6716-6720.

Levine E, Jacobs B. (1992) Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat. *J Neurosci.* 12: 4037-4044.

Lieber C. (1997) Cytochrome P450 E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev.* 77: 517-544.

Lin J, Sakai K, Jouvet M. (1988) Evidence for histaminergic arousal mechanism in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacology.* 27: 111-122.

Marrosu F, Portas C, Mascia M, Casu M, Fa M, Giagheddu M, Imperato A, Gessa G. (1995) Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res.* 671: 329-332.

Martinez S, Vaglenova J, Sabria J, Martinez M, Farres J, Pares X. (2001) Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. *Eur J Biochem.* 268: 5045-5056.



Mendelson W, Hill S. (1978) Effects of the acute administration of ethanol on the sleep of the rat: a dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav.* 8: 723-726.

Milio C, Handfield M. (1992) Ethanol alters monoamines in specific mouse brain regions. *Brain Res Bull.* 29: 599-603.

Monti J, Pellejero T, Jantos H. (1986) Effects of H1- and H2-histamine receptor agonists and antagonists on sleep and wakefulness in the rat. *J Neural transm.* 66 : 1-11.

Morales F, Engelhardt J, Soja P, Pereda A, Chase M. (1987) Motoneuron properties during motor inhibition produced by microinjection of carbachol into the pontine reticular formation of the decerebrate cat. *J Neurophysiol.* 57: 1118-1129.

Moruzzi G, Magoun H. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalog Clin Neurophysiol.* 1: 455-473.

Myers W, Ng K, Marzuki S, Myers R, Singer G. (1984) Alteration of alcohol drinking in the rat by peripherally self-administered acetaldehyde. *Alcohol.* 1: 229-236.

Nitz D, Siegel J. (1996) GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am J Physiol.* 271: R1707-R1712.

Nitz D, Siegel J. (1997a) GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol.* 273: R451-R455.

Nitz D, Siegel J. (1997b) GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep-wake state. *Neuroscience.* 78: 795-801.

Nuñez-Molina A, Amzica F. (2004) Mecanismos de generación de las oscilaciones lentas del electroencefalograma durante el sueño. *Rev Neurol.* 39: 628-633.

Orem J. (1980) Neuronal mechanism of respiration in REM sleep. *Sleep.* 3: 235-246.

Orem J, Lovering A, Dunin-Barkowski W, Vidruk E. (2002) Tonic activity in the respiratory system in wakefulness, NREM and REM sleep. *Sleep.* 25: 488-496.

Panés J, Caballería J, Guitart R, Pares A, Soler X, Rodamilans M, Navasa M, Parés X, Bosch J, Rodés J. (1992) Determinants of ethanol and acetaldehyde metabolism in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 17: 48-53.

Pellejero T, Monti J, Baglietto J, Jantos H, Pazos S, Cichevski V, Hawkins M. (1984) Effects of methoxamine and  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists, prazosin and yohimbine, on the sleep-wake cycle of the rat. *Sleep.* 7: 365-372.

Ponzoni A, Monti J, Jantos H. (1993) The effects of selective activation of the 5-HT<sub>3</sub> receptor with m-chlorophenylbiguanide on sleep and wakefulness in the rat. *Eur J Pharmacol.* 249: 259-264.

Porkka-Heiskanen T, Strecker R, Thakkar M, Bjorkum A, Greene R, McCarley R. (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science.* 276: 1265-1268.

Portas C, Bjorvatn B, Ursin R. (2000) Serotonin and sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol.* 60: 13-35.

Prospero O, Criado J, Henriksen S. (1994) Pharmacology of ethanol and glutamate antagonist on rodent sleep: a comparative study. *Pharmacol Biochem Behav.* 49: 413-416.

Quertemont E, de Witte P. (2001) Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacol Biochem Behav.* 68: 449-454.

Quertemont E, Grant K, Correa M, Arizzi M, Salamone J, Tambour S, Aragon C, McBride W, Rodd Z, Goldstein A, Zaffaroni A, Li T, Pisano M, Diana M. (2005) The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 29: 221-234.

Quertemont E, Tambour S, Bernaerts P, Zimatkin S, Tirelli E. (2004) Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects. *Psychopharmacology.* 177: 84-92.

Rainnie D, Grunzer H, McCarley R, Greene R. (1994) Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. *Science.* 263: 689-692.

Rechtschaffen A, Kales A. (1968) A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. *Brain Information Service/Brain Research Institute, Los Angeles.*

Rechtschaffen A, Bergmann B. (2002) Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep.* 24: 18-24.

Reppert S, Weaver D. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 63: 647-676.

Rodd Z, Goldstein A, Zaffaroni A, Li T. (2004) Contrasting the reinforcing actions of acetaldehyde and ethanol within the ventral tegmental area (VTA) of alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 28 (Suppl): 196A.

Rodd-Hendricks Z, Melendez R, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride W, Lu T. (2002) The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 72: 55-64.

Roehrs T, Roth T. (2001) Sleep, sleepiness and alcohol abuse. *Alcohol Res Health.* 25: 101-109.

Saper C, Chou T, Scamell T. (2001) The sleep switch : hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* 24: 726-731.

Schwierin B, Borbély A, Tobler I. (1996) Effects of N-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. *Eur J Pharmacol.* 300: 163-171.

Senba E, Daddona P, Watanabe T, Wu J, Nancy J. (1985) Coexistence of adenosine deaminase, histidine decarboxylase and glutamate decarboxylase in hypothalamus neurons of the rat. *J Neurosci.* 5: 3393-3402.

Sherin J, Elmquist J, Torrealba F, Saper C. (1998) Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci.* 18: 4705-4721.

Smith B, Amit Z, Splawinsky J. (1984) Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol.* 1: 193-195.

Smyth H, Carpenter C, Weil C. (1951) Range-finding toxicity data: List IV. *Arch Ind Hyg Occup Med.* 4: 119-122.

Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro R. (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci.* 10: 2541-2559.

Steriade M. (1992) Basic mechanism of sleep generation. *Neurology.* 42: 9-17.

Tabakoff B, Anderson R, Ritzmann R. (1976) Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochem Pharmacol.* 25: 1305-1309.

Taylor P, Brown J. (1989) Acetylcholine. En: Siegel G, Agranoff B, Albers R, Molinoff P. (Eds). *Basic Neurochemistry.* pp 203-231. Raven Press. New York.

Thadani V, Truitt B. (1977) Effect of acute ethanol or acetaldehyde administration on the uptake, release, metabolism and turnover rate of norepinephrine in rat brain. *Biochem Pharmacol.* 26: 1147-1150.

Thannickal T, Moore R, Nienhuis R. (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron.* 27: 469-474.

Velayos J, Hernández J, Moleres F. (2003) Neurobiología del sueño: Cajal y la neurociencia actual. *Rev Neurol.* 37: 494-498.

Velazquez-Moctezuma J, Gillin J, Shiromani P. (1989) Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res.* 503: 128-131.

Ward R, Colantuoni C, Dahchour A, Quertemont E, De Witte P. (1997) Acetaldehyde-induced changes in the monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology.* 36: 225-232.

Warner M, Gustafsson J. (1994) Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *PNAS.* 91: 1019-1023.

Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H. (1984) Distribution of histaminergic system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 295: 13-25.

Watanabe A, Kobayashi M, Hobara M, Nakatsukasa H, Nagashima H, Fujimoto A. (1985) A report of unusually high blood ethanol and acetaldehyde levels in two surviving patients. *Alcohol Clin Exp Res.* 9: 14-16.

Weiner N, Molinoff P. (1989) Catecholamines. En: Siegel G, Agranoff B, Albers R, Molinoff P. (Eds). *Basic Neurochemistry*. pp 233-269. Raven Press. New York.

Westcott J, Weiner H, Shultz J, Myers R. (1980) In vivo acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. *Biochem Pharmacol*. 29: 411-417.

Williams J, Comisarow J, Day J, Fibiger H, Reiner P. (1994) State-dependent release of acetylcholine in rat thalamus measured by in vivo microdialysis. *J Neurosci*. 14: 5236-5242.

Wu M, John J, Boehmer L. (2004) Activity of dorsal raphe cells across the sleep-waking cycle and during cataplexy in narcoleptic dogs. *J Physiol*. 554: 202-215.

Zimatkin S. (1991) Histochemical study of aldehyde deshydrogenase in the rat CNS. *J Neurochem*. 56: 1-11.