



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Facultad de Medicina

**“ESTUDIO ELECTROENCEFALOGRÁFICO DE LOS
EPISODIOS DE INMOVILIDAD EN LA RATA *taiep*:
PAPEL DEL SISTEMA COLINÉRGICO”**

Tesis

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta

M.C. Ma. del Carmen Cortés Sánchez

Tutor

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Comité tutorial

Dr. Raúl Aguilar Roblero

Dr. Oscar Prospero García



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de neurofisiología de la conducta y control motor del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, fue parcialmente financiado por los donativos CONACyT 106694 y VIEP/SAL/G/2010 y 2011 a cargo del Dr. José Ramón Eguibar.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) e l apoyo financiero que me otorgó a través de la beca No. 115229 para los estudios de Doctorado.

Agradezco a l a Coordinación General de Capacidad y Competitividad Académica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a l a Secretaría de Educación Pública a través del apoyo PROMEP-BUAP-688.

Agradezco al Dr. José Ramón Eguibar su apoyo, confianza y enseñanza durante la realización de este trabajo de tesis.

Agradezco al comité tutoral: Dr. Raúl Aguilar Roblero, Dr. José Ramón Eguibar, y Dr. Oscar Prospero García, las observaciones realizadas a este trabajo, y las contribuciones para mi formación en el área del sueño.

Agradezco al jurado de examen: Dr. René Drucker Colín., Dr. José Ramón Eguibar, Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza, Dr. Manuel Salas Aivarado, Dra Rosalinda Guevara Guzmán, Dr. Rafael Salín Pascual, Dr. Raúl Aguilar Roblero las observaciones realizadas al texto final de la tesis.

In memoriam, al Dr. León F. Cintra McGlone.

Dedicatorias

A mis hijos, **Fernando** y **Ricardo**, porque su apoyo, comprensión y cariño brindado durante este periodo fueron vitales para concluir este proyecto.

A mis padres **Zenón Cortés Corona** y **Juana Sánchez Zamora**, con cariño, gracias por su ejemplo.

A mis amigas:

Dra. Ma. del Carmen Lara-Muñoz, Dra. Silvia Herrera García, Dra. Rosalía Tenorio Martínez, impulsoras en los momentos difíciles.

Al **Dr. José Ramón Eguibar**, mi compañero, amigo y cómplice en esta hermosa labor. Gracias por ser mi apoyo y amor.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
La rata <i>taiep</i>	5
Deficiencia de mielina en el sistema nervioso central	5
Episodios de inmovilidad	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
EXPERIMENTO 1	13
EPISODIOS DE INMOVILIDAD	13
Objetivos	13
Hipótesis	13
EXPERIMENTO 2	14
CICLO SUEÑO-VIGILIA EN LA RATA <i>TAIEP</i>	14
Objetivos	14
Hipótesis	14
EXPERIMENTO 3	15
SISTEMA COLINÉRGICO	15
Objetivo	15
Hipótesis	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Animales y condiciones	16

Procedimiento para la inducción de episodios de inmovilidad	17
Registro conductual	18
Cirugía	19
Registro electroencefalográfico	22
Histología	24
Análisis	25
Drogas empleadas	26
Administración de drogas colinérgicas	27
Procedimiento para evaluar los EIs con drogas colinérgicas	27
Análisis estadístico	28
RESULTADOS	29
CAPÍTULO 1	29
EPISODIOS DE INMOVILIDAD	29
EPISODIOS DE INMOVILIDAD INDUCIDOS POR MANIPULACIÓN	29
Ontogenia de los episodios de inmovilidad	30
Dimorfismo sexual de los episodios de inmovilidad	31
Método de inducción de los episodios de inmovilidad	33
EPISODIOS DE INMOVILIDAD ESPONTÁNEOS	33
Distribución en veinticuatro horas	34
Actividad electroencefalográfica durante el episodio de Inmovilidad.	37
Duración de los episodios de inmovilidad espontáneos e inducidos por manipulación.	37
DISCUSIÓN EXPERIMENTO 1	39

CAPÍTULO 2	45
CICLO SUEÑO-VIGILIA EN LA RATA <i>TAIEP</i>	45
Vigilia	49
Sueño de ondas lentas	51
Sueño con movimientos oculares rápidos	52
Distribución de los episodios de inmovilidad espontáneos	52
Características electroencefalográficas de los episodios de inmovilidad.	53
Características electromiográficas de los episodios de Inmovilidad.	59
DISCUSIÓN EXPERIMENTO 2	65
CAPÍTULO 3	75
SISTEMA COLINÉRGICO	75
AGONISTAS COLINÉRGICOS	75
Arecolina	75
McN-A-343	77
Oxotremorina-M	79
Pilocarpina	83
ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS	84
Triexifenidil	84
Sulfato de atropina	87
4-DAMP	89
Pirenzepina	91
DISCUSIÓN EXPERIMENTO 3	96

DISCUSIÓN GENERAL	103
CONCLUSIÓN	122
PERSPECTIVAS	124
APÉNDICE “A”	125
Inmovilidad	125
Inducción del reflejo de inmovilidad	127
Hipótesis sobre la inmovilidad.	129
Inmovilidad Farmacológica	134
APÉNDICE “B”	136
Sueño	136
Teoría de la Restauración.	137
Teoría de la Adaptación.	137
Caracterización electroencefalográfica del sueño.	138
Historia	142
Regulación del ciclo sueño-vigilia	143
Patología del sueño.	147
Narcolepsia	148
Modelos animales de narcolepsia	150
Tratamiento de la narcolepsia	156
Genética de la narcolepsia	157
APÉNDICE “C”	159
Actividad locomotora	159
Sistema colinérgico.	160
Sistema activador reticular ascendente	164

Formación reticular	164
REFERENCIAS	167

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ChAT	Colina acetil transferasa
DA	Dopamina
EEG	Electroencefalograma
EIs	Episodios de inmovilidad
EOG	Electrooculograma
EMG	Electromiograma
FRP	Formación reticular pontina
GAM	Glicoproteína asociada a la mielina
MOR	Movimientos oculares rápidos
NMOR	No-movimientos oculares rápidos
NA	Noradrenalina
NCP	2',3'-nucleótido cíclico fosfodiesterasa
PMD	Prueba para mantenerse despierto
RI	Reflejo de inmovilidad
SARA	Sistema activador reticular ascendente
SOL	Sueño de ondas lentas
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
PBM	Proteína básica de mielina
PLMS	Prueba de latencia múltiple al sueño

PPL	Proteína proteolipídica
RER	Retículo endoplásmico rugoso
Snr	Sustancia nigra parte reticulada
TPP	Tegmento pedúnculo pontino
TLD	Tegmento latero dorsal
McN343-A	(4-hydroxi-2-butilil)-1- trimetilamoni-m-chlorocarbanilato
4-DAMP	1,1-Dimethil-4-diphenylacetoxy piperidinium iodine

RESUMEN

La rata *taiep* muestra un síndrome motor progresivo caracterizado por temblor, ataxia, episodios de inmovilidad (EIs), epilepsia y parálisis del tren posterior. La rata presenta una hipomielinización inicial seguida de una desmielinización progresiva debido a una acumulación de microtúbulos en el citoplasma y en los procesos de los oligodendrocitos. En el presente trabajo se analizó el ciclo sueño vigilia de la rata *taiep*, se caracterizaron los EIs en machos y hembras, a lo largo de la ontogenia así como su distribución circádica en ratas adultas; mostrando que las ratas macho tienen más EIs a los 7 y 9 meses y con dos picos de alta frecuencia, uno a la mitad de la noche y el otro al final del periodo de luz.

Mediante registros polisomnográficos de 24 horas de duración, se mostró que la rata *taiep* tiene un menor número de transiciones entre diferentes etapas del ciclo sueño-vigilia. Es importante destacar que el sueño con movimientos oculares rápidos (MOR) en la rata *taiep*, se forma tanto por el sueño MOR, más los episodios de inmovilidad, con características similares a las del sueño MOR. Estos EIs se presentan tanto en la fase de luz como en la de oscuridad, pero dos tercios de ellos se producen durante el periodo iluminado. Los cambios del tono muscular permitieron caracterizarlos en tres subtipos, todos asociados a actividad beta en la corteza cerebral y a ritmo theta en el hipocampo, pero con un tono muscular que oscila de manera característica. Estos hallazgos apuntan a que el mutante mielínico es un modelo de trastorno del sueño MOR, con características similares a la narcolepsia-cataplejía de los perros y humanos. Se analizó el efecto de la administración sistémica de agonistas colinérgicos muscarínicos como: arecolina, McN343-A, oxotremorina-M y pilocarpina y antagonistas como, la atropina sulfato, 4-DAMP, es copolamina, triexifenidil y pirenzepina en los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación de la base de la cola. Los resultados obtenidos muestran que la frecuencia de los episodios de inmovilidad (EIs) inducidos por manipulación disminuyó solamente con la oxotremorina y la pilocarpina, así como con el antagonista muscarínico triexifenidil. Pero las duraciones medias de los EIs, se incrementaron con la administración de la oxotremorina-M a la dosis más alta, con la pilocarpina y con la atropina sulfato. Este trabajo ha sido importante para establecer la estandarización de los métodos para el estudio de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación, así como para proponer a la rata *taiep* como un modelo para el estudio de la narcolepsia-cataplejía.

En conclusión, la rata *taiep* es un modelo adecuado de narcolepsia-cataplejía, ya que muestra alteraciones del sueño paradójico asociadas a pérdida del soporte postural. No hay una participación clara de los receptores colinérgicos muscarínicos.

ABSTRACT

The myelin mutant *taiep* rat was obtained, as a spontaneous mutation, in 1989 during the inbreeding process to obtain a high-yawning subline from Sprague-Dawley strain. The acronym of the neurological symptoms that characterized are: tremor, ataxia, immobility episodes (IEs), epilepsy and paralysis given its name and it is produced by initial hypomyelination, followed by a demyelination. In this thesis I analyzed the environmental variables that influenced IEs, as well as the circadian distribution of IEs and along sleep-wake cycle. Finally, I explore the role of muscarinic drugs on gripping-induced IEs. The rats were maintained under standard conditions with a 12:12 h light-dark cycle (light on 0700), under controlled temperature and humidity, and free access to rodent pellets and water.

Our results showed that, IEs start at 6.5 mo, with a peak between 8.5 to 9.5 mo. IEs also showed two peaks gripping-induced IEs, one peak in early morning (0800-1000h), and second peak in the middle of the night (2300-0100h); however spontaneous IEs showed an even distribution with a mean of 3 IEs every 2h. IEs are sexually dimorphic because males are more susceptible than females, when they are gripped them from the base of the tail. These parameters were important for the study of cholinergic drugs on IEs.

Taiep rats showed a decreased in REM sleep during the light phase that was compensated by the spontaneous IEs which had a REM-like characteristics, that is a disorganized beta activity in the cortex associated with theta rhythm in the hippocampus with a variable nuchal muscle tone, which oscillate in three characteristic patterns, being more frequent and with higher mean duration during light phase.

There is not a clear effect with the muscarinic cholinergic agonists and antagonists on gripping-induced IEs. However, donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, clearly increased IEs similar to that already obtained in the narcoleptic dogs.

In conclusion, *taiep* rats are an adequate model of narcolepsy-cataplexy with a REM sleep distribution higher during the light phase and composed by REM sleep plus IEs, with three characteristic IEs pattern of muscle tone changes supporting that *taiep* rats is a model of narcolepsy-cataplexy.

INTRODUCCIÓN

La rata *taiep*.

En 1988 en el bioterio del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se obtuvo una sublínea de ratas de la cepa Sprague-Dawley portadora de una mutación autosómica recesiva, la cual dio origen al mutante mielínico denominado *taiep* al considerar las iniciales de los cinco signos motores que la caracterizan: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis progresiva de la tibia posterior (Holmgren y cols., 1989).

Deficiencia de mielina en el sistema nervioso central

La rata *taiep* presenta un déficit de mielina en el sistema nervioso central (SNC), esta alteración está asociada con la acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos, lo que se ha propuesto altera los mecanismos de transporte de las proteínas recién sintetizadas para formar la mielina (Duncan y cols., 1992; Couve y cols., 1997; O'Connor, 2000). En contraste no se tienen evidencias de anomalías en la mielina del sistema nervioso periférico (SNP), por lo que es un modelo adecuado de alteración de la mielina central.

Bioquímicamente en la rata *taiep* se presenta una disminución general de las proteínas que forman la mielina; la proteína básica de la mielina (PBM), de la proteína proteolipídica (PPL), la 2',3'-nucleótido cíclico fosfodiesterasa (NCP) y de la

glicoproteína asociada a la mielina (GAM), (Möller y cols., 1997). De hecho, los niveles de proteínas totales y de lípidos se encuentran en niveles subnormales en todas las estructuras del SNC evaluadas (Centeno y Camacho, 1992).

Estos hallazgos apuntan a un problema en los mecanismos de transporte, como fue propuesto por Couve y cols., (1997) quienes muestran que en los oligodendrocitos de la rata *taiep* se forman complejos de microtúbulos en el retículo endoplásmico, lo que alteraría el transporte de las proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso hacia la porción *cis* del aparato de Golgi (Figura 1); (Coue y cols., 1997; Krsulovic y cols., 1999).

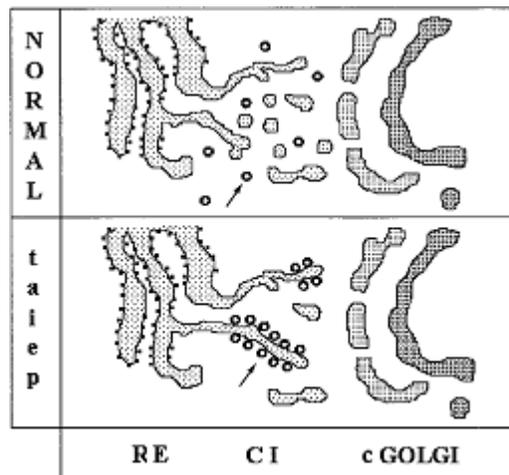


Figura 1. Representación del modelo propuesto por Couve. En oligodendrocitos normales los microtúbulos (señalados con flechas) participan en el transporte entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato *cis*-Golgi (c GOLGI). Obsérvese que no hay contacto entre los microtúbulos con las membranas, sin embargo en la rata *taiep* los microtúbulos aparecen permanentemente adosados a los elementos de transición del compartimento intermedio (CI), lo que impide el transporte (Modificado de Couve y cols., 1997).

Estudios del genoma en la rata *taiep* han mostrado los posibles sitios de una mutación en una región de la proteína 3 relacionada con el gen de las kinesinas en el cromosoma 9 (Li y cols., 2003), lo que apoyaría la idea de que el mutante tiene un problema de transporte en los oligodendrocitos. De hecho, en condiciones *in vitro* se ha mostrado que el transporte de las proteínas recién sintetizadas se realiza en sentido contrario al movimiento de las manecillas del reloj en los procesos y no como en las ratas normales (O'Connor y cols., 2000; Song y cols., 2003). En el caso de los oligodendrocitos normales (Figura 2), los microtúbulos solo crecen en el sentido de las manecillas del reloj (Song y cols., 1999). De hecho la administración de nocodazole, una droga que des polariza los microtúbulos, restituye el transporte anterógrado de los productos de proteínas y ARNm (O'Connor y cols., 2000; Song y cols., 2003).

No todos los axones mielinizados están afectados de la misma manera, en la rata *taiep* la desmielinización afecta en mayor medida a los nervios ópticos y al tracto corticoespinal, (Lunn y cols., 1997); así como los axones delgados tipo III y IV del velo del cerebelo (Song y cols., 2001).

El mutante de mielina *taiep* es un modelo único de alteraciones de la mielina, que se diferencia de los ratones que muestran mutaciones puntuales en las proteínas de la mielina, particularmente de la proteína básica de la mielina (PBM) y de la proteína proteolípídica (PPL), y que en la mayoría se asocia al cromosoma X, como se ilustra en la Tabla 1 (Hogan y Greenfield, 1984).

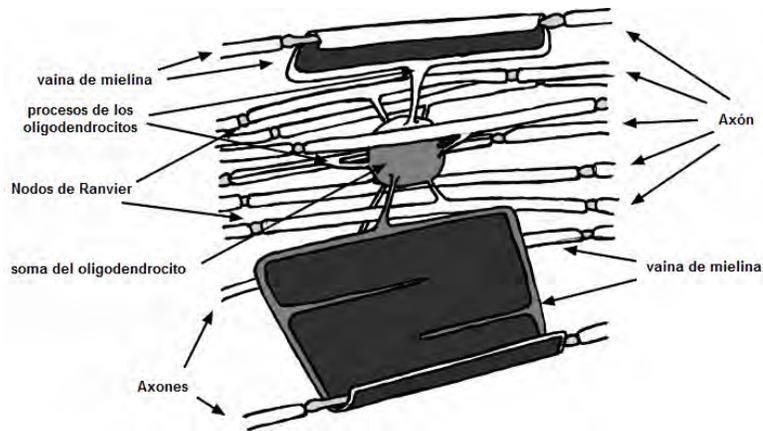


Figura 2. Oligodendrocitos y axones mielinizados. A lo largo del axón, vainas consecutivas de mielina separan a los nodos de Ranvier, sitios de propagación del potencial de acción. Cada vaina de mielina es una hoja grande de la membrana que envuelve el axón para formar láminas múltiples y está conectado con el cuerpo de la célula por procesos delgados. Cada oligodendrocitos mieliniza hasta 30-50 axones dentro de 20-30 micras en el cuerpo celular. (Modificado de Verkhatsky y Butt, 2007).

Episodios de inmovilidad

Entre las alteraciones conductuales de la rata *taiep*, es particularmente importante para este trabajo de tesis estudiar los episodios de inmovilidad, los cuales, se caracterizan por la pérdida de reflejos de soporte postural, apnea e hipertonia muscular (Holmgren y cols., 1989.), la cual produce retraimiento de las orejas, dorsiflexión de la cola (cola de Straub) y retracción de los músculos de la cara, lo que produce una facies característica, como se muestra en la Figura 3; (Cortés y cols., 2005).

El episodio de inmovilidad ha sido caracterizado desde que la rata pierde los reflejos de soporte postural hasta cuando el animal recupera el tono muscular, los reflejos de enderezamiento y la orientación ante estímulos. Las orejas regresan a su

posición vertical, se observan movimientos de los ojos, las vibrisas también se mueven nuevamente y los músculos de la cara recuperan su tono basal de tal manera que los incisivos dejan de estar expuestos, (Cortés y cols., 2005).

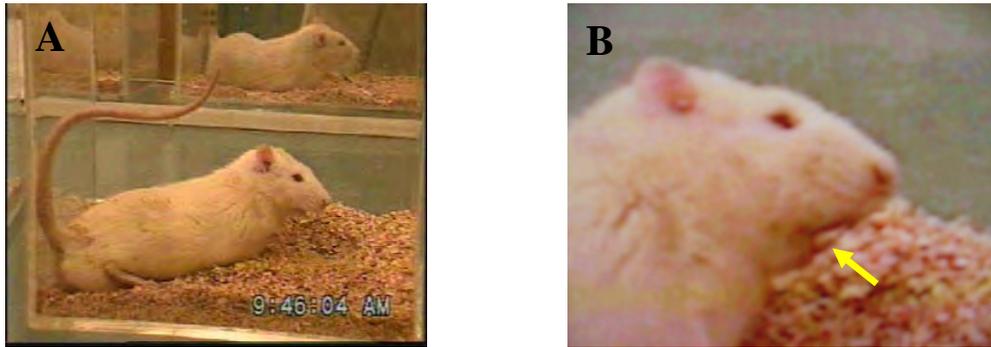


Figura 3. Rata taiep durante un episodio de inmovilidad. A) Aspecto general de un episodio de inmovilidad después de haber sido inducido al sostener al sujeto de la cola. Note la posición de la cola (cola de Straub), **B)** Note cómo se presenta una retracción de los músculos de la cara, quedando expuestos los incisivos como se señala con la flecha amarilla, y las orejas son retraídas hacia la nuca, retracción de la musculatura de la cara, lo que hace que tome una forma cónica, y produzca una facies característica (Cortés y cols., 2005).

Los episodios de inmovilidad son relevantes dado que es una conducta que irrumpe durante la vigilia. En 1991, Prieto y cols., analizaron la organización del sueño-vigilia, así como los episodios de inmovilidad en registros de corta duración (3 hrs) a la mitad de la fase de reposo (mitad de la fase de luz), en un grupo de ratas cuyo rango de edad era de los 3 a los 12 meses de edad y en ratas tanto machos como hembras. Estos autores proponen que los Els de la rata taiep son un trastorno del sueño, dado que durante ellos se presenta ritmo theta en el hipocampo y desincronización cortical (Prieto y cols., 1991), pero no se ofrecen mayores evidencias.

TABLA 1. ROEDORES MUTANTES CON DEFICIENCIA DE LA MIELINA

	Jimpy (<i>jp</i>)	Deficiencia en la síntesis de mielina (<i>jp^{dsm}</i>)	Quaking (<i>qk</i>)	Shiverer (<i>shi</i>)	Deficiencia de mielina (<i>mld</i>)	Twitcher (<i>tw</i>)	Distrofia muscular (<i>dy</i>)	Trembler (<i>Tt</i>)
GENÉTICA								
Tipo de Cromosoma	recesivo X	recesivo X (alelo <i>jp</i>)	recesivo 17	recesivo 18	recesivo 18 (alelo <i>shi</i>)	recesivo Autosómico	recesivo 10	dominante 10
MANIFESTACIONES CLÍNICAS								
Inicio de signos	11-13 días	11-13 días	11-13 días	11-13 días	11-13 días	30 días	22-26 días	8-10 días
Durante la vida	1 mes	1 mes	Normal	2-3 meses	--	Normal (?)	3-9 meses	Normal (?)
Morfología	Material sudanófilo	semeja <i>jp</i>	Pérdida de mielina	Ausencia de la línea más densa del SNC Pérdida de la mielina	semeja <i>shi</i>	Hipomielinización del SNC y SNP Macrófagos grandes con inclusiones.	Segmentos desmielinizados de raíces nerviosas del SNP	Neuropatía hipertrófica intersticial con hipomielinización.
BIOQUÍMICA (Defectos moleculares)	Pérdida severa (< 5% del control) de todos los constituyentes de la mielina del SNC; aparente muerte prematura de oligodendrocitos	Semeja <i>jp</i>	Decremento moderado (< 20% del control) de los constituyentes de la mielina del SNC; aparente defecto en el ensamble de la mielina	MBP < 3% del control	Semeja <i>shi</i>	Deficiencia de galactosilceramida β-galactosidasa	--	Decremento del 50% de los constituyentes de la mielina del SNP

(Modificada de (Hogan y Greenfield, 1984).

El otro estudio disponible con registros electroencefalográficos en la rata *taiep* es el de Anch y Laposky, 2000 en el cual proponen al índice de la densidad de movimientos oculares rápidos como un marcador biológico de enfermedades desmielinizantes. En este estudio también hay rangos grandes en la edad de los animales estudiados desde 4.5 hasta 13 meses. Adicionalmente, el registro se realizó durante dos fases consecutivas de luz, pero no en la oscuridad, mencionando solamente como un epifenómeno los EIs sin ser sistemáticamente estudiados, ya que solamente el 30% de las ratas *taiep* estudiadas lo presentaron, esto debido al amplio rango de edad empleado, en los cuales no se presentan los episodios de inmovilidad (Anch y Laposky, 2000).

Estudios realizados en el modelo de la narcolepsia en perros han reportado que la estimulación del sistema colinérgico agrava la cataplejía de manera dosis-dependiente (Reid y cols., 1994 a y b). Estos hallazgos sugieren que las estructuras colinérgicas a nivel de la formación reticular pontina (FRP), las cuales proyectan al tegmento pedúnculo pontino y al tegmento laterodorsal, están activas durante la cataplejía y en la emergencia de sueño MOR durante la vigilia en este modelo animal (Nishino y Mignot, 1997).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los trastornos del sueño afectan a un gran sector de la población por lo que resulta de gran interés el estudio en modelos animales que presenten trastornos

relacionados con el ciclo sueño-vigilia, ya que estos ofrecen un referente para determinar sus mecanismos causales y establecer terapéuticas específicas.

La rata *taiep* presenta, episodios de inmovilidad similares a la narcolepsia-cataplejía, por lo que se puede considerar a la rata *taiep* como un excelente modelo para estudiar uno de los trastornos del sueño, como es la narcolepsia-cataplejía, por lo que considero importante estudiar sistemáticamente los episodios de inmovilidad y su relación con el ciclo sueño-vigilia.

En el presente trabajo se caracterizan de manera detallada los Episodios de Inmovilidad con base a variables medio ambientales para determinar, los factores que los incrementan y establecer un referente para los estudios polisomnográficos. Es de interés evaluar polisomnográficamente los episodios de inmovilidad y la regulación del tono muscular asociado a estos episodios en las ratas *taiep* así como caracterizar plenamente el ciclo sueño-vigilia en este mutante durante 24 horas. Dado que los núcleos colinérgicos del puente (TPP/TLD) participan en la generación del sueño MOR y en la regulación del tono muscular, se propone explorar farmacológicamente el papel del sistema colinérgico muscarínico en los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación al sostenerlos de la cola.

El estudio lo dividí en tres experimentos. En el primero estudié los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación. En el segundo estudié el ciclo sueño-vigilia en ratas macho *taiep* y en el tercero exploré el papel del sistema colinérgico en los episodios de inmovilidad.

EXPERIMENTO 1

EPISODIOS DE INMOVILIDAD

Objetivos

1. Caracterizar la distribución de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación al sujetarlos por la cola, en ratas *taiep* de 8 a 9 meses de edad en un ciclo de 24 horas.
2. Caracterizar los episodios de inmovilidad en ratas *taiep* machos y hembras.
3. Estudiar si el método de inducción modifica la frecuencia de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación.

Hipótesis

Los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación dependen de variables medio ambientales.

EXPERIMENTO 2

CICLO SUEÑO-VIGILIA EN LA RATA *TAIEP*

Objetivos

1. Caracterizar la distribución de la vigilia y el sueño en ratas *taiep* de 8 a 9 meses de edad en un ciclo de 24 hrs y compararla con el de ratas Sprague-Dawley.
2. Caracterizar electrofisiológicamente los episodios de inmovilidad espontáneos a lo largo del ciclo sueño-vigilia.
3. Determinar la frecuencia de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos asociados con episodios de inmovilidad espontáneos.

Hipótesis

El ciclo sueño-vigilia se encuentra alterado en las ratas macho *taiep* adultas, presentará periodos de sueño de movimientos oculares rápidos más cortos y durante los episodios de inmovilidad se registrará un patrón electroencefalográfico similar al de sueño con movimientos oculares rápidos.

EXPERIMENTO 3

SISTEMA COLINÉRGICO

Objetivo

1. Evaluar el efecto de la administración sistémica de agonistas y antagonistas colinérgicos muscarínicos en los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación, al sujetarlos por la cola.

Hipótesis

La estimulación del sistema colinérgico muscarínico incrementará los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación en la rata *taiep* y lo opuesto con los antagonistas colinérgicos muscarínicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y condiciones.

Para este estudio se seleccionaron ratas macho *taiep*, del bioterio del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se mantuvieron en cajas colectivas de acrílico, (60X40X17 cm) con cama de aserrín (Aspen Chip) con libre acceso al alimento balanceado para roedores (Zeigler, RQ 22-5, Pennsylvania, USA) y agua purificada. El área en donde se mantuvieron se controló mediante alternancia de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, las luces se encendieron a las 0700 h. La temperatura se mantuvo a $22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y con una humedad relativa del 35-50%. La edad de los animales para los experimentos farmacológicos fue de ocho a nueve meses, dado que en este periodo se presenta un incremento en la frecuencia de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación (Cortés y cols., 2005).

Los protocolos experimentales utilizados en este estudio fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que están acordes con los códigos y leyes del séptimo título de la Ley General de Salud del gobierno de México (NOM-062-ZOO-1999), para el uso y manejo de los animales de experimentación.

Procedimiento para la inducción de episodios de inmovilidad.

Se sujetó a cada rata de la cola por 10 segundos cada 5 min (Figura 4) dado que esta maniobra es la más efectiva para producir inmovilidad en estos animales (Cortés y cols., 2005). Cuando se presentó el episodio de inmovilidad se colocó a la rata sobre el piso de la caja y se cuantificó mediante un cronómetro digital la duración del episodio en segundos, el estado activo de cada una de las ratas y la latencia al primer episodio de inmovilidad de cada animal; este es el tiempo en segundos desde el inicio de la sesión hasta el inicio del primer episodio de inmovilidad.



Figura 4. Inducción de un episodio de inmovilidad. Vea como fue manipulada la rata *taiep* para inducir los episodios de inmovilidad. Note que el animal es sujetado de la cola a nivel de la unión del tercio proximal con los dos tercios distales (región cocccígea).

El episodio de inmovilidad en la rata *taiep* se caracteriza por la pérdida de los reflejos de apoyo o postural y enderezamiento, inmovilidad, bradipnea profunda y activación tónica postural generalizada, la cual produce retraimiento de las orejas, dorsiflexión de la cola y retracción de los músculos de la cara (véase Figura 5).

El episodio de inmovilidad comprende desde que la rata pierde los reflejos de soporte postural hasta cuando recupera los reflejos de enderezamiento, orientación, las orejas regresan a su posición vertical, se ve movimiento de los globos oculares, las vibrisas se mueven nuevamente y los músculos de la cara recuperan su tono basal de tal manera que los incisivos dejan de estar expuestos.



Figura 5. Rata taiep durante un episodio de inmovilidad. Note la retracción de los músculos de la cara y la hiperextensión de los dedos, lo que muestra un predominio extensor.

Registro conductual.

Un aspecto importante fue caracterizar la conducta que presentó la rata *taiep* durante las sesiones experimentales, en las que se evaluó la susceptibilidad a la inducción de los EI ante la administración de drogas, este es un criterio adicional que permitió caracterizar el estado general de actividad del animal. Para este fin, se empleó una escala de categorización conductual que permitió clasificar la conducta del animal de acuerdo al grado de actividad locomotora que presentaba, en un rango del estado de

vigilia/somnolencia durante la prueba. De esta forma se propuso la escala que se muestra en la Tabla 2.

Las evaluaciones conductuales se hicieron, 30 segundos antes de la inducción del episodio de inmovilidad. La sumatoria de las categorías se dividió entre las 18 oportunidades de inducción que se evaluaron, durante los 90 min. La máxima puntuación corresponde a 72 y la mínima a 0, lo que equivale a una conducta de activación total o de somnolencia, respectivamente (para más detalles, ver Eguibar y cols., 2006; Cortés y cols., 2007).

Cirugía.

Para los registros polisomnográficos se realizaron implantes de electrodos bajo condiciones de antisepsia, empleando yodopovidona (Isodine™). Se implantaron tornillos de acero inoxidable conectados a un cable de acero (Plastics One Inc.) en ratas anestesiadas mediante inyecciones i.p. de 300 mg/kg de peso de hidrato de cloral (Laboratorios Monterrey). Posteriormente, se colocó a la ratita en un aparato estereotáxico (Kopf) y se efectuó una incisión media longitudinal con un escalpelo de No. 4 en la piel a lo largo de la superficie dorsal del cráneo. Con una legra se separó el periostio dejando descubiertos los huesos craneales. Con un taladro de mano (Dremel) se hicieron trépanos para implantar tres electrodos corticales: el primero en el hueso frontal derecho 2mm anterior a bregma y 2mm a la derecha de la línea media; el segundo en el hueso parietal 4 mm posterior a bregma y 2mm lateral izquierda; el tercero, 2mm posterior a lambda y 2mm a la izquierda de la línea media.

Tabla 2. Escala conductual

PUNTAJE	CATEGORÍA	CONDUCTA
0	Somnolienta	<p>ojos cerrados e inmovilidad</p> 
1	Quieta	<p>ojos completamente abiertos</p> 
2	activación +	<p>husmeo y movimiento de cabeza</p> 
3	Activación ++	<p>aseo, rascado y erguidos</p> 
4	activación +++	<p>locomoción, saltos</p> 

Adicionalmente, se implantó un electrodo bipolar de profundidad de platino trenzado en el hipocampo derecho empleando las coordenadas estereotáxicas P: 4mm, respecto a bregma, L: 2mm, V: 2.5mm desde la superficie del cráneo y de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2007), (véase Figura 6).

La actividad electromiográfica de los músculos de la nuca y de los movimientos oculares rápidos, se registró mediante electrodos de gancho de níquel-cromo. Todos los electrodos se unieron a un conector de seis polos y se fijó al cráneo con acrílico dental (Crano Powder, Plastics One Inc.). Las ratas recibieron 0.1 ml del antibiótico Tylan (Tilosina) por cinco días después de la cirugía y como analgésico clonixinato de lisina (Dorixina TM) por 3 días; ambos por vía s.c.

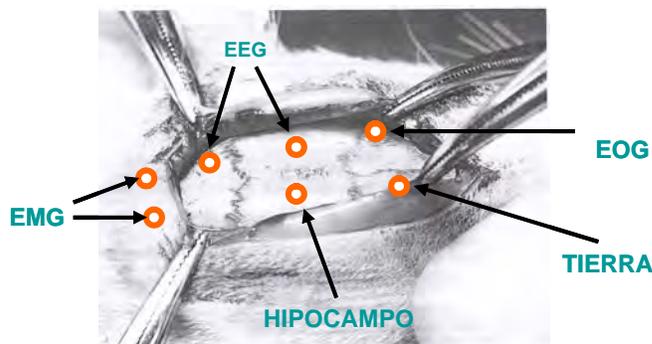


Figura 6. Localización del implante de los electrodos de registro. Con círculos naranjas se señalan las zonas en donde se realizaron los trépanos para el implante de los electrodos, a excepción de los electrodos de gancho para el registro electromiográfico, los cuales fueron colocados en los músculos de la nuca (Modificada de Cooley y Vanderwolf, 1990).

Registro electroencefalográfico.

Después de una semana de recuperación postoperatoria las ratas fueron habituadas a las condiciones de experimentación (Figura 7). El día de la sesión se colocó a la rata en las condiciones experimentales media hora antes de iniciar la sesión. A las 8:00 ± 5 min se dio comienzo el registro polisomnográfico que duró 24 horas continuas.

El registro de la actividad eléctrica se realizó en un polígrafo de 30 canales (Stellate Systems, Canadá) acoplado a una tarjeta de conversión analógico/digital Harmonie, la cual a su vez se acopla al módulo LUNA (Stellate Systems, Canadá) para análisis de las fases del sueño-vigilia y al módulo SENSA (Stellate Systems, Canadá), un programa para el análisis de espigas, de coherencia y potencia de las señales obtenidas.

Cabe mencionar que la caja de registro se colocó dentro de una jaula de Faraday, para evitar interferencias eléctricas; además la conducta fue videograbada durante las 24 horas de registro con una cámara Sony modelo CCD-TRV68 con opción de grabado nocturno, para poder establecer una correlación entre la actividad eléctrica y el despliegue conductual (Figura 8).



Figura 7. Condiciones experimentales de registro electroencefalográfico. Se muestra una rata *taiep* en las condiciones experimentales. Note que el conector en el cráneo de la rata se une mediante los cables a la caja de canales para el registro, esto a su vez se encuentra dentro de una jaula de Faraday para aislar el sistema de interferencias eléctricas.

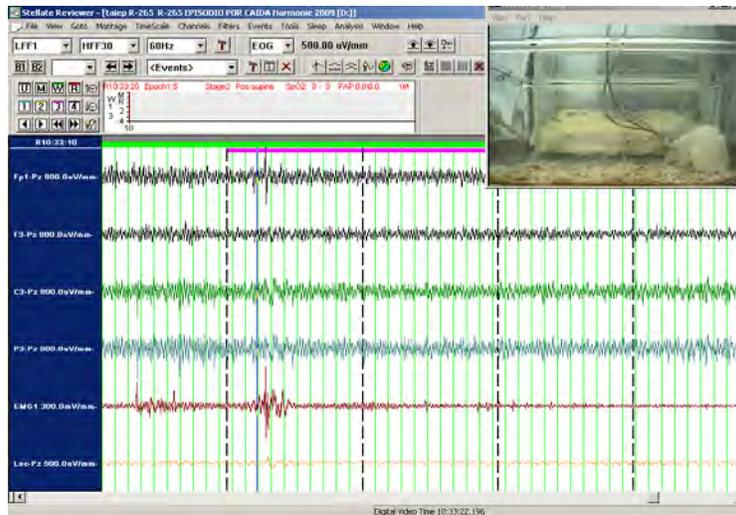


Figura 8. Registro polisomnográfico de una rata *taiep*. Note que el registro se encuentra acoplado a la videofilmación de la conducta. En la señal en negro se muestra los registros de la corteza frontal y parietal, en verde el registro de la región CA1 del hipocampo, en guinda el electromiograma y en naranja el electrooculograma.

Histología

Para corroborar la correcta localización del electrodo bipolar para el registro del hipocampo. Se realizaron cortes histológicos coronales de 40 μm en la región periférica del electrodo. Los animales fueron anestesiados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico 70 mg/kg (Anestosal, Pfizer). Posteriormente los animales fueron perfundidos mediante la administración intracardiaca de 200 ml de SSI (solución salina isotónica), seguida de 250 ml de paraformaldehído al 4%. El cerebro se almacenó en solución de paraformaldehído al 4% con sacarosa al 10%. Los cortes fueron realizados en un criostato (Reichert HistoStat) a -20°C . Los cortes se tiñeron mediante la técnica de Nissl y el trayecto del electrodo se ubicó con ayuda del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), como se esquematiza en la Figura 9.

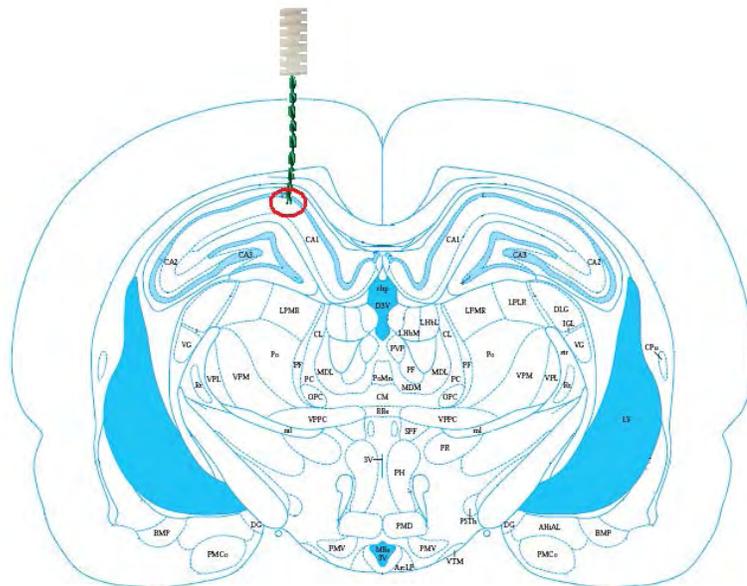


Figura 9. Corte coronal del cerebro de ratona. Con un círculo rojo se marca la región de interés de registro en el hipocampo. (Modificado de Paxinos y Watson, 2007).

Análisis.

La frecuencia de muestreo empleada para el registro electroencefalográfico fue de 200 Hz, amplificada y filtrada. Para la señal del electroencefalograma los filtros se fijaron en 1 y 30 Hz, para el electromiograma se emplearon filtros de 30 a 100 Hz y para el electrooculograma el filtro fue de 1 a 10 Hz. Adicionalmente, se utilizó un filtro Notch para eliminar la banda de 60 Hz de la alimentación de corriente (Maloney y cols., 1997). El registro obtenido se dividió en épocas de 10 segundos para el análisis de las fases de sueño-vigilia.

Las bandas de frecuencia que se consideraron para el análisis del registro polisomnográfico fueron seleccionadas en base a los parámetros propuestos para estudios electroencefalográficos en ratas (Maloney y cols., 1997), como se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3. Bandas de frecuencia

Bandas	Frecuencia (Hz)
Delta	0.5 – 4
Theta 1	4 – 8
Theta 2	8 – 12
Beta 1	12 – 19
Beta 2	19 – 30
Gamma	30 - 58

En este trabajo se emplearon estas bandas para el análisis del ciclo sueño-vigilia de tal forma que los estados de vigilia fueron discriminados con la actividad

cortical del electroencefalograma y del EMG de los músculos de la nuca. Durante este estado la actividad cortical desincronizada y de baja amplitud en una frecuencia de 12 a 30 Hz, (ritmo beta) era acompañada por actividad muscular. El sueño de ondas lentas, era diferenciado por actividad lenta de alto voltaje de 0.5 a 4 Hz (ritmo delta), la aparición de husos de sueño, complejos K y disminución de la actividad muscular, permaneciendo el animal inmóvil con los ojos cerrados. Por último se consideraba sueño MOR cuando se presentaba ritmo theta en el hipocampo (4-8 Hz), desincronización cortical y atonía muscular.

Mediante la transformada rápida de Fourier (TRF), se analizó el registro polisomnográfico y se obtuvieron los correspondientes espectros de potencia que nos permitieron identificar los componentes de frecuencia y la potencia relativa de las señales a evaluar.

Drogas empleadas.

Las drogas que se administraron fueron agonistas y ant agonistas del sistema colinérgico para los receptores muscarínicos. Las drogas empleadas se muestran en la Tabla 4, las cuales fueron obtenidas los de los laboratorios Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo., U.S.A). Todas las soluciones se prepararon en fresco 15 minutos antes del experimento.

Administración de drogas colinérgicas.

El estudio inicial de l sistema colinérgico se realizó mediante inyecciones sistémicas de las drogas a evaluar siguiendo un esquema de dosis crónicas acumulativas con un intervalo de 48 horas entre cada administración, por vía intraperitoneal en un volumen constante de 1 mL/kg de peso.

Tabla 4. Agonistas y antagonistas colinérgicos muscarínicos empleados en el presente estudio

	Muscarínicos	Subtipo de receptor
AGONISTAS	Arecolina	inespecífico
	McN-343-A	M ₁
	Oxotremorina M	inespecífico
	Pilocarpina	M ₁ , M ₂
ANTAGONISTAS	Atropina sulfato	inespecífico
	4-DAMP	M ₃
	Triexifenidil	inespecífico
	Pirenzepina	M ₁

Procedimiento para evaluar los EIs con drogas colinérgicas.

Media hora antes de la observación las ratas fueron llevadas al cuarto de experimentación con el propósito de adaptarlas a las condiciones del laboratorio. El experimento se inició a las 8:00 ± 10 min. A.M., que coincide con la arofase de susceptibilidad a mostrar episodios de inmovilidad, como se mostró en el experimento 1, y las sesiones experimentales tuvieron una duración de 90 min.

Una vez que se administra la solución vehículo (control) o la droga se colocan en cajas individuales de observación (cajas de acrílico de 21x24.5x35 cm), con una cama de madera triturada y esterilizada (Aspen Chip).

Se tomó como tiempo cero inmediatamente después de la administración a la última rata.

Análisis estadístico.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza no paramétrico de medidas repetidas de una vía, posteriormente fueron analizados por una prueba *post-hoc* de Dunn que distingue diferencias significativas entre el grupo control y los diferentes grupos experimentales (Snedecor y Cochran, 1989). El nivel de significancia estadística se fijó con una $P < 0.05$ con el programa para análisis estadístico Sigma-Stat, versión 3.5.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

EPISODIOS DE INMOVILIDAD

En esta primera parte se describirán las características de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación y espontáneos, estos últimos evaluados mediante registros electroencefalográficos con duración de 24 hrs. De los registros realizados se describen dos grupos de resultados; el primero describiendo los episodios de inmovilidad y los resultados del experimento 2 describiendo el ciclo sueño-vigilia en la rata *taiep*.

EPISODIOS DE INMOVILIDAD INDUCIDOS POR MANIPULACIÓN

Durante un ciclo de 24 horas, los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación presentan dos picos de máxima inducibilidad. El primero presentándose a la mitad de la fase oscura, de las 23:00 a las 01:00 h; y el segundo al inicio de la fase de luz, de las 7:00 a las 9:00 hrs. Siendo estas fases estadísticamente diferentes del resto de los periodos (ANOVA Kruskal-Wallis $H=43.6$; $n=7$; $P<0.002$, *post hoc* Tukey $P<0.05$, véase Figura 10).

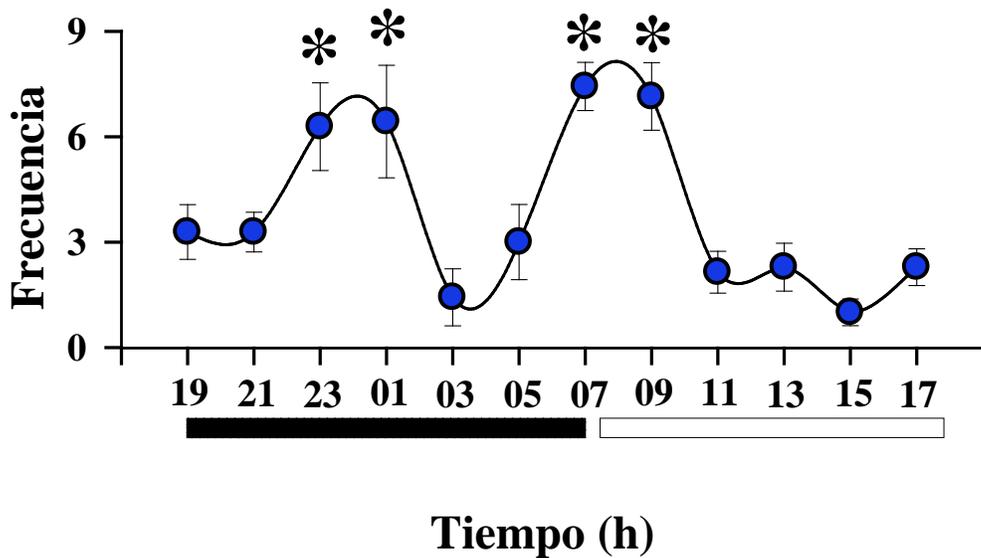


Figura 10. Frecuencia de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación a lo largo del ciclo circadiano en la rata *taiep*. Se muestra la frecuencia de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación, la cual presenta un incremento máximo de la frecuencia de las 23:00 a las 01:00 h y otro de la 7:00 a la 9:00 h. (ANOVA, $H= 43.6$, $n=7$, $P < 0.0002$ + Dunn (* $P < 0.05$)).

Ontogenia de los episodios de inmovilidad

Estudiamos la frecuencia de los episodios de inmovilidad, cada quince días, durante los primeros 18 meses de vida de ratas *taiep* macho y hembra, por lo que podemos decir que los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación comienzan a los 6.5 meses de edad y alcanzan una frecuencia máxima de los 8.5 a los 9.5 meses. Posteriormente, la frecuencia de los EIs disminuye gradualmente hasta los 12 meses y permanecen en una frecuencia baja de 1 episodio/h hasta los 18 meses (Cortés y cols., 2005; Figura 11).

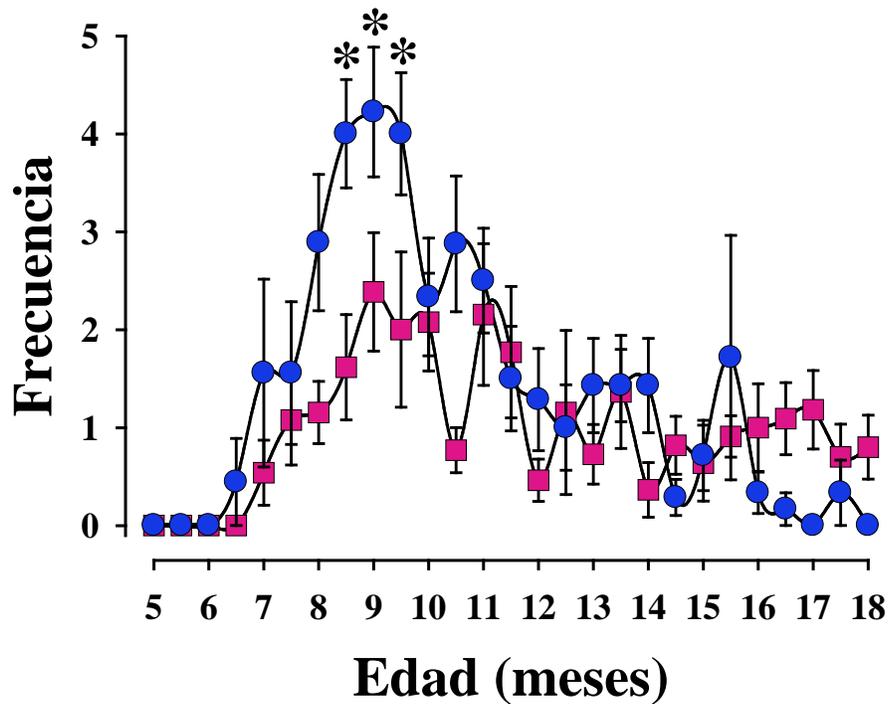


Figura 11. Ontogenia de los EIs inducidos por manipulación en ratas macho y hembras *taiep*. Note en círculos azules que las inmovilidades en las ratas machos comienzan a los 6.5 meses de edad e incrementan hasta alcanzar un máximo entre los 8.5 y 9.5 meses. Las hembras (cuadros rosas) muestran un patrón similar pero con frecuencias promedio menores a las de los machos (círculos azules). ANOVA mostró diferencias significativas respecto al género ($F_{(1,67)} = 30.22$, $*P < 0.001$) y la edad ($F_{(12,25)} = 11.29$, $*P < 0.001$).

Dimorfismo sexual de los episodios de inmovilidad

La frecuencia de los episodios de inmovilidad es sexualmente dimórfica. En el caso de las ratas hembras la frecuencia de los episodios de inmovilidad fue menor con respecto a los machos. En la Figura 12 A se muestra esta diferencia a los 7 y 8 meses de edad. Las ratas macho *taiep* presentan una frecuencia significativamente mayor a los 7 (6.5 ± 0.4 EIs); (U de Mann-Whitney; $U=195.5$, $P < 0.0001$) y a los 8 meses (4.0 ± 0.6 EIs); (U de Mann-Whitney, $U= 106.5$, $P < 0.001$) de edad respecto de las hembras

que tan solo tuvieron 3.2 ± 0.3 y 2.0 ± 0.8 episodios de inmovilidad, a los 7 y 8 meses respectivamente (Figura 12 A).

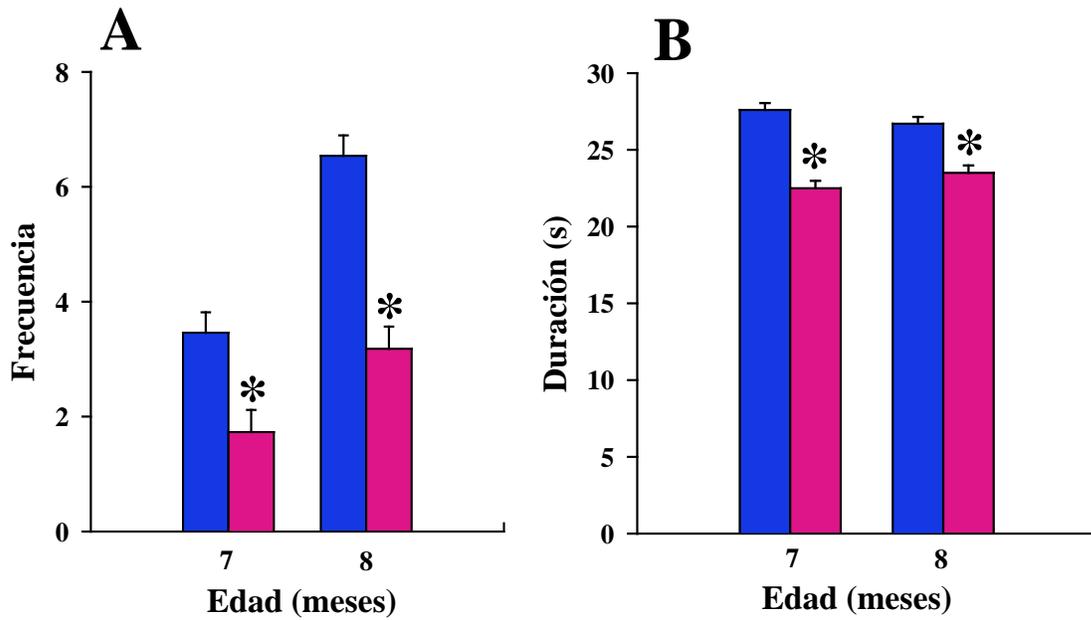


Figura 12. Dimorfismo sexual en la frecuencia de los EIs inducidos por manipulación. En **A** se muestra la frecuencia promedio \pm e.e.m. de los EIs inducidos por manipulación de ratas macho *taiep* (azul) y de ratas hembras *taiep* (rosa) a los 7 y 8 meses de edad, siendo estas diferencias significativas a los 7 meses (U de Mann-Whitney; $U=195.5$, $*P < 0.0001$) y a los 8 meses (U de Mann-Whitney, $U= 106.5$, $*P < 0.001$). En **B** se muestra la duración promedio de los EIs inducidos por manipulación siendo estadísticamente diferentes entre los sexos, a los 7 ($t=5.12$, $df=10$, $*P<0.001$) y a los 8 meses ($t=14.25$ $df=22$, $*P<0.001$).

Las duraciones promedio de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación (Figura 12 B) también son estadísticamente diferentes entre los sexos, con duraciones promedio de 27.6 ± 0.8 seg en los machos, respecto de las hembras con duraciones de 22.5 ± 0.1 seg a la edad de 7 meses ($t=5.12$, $df=10$, $P<0.001$). De

manera similar sucede a los 8 meses de edad, durando los EIs en los machos 26.7 ± 0.1 seg y en las hembras tan solo 23.5 ± 0.2 seg ($t=14.25$ $df=22$, $P<0.001$).

Método de inducción de los episodios de inmovilidad

Los episodios de inmovilidad pueden ser inducidos mediante la sujeción de la cola (T, del inglés tail) o del tórax (B, del inglés body). Analizamos la interdependencia de la manipulación en cuatro secuencias que son: TT, BB, TB o BT en 13 ratas macho *taiep* de 8 meses de edad.

Los resultados obtenidos muestran una fuerte dependencia de la secuencia de manipulación para la inducción de los episodios de inmovilidad, siendo la secuencia T-T más efectiva (ANOVA, $H=26.4$, $gl=3$, $P<0.001$ + post hoc Dunn $P<0.05$, ver Figura 13).

EPISODIOS DE INMOVILIDAD ESPONTÁNEOS

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir del registro polisomnográfico de 6 ratas macho *taiep* de 8 meses de edad durante un ciclo de 24 hrs. Los registros polisomnográficos mostraron, que los episodios de inmovilidad se presentan de manera espontánea, con características que se describen a continuación.

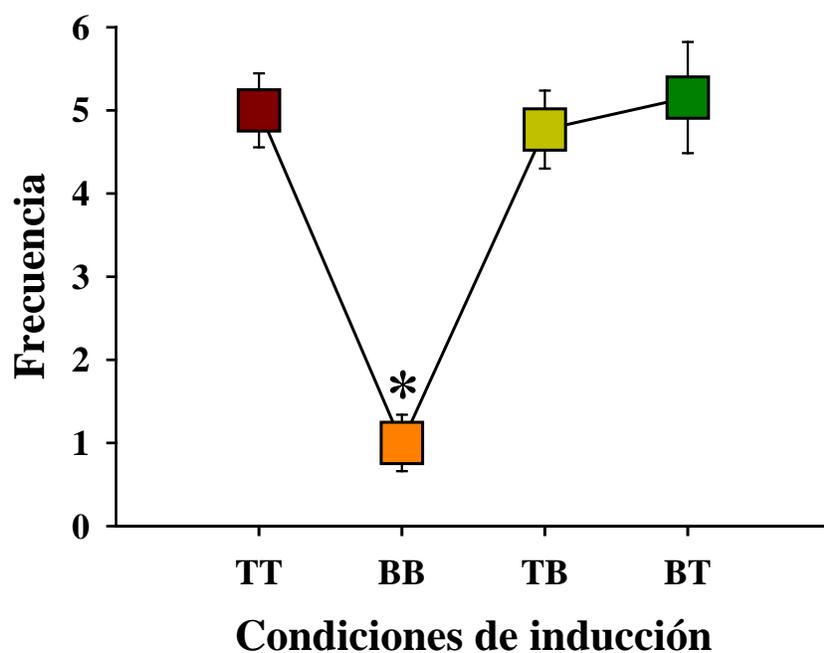


Figura 13. Condiciones de inducción de los episodios de inmovilidad. Se muestran los cuatro métodos de inducción de los EIs, siendo más efectiva la secuencia TT (ANOVA, $H= 26.4$, $gl=3$, $P<0.001$ + *post hoc* Dunn $P <0.05$, con respecto al BB, sin encontrar diferencias significativas con las otras secuencias).

Distribución en veinticuatro horas.

Los episodios de inmovilidad espontáneos se presentaron con una frecuencia promedio de 32.3 ± 4.4 episodios durante las 24 horas de registro.

Cabe la pena destacar que esta distribución es homogénea en el ciclo completo de luz-oscuridad, ya que la frecuencia promedio (episodios/24 h) es de alrededor de 3 EIs cada 2 h (Figura 14).

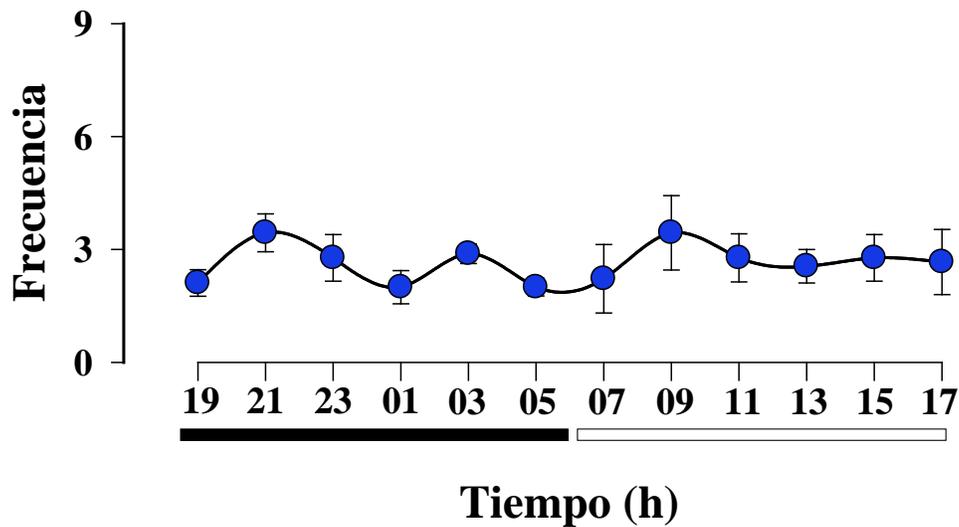


Figura 14. Frecuencia de los episodios de inmovilidad espontáneos en la rata taiep. Se muestra la frecuencia de los EIs espontáneos. Como se puede observar, la frecuencia de los EI durante las 24 h es similar, presentándose en promedio 3 EI cada 2 horas.

La distribución de la frecuencia de los episodios de inmovilidad espontáneos durante la fase de luz, es similar a la obtenida durante la fase de oscuridad, ya que se obtuvo una frecuencia promedio de 17 ± 1.5 durante la fase de luz y de 15.3 ± 4.8 durante la fase de oscuridad, no encontrándose diferencias significativas entre ambos ($t=0.33$, $P=0.74$, ver Figura 15).

Los resultados obtenidos en las duraciones promedio de los episodios de inmovilidad espontáneos, muestran que la duración de los episodios de inmovilidad espontáneos en ratas macho taiep, fue de 47.6 ± 0.1 seg (promedio \pm e.e.m., $n=183$). Si se considera la fase de luz-oscuridad, las duraciones son mayores durante la fase de luz con un promedio de 54.3 ± 1.3 seg.; que durante la fase de oscuridad con una

duración promedio de 40.3 ± 1.0 seg., siendo esta diferencia estadísticamente diferente ($t= 57$, $P=0.002$, ver Figura 16).

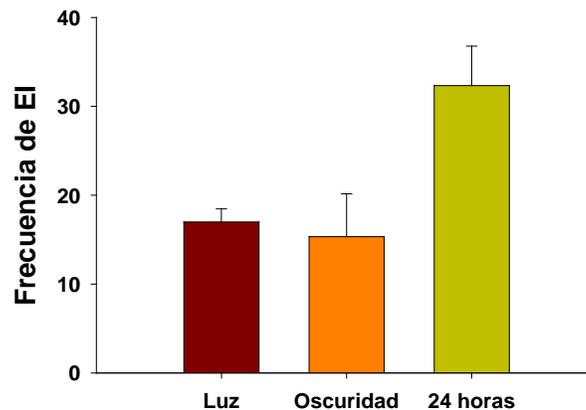


Figura 15. Distribución de la frecuencia de los episodios de inmovilidad espontáneos. Se muestra la frecuencia de los EIs en la fase de luz y en la fase oscura y durante las 24 h. Note que se distribuyen de manera semejante en ambas fases, sin que exista una diferencia estadísticamente significativa, ($T=45$, $P=0.4$; $n=6$).

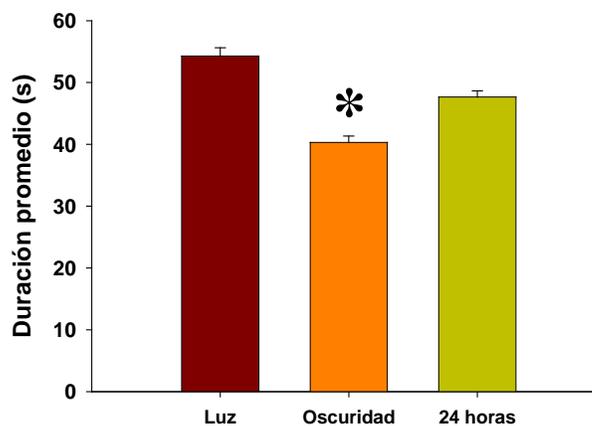


Figura 16. Duración promedio de los EIs espontáneos. Los episodios de inmovilidad tienen una duración mayor durante la fase de luz (54.3 ± 1.3 seg; media \pm e.e.m). Mientras que en la fase de oscuridad la duración promedio disminuye de manera significativa con una duración promedio de 40.30 ± 1.03 seg; media \pm e.e.m. (U de Mann-Whitney, $T=57$, $P=0.002$).

Actividad electroencefalográfica durante el episodio de inmovilidad.

Durante los registros de los EIs espontáneos se ha podido mostrar, que tanto la actividad conductual asociada a éstos, así como la actividad polisomnográfica es similar al sueño MOR. Esto es, durante los EIs espontáneos (Figura 17 A) la corteza cerebral descarga con ritmo beta, se presenta ritmo theta en el hipocampo, y desde el punto de vista del tono muscular, este se incrementa al inicio del episodio de inmovilidad, para después abolirse. Cabe la pena mencionar que las características electroencefalográficas de los episodios de inmovilidad espontáneos son similares a los inducidos por manipulación (Figura 17 B).

Duración de los episodios de inmovilidad espontáneos e inducidos por manipulación

Respecto a la duración promedio de los episodios de inmovilidad puede mencionarse que existen diferencias significativas respecto a este parámetro. Observando que los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación (n=321) presentan una duración promedio de 24.22 ± 0.34 s, menor a la de los episodios de inmovilidad espontáneos (n=177; de 53.07 ± 1.94 s); (Prueba t, $t=19.01$, $df=496$, $p<0.00001$; ANOVA-Kruskal-Wallis, *post hoc* U de Mann-Whitney; Figura 18).

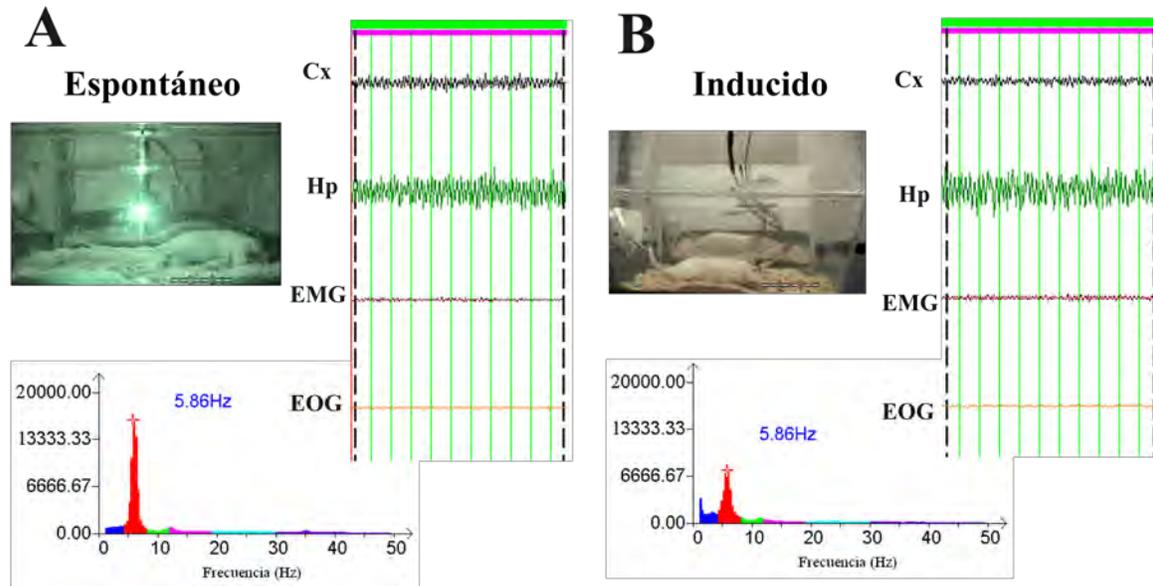


Figura 17. Episodio de inmovilidad en una rata *taiep*. La imagen muestra una rata *taiep* de 8 meses de edad durante un episodio de inmovilidad espontáneo **A** e inducido **B**. En ambos casos el registro en la corteza cerebral muestra una desincronización cortical y ritmo theta en el hipocampo. Adicionalmente, el espectro de potencia muestra que durante un EI se presenta una frecuencia dentro de la banda theta. Corteza=Cx, hipocampo=Hp; electromiograma=EMG; electrooculograma=EOG.

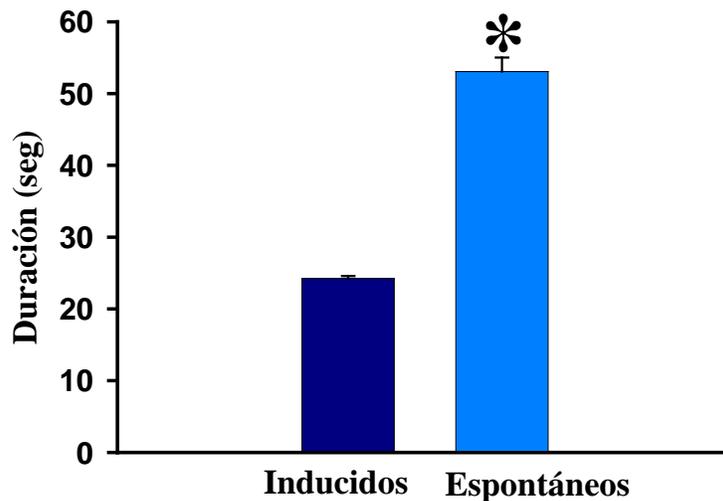


Figura 18. Duración de los episodios de inmovilidad inducidos y espontáneos. La figura muestra claramente que la duración promedio de los episodios de inmovilidad espontáneos es mayor respecto de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Prueba t , $t = 19.01$, $df = 496$, $p < 0.00001$; A NOVA-Kruskal-Wallis, *post hoc* U de Mann-Whitney).

DISCUSIÓN EXPERIMENTO 1

El objetivo de esta serie experimental, fue la de determinar las influencias medio-ambientales que modifican los episodios de inmovilidad (EIs).

Los episodios de inmovilidad presentan dos picos de susceptibilidad, uno a la mitad de la fase oscura y otro al inicio de la fase de luz (ver Figura 10). Es probable que el incremento de susceptibilidad se deba a una acumulación de las influencias homeostáticas que controlan el sueño con movimientos oculares rápidos (Franken y cols., 1991).

En el caso de la ontogenia de los EIs es claro que existe una ventana temporal en la cual, la susceptibilidad a mostrar EIs es máxima de los 8 a los 10 meses de edad. En edades avanzadas, se produce un decremento en la frecuencia de los EIs inducidos por manipulación, y esto se puede deber a la desmielinización progresiva del S y al incremento de la reacción glial con la edad del mutante al terando los circuitos neuronales involucrados, la génesis y mantenimiento de los EIs (León-Chavez y cols., 2001, 2003). En el perro narcoléptico, Siegel y cols., (1999) han descrito que se presenta degeneración axonal en la amígdala, septum, la banda diagonal de Broca y en otras áreas adyacentes del cerebro anterior, siendo estas alteraciones progresivas a lo largo del desarrollo.

En un estudio ontogénico en cachorros Doberman narcolépticos, Riehl y cols., (1998), mostraron que la edad promedio de inicio de la cataplejía es a las 7 semanas.

La severidad de la cataplejía se incrementa con la edad y alcanza una meseta entre las 16 y las 24 semanas de vida (Riehl y cols., 1998). Esta progresión se correlaciona con la gliosis que se presenta en el SNC de los perros narcolépticos (Siegel y cols., 1999). En el caso de la rata *taiep*, los Els progresan con la edad (véase Figura 11) y también la gliosis del SNC (Krsulovic y cols., 1999; León-Chavez y cols., 2001). La desmielinización es también progresiva en la rata *taiep* (Lunn y cols., 1997). Dado que los Els muestran un patrón EEG de sueño MOR (véase Figura 27), es válido proponer que las ratas *taiep* pueden tener una desorganización del ciclo sueño-vigilia y en particular del sueño MOR.

En el caso de los perros narcolépticos, se ha podido mostrar una desorganización de su actividad locomotora en el ciclo luz-oscuridad, debido a que no presentan un claro patrón de reposo-actividad durante las 24 horas (Nishino y cols., 1997) y es también el caso en humanos narcolépticos (Middelkoop y cols., 1995).

En el caso de los perros narcolépticos se ha mostrado que las hembras son más susceptibles que los machos tanto en la cataplejía inducida por exposición de la comida (FECT, de sus siglas en inglés), como por el juego (PECT, de sus siglas en inglés), y también en el tiempo acumulado que los perros pasan en cataplejía durante estas pruebas (Riehl y cols., 1998). En nuestro caso son los machos los que muestran una mayor frecuencia de los Els y la duración media es mayor que en las hembras (Figura 12).

En el caso de los perros narcolépticos se sabe que se transmite con una herencia autosómica recesiva con un carácter de penetrancia completa denominada inicialmente *canarc-1* y que posteriormente se descubrió se debía a una mutación puntual en el receptor para orexinas tipo 2 (Chemelli y cols., 1999). En el caso de la rata *taiep* la herencia también es autosómica recesiva (Holmgren y cols., 1989, Duncan y cols., 1992), pero ligada al cromosoma 9 en una zona cercana a la expresión de las proteínas asociadas a los microtúbulos (Li y cols., 2003); lo que posiblemente explique los problemas de transporte de las proteínas recién sintetizadas en los oligodendrocitos (Song y cols., 1999; O'Connor y cols., 2000), como fue propuesto originalmente por Couve y cols., en 1997.

Por último es importante destacar que los EIs en la rata *taiep* semejan a la inmovilidad activa, esto es, aquella que se induce por un estímulo (Klemm, 1990). En nuestro caso, el estímulo inductor fue manipularlas de la cola o del tórax; siendo el estímulo inductor más efectivo el sostenerlas de la cola. Estos estados inmóviles semejan entonces al resto conductual que ha sido descrito en varios contextos naturales y experimentales, que varían desde el “congelamiento conductual”, la catalepsia inducida por agentes dopaminérgicos u opiáceos, hasta la “muerte fingida” en donde en todos estos procesos la inmovilidad es activa (Klemm, 1990).

En todas estas inmovilidades se produce una respuesta similar en el EEG, esto es una actividad rápida de bajo voltaje en la corteza cerebral asociada a una actividad theta en el hipocampo; adicionalmente se presenta una disminución en los reflejos polisinápticos espinales (Klemm, 1990). También se ha podido determinar que el

arresto conductual está mediado a través de la formación reticular del puente, en particular, del núcleo pontis oralis; así como de la formación reticular medial del bulbo raquídeo (núcleos magnocelular, gigantocelular y paramedial). Estos núcleos parecen jugar un papel fundamental en la inmovilidad, en el arresto conductual, en la catalepsia y en la cataplejía, por lo que es altamente probable que también sea el caso en los Elms inducidos o espontáneos de la rata *taiep*. Cabe la pena destacar que en las ratas *taiep*, la desmielinización es más severa en el tallo cerebral y en el cerebelo (Lunn y cols., 1997; Duncan y cols., 1992), que son regiones importantes en donde se inicia la inmovilidad y los mecanismos neuronales que la sustentan.

El reflejo de inmovilidad dorsal, es típico de las crías de muchos mamíferos altriciales. Este se produce cuando la madre, presiona la piel del cuello y levanta a la cría para trasladarla a otro sitio o al nido, cuando la madre lo requiere; el reflejo consiste en inmovilidad y una dorsiflexión y pronación de las extremidades y con esto facilita su traslado (Klemm, 1971a). Estudios detallados de Klemm, han podido mostrar, que el reflejo de inmovilidad por presión de la piel en la porción dorsal del cuello, se debe a un reflejo que se integra a nivel del tallo cerebral (Klemm, 1976).

Este reflejo desaparece en crías de mayor edad, cuando dejan de depender de la madre e inician el destete, en ratas esto sucede a alrededor de los 21 días de edad (Klemm, 1971a).

Sin embargo, la presión con una pinza en la piel del cuello puede gatillar esta conducta, y este reflejo se puede potenciar cuando a los animales se les venda la

cabeza, y se disminuye después de realizar una l abirintectomía, sugiriendo una participación importante del sistema del equilibrio (Teitelbaum y cols., 1983).

En el caso de la rata *taiep* al sostenerla de la cola, se produce una intensa estimulación vestibular y es este el mecanismo desencadenante, con lo que tiene cierta homología con la respuesta de inmovilidad inducida por presión de la piel del cuello y seguramente se integran a nivel del tallo cerebral. Sin embargo, este reflejo de inmovilidad por pinzamiento, disminuye con la edad (Junquera y cols., 1989), y en el caso de las inmovilidades en la rata *taiep*, estas se incrementan hasta alcanzar un pico entre los 7 y los 9 meses de edad (Cortés y cols., 2005).

Cabe la pena destacar que el reflejo de inmovilidad se potencia al estimular el vestíbulo mediante movimientos circulares sobre una superficie plana (De la Cruz, y Junquera, 1989), y en este reflejo es potenciado por la administración sistémica de haloperidol, un antagonista dopaminérgico, y por la morfina, un agonista opioide, siendo el efecto máximo cuando se administran ambas drogas (De la Cruz y cols., 1990). Estos hallazgos sugieren que la interacción de opioides y neurolepticos son capaces de modular la postura y el movimiento, y además que los cambios en la actividad refleja están presentes en la edad adulta, como reflejos vestigiales que pueden ser expresados en condiciones extremas como son la depredación o por cambios de los niveles cerebrales en los neuromoduladores (Teitelbaum y cols., 1983). Es importante destacar que algunos tipos de esquizofrenia tienen como característica la inmovilidad en ciertas posiciones (catatonia) y que en animales de experimentación la catalepsia inducida por haloperidol es un modelo adecuado.

En el caso de la rata *taiep* es el resultado de la desmielinización y pérdida de la actividad sincrona en distintas vías neurales, como se ha mostrado en rebanadas de hipocampo (Bonansco y cols., 2007). En experimentos en curso, se está analizando la posible expresión temprana de los episodios de inmovilidad al manipular las vías dopaminérgicas.

CAPÍTULO 2

CICLO SUEÑO-VIGILIA EN LA RATA *TAIEP*

Los resultados obtenidos muestran que la rata *taiep* presenta porcentajes de las etapas de sueño dentro de los parámetros descritos para las ratas Sprague-Dawley (Borbély y Neuhaus, 1979).

Hay que destacar que la distribución de las etapas del ciclo sueño-vigilia considerando el tiempo total de sueño, es diferente en las ratas *taiep* respecto al grupo control, ya que el mayor porcentaje de SMOR en las ratas *taiep* se presenta en la fase de oscuridad con un 10.3 %, y no durante la fase de luz con tan solo 4.7 % (Tabla 5).

Si se considera que en la etapa de sueño de ondas lentas, se obtuvieron porcentajes similares en ambos grupos en las 24 horas registradas, ya que las ratas *taiep* presentan un 85 % y las ratas Sprague-Dawley un porcentaje casi idéntico con un 85.5%. Adicionalmente, la rata *taiep* presenta episodios de inmovilidad con características que se describirán posteriormente; sin embargo, puede considerarse que en la fase de luz, los Els se presentan en un 2.1% y en un 1.4 % en la fase de oscuridad. Sumando el porcentaje de la etapa del sueño MOR en las ratas *taiep*, más el porcentaje de los Els puede observarse que es muy similar el porcentaje de SMOR que presenta la rata *taiep* (15 %); respecto al grupo control (14.5 %) (Véase Tabla 5).

Tabla 5. Distribución del ciclo sueño-vigilia

	SOL (%)			MOR (%)			EIs (%)			MOR+EIs (%)		
	Luz	Osc.	24 h	luz	Osc.	24 h	Luz	Osc.	24 h	Luz	Osc.	24 h
Taiep	54.3	30.8	85.0	2.6	8.9	11.5	2.1	1.4	3.5	4.7	10.3	15
Sprague-Dawley	52.4	33.1	85.5	5.6	9.0	14.5						

MOR, SOL Y EIs se expresan porcentualmente respecto al tiempo total de sueño. *Taiep* (n=6); Sprague-Dawley (n=7). Note que la sumatoria de sueño MOR y los EIs en la rata *taiep*, es muy similar al sueño MOR de la rata Sprague-Dawley.

Si se considera el tiempo total de registro se puede observar en la Figura 19 la distribución de los estados del ciclo sueño-vigilia en cada una de los grupos de ratas. Los resultados mostraron ser similares tanto para la vigilia con 43.5% en el grupo control y, 48.7% en las ratas *taiep*; como para el SOL con 48.3% y, 43.6% respectivamente; no siendo así para el SMOR; en donde se nota una disminución en la fase de luz con 3.1% para el grupo control y de tan solo 1.3% para las ratas *taiep* (Véase Figura 19).

Adicionalmente, las alteraciones del sMOR se observaron principalmente en la fase de luz, ya que la frecuencia promedio de episodios de sMOR fue de tan solo 30.7 ± 4.3 para las ratas *taiep* y de 88.7 ± 21 para las Sprague-Dawley. Respecto a la fase de oscuridad podemos observar que las transiciones a la vigilia y al SOL fueron más frecuentes en la rata *taiep*, sin embargo, el tiempo total en cada estado es similar para ambas sublíneas.

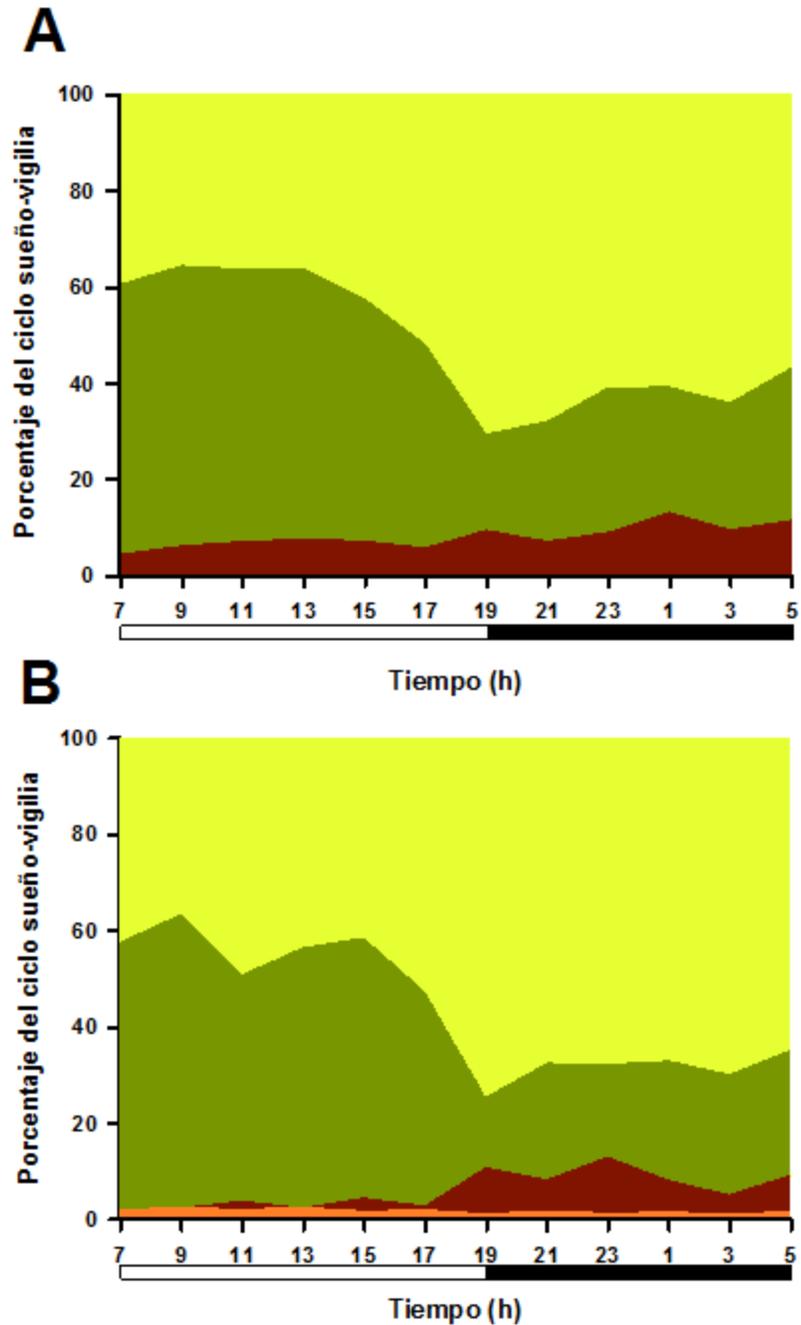


Figura 19. Distribución de las etapas de sueño durante un ciclo de 24 h en ratas Sprague-Dawley y taiep. Porcentaje del tiempo de registro total de cada etapa del ciclo sueño-vigilia durante las 24 h. En **A** para el caso de las ratas Sprague-Dawley y en **B** para las ratas taiep. En **B** note como el SOL (en color verde), se presenta en mayor porcentaje durante la fase de luz y disminuye en la fase de oscuridad, (**A**). En cambio se ve un incremento del sueño MOR (color café), solamente durante la fase de oscuridad, cuando se esperaría estuviera más activa la rata. En **B** el color naranja representa el porcentaje de episodios de inmovilidad los cuales se distribuyeron de manera similar durante las 24 h.

Si observamos el hipnograma de una rata Sprague-Dawley (Figura 20) y lo comparamos con el de una rata *taiep* (Figura 21), se puede identificar que la rata Sprague-Dawley presenta durante la fase de oscuridad periodos de vigilia de mayor duración que durante la fase de luz. Por el contrario, en el hipnograma de una rata *taiep* se observa que el sueño se encuentra fraccionado y no hay una clara distribución de la actividad hacia la fase oscura, que es el periodo de actividad de los roedores.

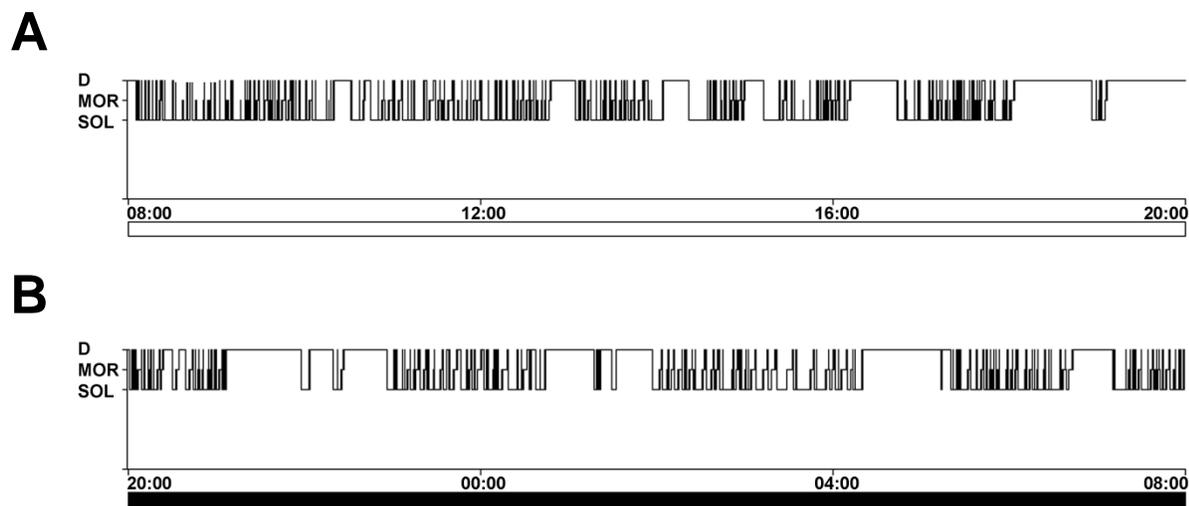


Figura 20. Hipnograma típico de una rata Sprague-Dawley. En la figura se muestra el polisomnograma de 24 h de duración de una rata macho Sprague-Dawley de 8 meses de edad. En **A)** durante la fase de luz y en **B)** durante la fase de oscuridad. Note como durante la fase de oscuridad se presentan periodos de vigilia de mayor duración que durante la fase de luz. Los estados del ciclo sueño-vigilia se marcan con letras a la izquierda de cada hipnograma: D, despierta; MOR, sueño de movimientos oculares rápidos; SOL, sueño de ondas lentas.

Con base en los registros polisomnográficos se obtuvo que la latencia al primer sueño MOR en las ratas *taiep* que fue de 28.37 ± 6.04 min, (n=6), mientras que en las ratas Sprague-Dawley fue significativamente mayor hasta 110.42 ± 43.26 min. (Tabla 6).

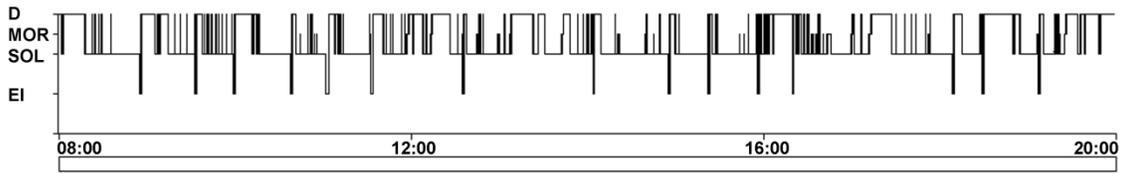
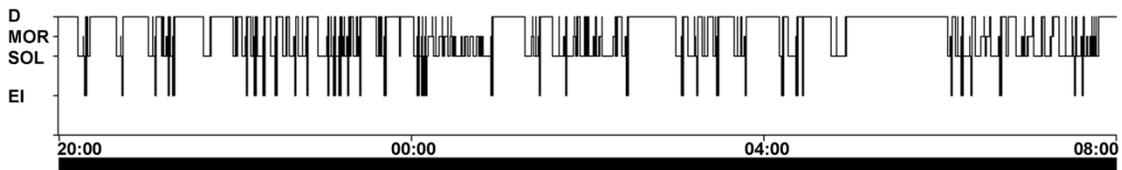
A**B**

Figura 21. Hipnograma típico de una rata *taiep*. En la figura se muestra la representación gráfica del registro polisomnográfico de 24h en una rata macho *taiep* de 8 meses de edad. En **A)** durante la fase de luz y en **B)** durante la fase de oscuridad. Note como el sueño se encuentra fraccionado y no hay una clara distribución de la actividad hacia el día subjetivo del animal, lo que se da entre las 20:00 a las 8:00 de la mañana, que es cuando se enciende la luz. Los estados del ciclo sueño-vigilia se marcan con letras a la izquierda de cada hipnograma: D, despierta; MOR, sueño de movimientos oculares rápidos; SOL, sueño de ondas lentas; EI, episodios de inmovilidad espontáneos.

Tabla 6. Latencia al Primer episodio de SMOR

	Latencia al 1er.SMOR
Sprague-Dawley	110.42
<i>Taiep</i>	28.37

Vigilia

Analizando el estado de vigilia en ambas sublíneas se puede observar que la frecuencia promedio de los episodios de vigilia es menor en la rata *taiep* que en la Sprague-Dawley, encontrando diferencias significativas en la fase de luz respecto de la oscuridad entre ambas sublíneas (ANOVA de dos factores, sublínea y ciclo; $F=6.31$, $gl=2$, $P<0.01$). Cuando se compara la frecuencia de episodios de vigilia de las ratas

Sprague-Dawley y *taiep* durante las 24 horas, puede observarse claramente que presentan una frecuencia significativamente mayor las ratas Sprague-Dawley (Prueba $t=2.5$; $P<0.05$). Respecto a las duraciones medias por evento, los resultados obtenidos muestran que la rata *taiep* presenta un incremento en la duración media de cada episodio de vigilia (ANOVA de dos factores, sublinea y ciclo, $F=33.06$, $gl=2$, $P<0.0001$) y cuando se separan estas duraciones respecto de la fase de luz u oscuridad, se siguen manteniendo estas diferencias estadísticamente significativas (Prueba $t=3.56$, $P<0.001$ para la fase de luz y $t=3.06$, $P<0.01$; en la fase oscura; Figura 22).

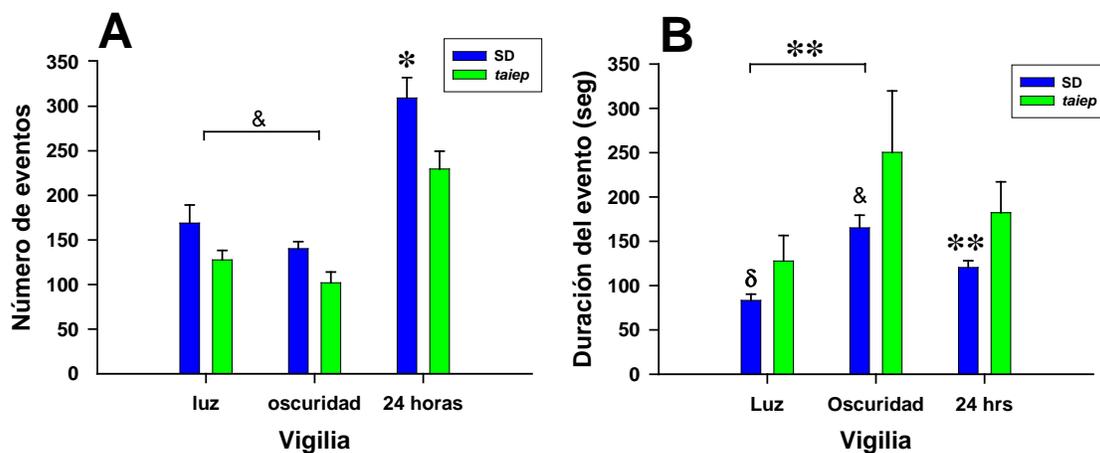


Figura 22. Frecuencia y duración promedio de la vigilia en ratas *taiep* y Sprague-Dawley. En **A**, observe como en todos los grupos la rata *taiep* presenta una disminución en la frecuencia promedio de los episodios de vigilia. Esta disminución es significativa en todos los grupos (ANOVA de dos factores, sublinea y ciclo) $F=6.31$, $gl=2$, $P=0.01$). En **B** observe como en todos los grupos la rata presenta un incremento en la duración promedio del periodo de vigilia (ANOVA de dos factores, sublinea y ciclo; $F=33.06$, $gl=2$, $P<0.0001$). Los datos son la media \pm EE de 6 ratas por grupo. * $P<0.05$; $\&$ $P<0.01$; δ $P<0.001$; ** $P<0.0001$.

Sueño de ondas lentas

La frecuencia de los episodios de sueño de ondas lentas disminuyó significativamente considerando la sublínea y el ciclo (ANOVA $F=9.02$, $gl=2$, $P<0.001$). Adicionalmente, si separamos la frecuencia de episodios considerando solo el ciclo se obtuvo una disminución significativa solo en la fase de luz (Prueba $t=2.48$; $P<0.05$) y en el tiempo total de registro (Prueba $t=3.04$; $P<0.05$). Respecto a las duraciones promedio de los episodios de sueño de ondas lentas; se obtuvo un incremento de este parámetro cuando se consideró el ciclo y la sublínea (ANOVA $F=46.4$; $gl=2$, $P<0.0001$) así como cuando solo se consideró la fase, tanto de luz (Prueba $t=7.02$, $P<0.0001$); como la fase de oscuridad (Prueba $t=2.87$, $P<0.01$) y las 24 horas (Prueba $t=7.26$, $P<0.0001$; Figura 23).

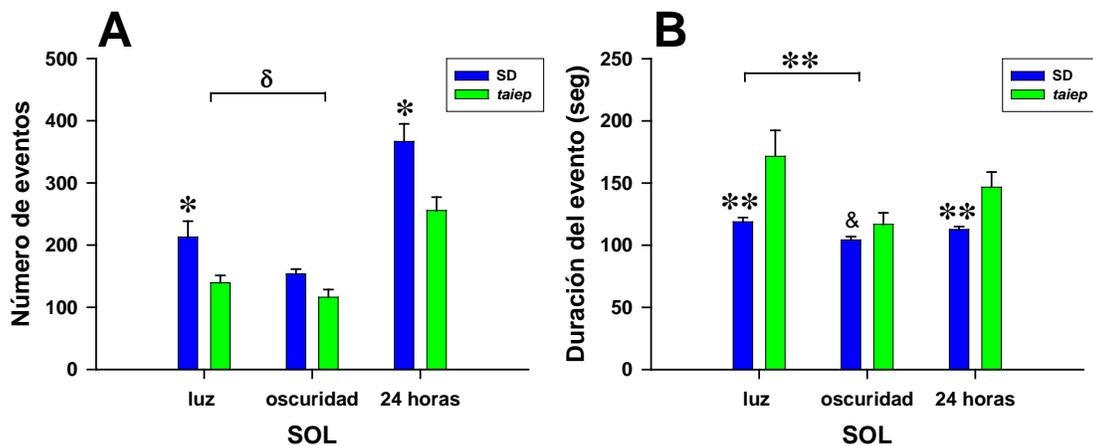


Figura 23. Frecuencia y duración promedio del sueño de ondas lentas en ratas taiep y Sprague-Dawley. En A, observe como en todos los grupos la rata taiep presenta una disminución en la frecuencia promedio de los episodios de sueño de ondas lentas, siendo significativo cuando se considera, sublínea y ciclo; $F=9.02$, $gl=2$, $P<0.001$). En B observe como en todos los grupos la rata presenta un incremento en la duración promedio (ANOVA de dos factores, sublínea y ciclo; $F=46.4$, $gl=2$, $P<0.0001$). Los datos son la media \pm EE de 6 ratas por grupo. * $P<0.05$; & $P<0.01$; δ $P<0.001$; ** $P<0.0001$.

Sueño con movimientos oculares rápidos

Analizando el estado de sueño con movimientos oculares rápidos en ambas sublíneas se puede observar que la frecuencia promedio de los episodios es menor en la rata *taiep* que en la Sprague-Dawley, con una tendencia a ser significativo considerando ambos factores (ANOVA de dos factores, sublínea y ciclo; $F=2.92$, $gl=2$, $P=0.07$) pero si cuando se compara la frecuencia de episodios de sueño con movimientos oculares rápidos de las ratas Sprague-Dawley y *taiep* durante las 24 horas (Prueba $t=2.65$; $P<0.05$), y durante la fase de luz (Prueba $t=2.5$; $P<0.05$). Respecto a las duraciones medias del evento, los resultados obtenidos muestran la rata *taiep* presenta un incremento en la duración media de cada episodio de sueño con movimientos oculares rápidos (ANOVA de dos factores, sublínea y ciclo, $F=87.27$, $gl=2$, $P<0.0001$) y cuando se considera el periodo de luz u oscuridad solo hay diferencias estadísticamente significativas durante la fase de luz (Prueba $t=2.26$, $P<0.05$) y durante las 24 horas (Prueba $t=3.53$, $P<0.001$; Figura 24).

Distribución de los episodios de inmovilidad espontáneos.

El registro polisomnográfico por 24 h permitió determinar la distribución de los EI espontáneos en cada fase durante el ciclo sueño-vigilia. Considerando la fase de luz los episodios de inmovilidad espontáneos son más frecuentes durante la vigilia y el sueño de ondas lentas ($F_{(2)}=5.136$; $P<0.02$; + Newman-Keuls * $P<0.05$) como se muestra en la Figura 25).

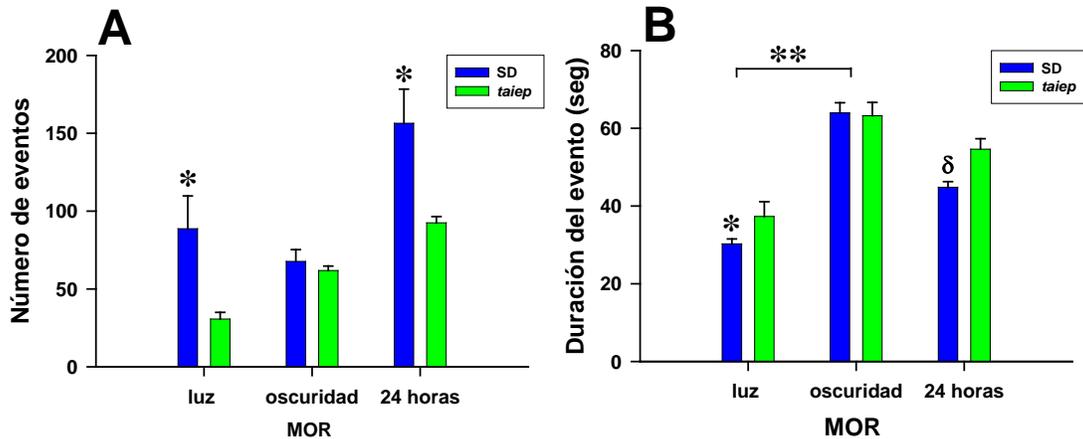


Figura 24. Frecuencia y duración promedio del sueño de movimientos oculares rápidos en ratas taiep y Sprague-Dawley. En **A**, observe como en todos los grupos la rata taiep presenta una disminución en la frecuencia promedio. Esta disminución es significativa solo en la fase de luz (Prueba $t=2.5$; $P<0.05$) y en el tiempo total de registro (Prueba $t=2.65$; $P<0.05$). En **B**, observe como las duraciones promedio solo incrementan en la fase de luz (Prueba $t=2.26$, $P<0.05$) y en el tiempo total de registro (Prueba $t=3.53$, $P<0.001$), así como al considerar la sublínea y el ciclo (ANOVA de dos factores, $F=87.27$, $gl=2$, $P<0.0001$). Los datos son la media \pm E.E. de 6 ratas por grupo. * $P<0.05$; δ $P<0.001$; ** $P<0.0001$.

Por el contrario, durante la fase de oscuridad los episodios de inmovilidad espontáneos se presentan con mayor frecuencia durante el sueño con movimientos oculares rápidos siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($F_{(2)}=5.136$; * $P=0.02$; + Newman-Keuls * $P<0.05$; Figura 26).

Características electroencefalográficas de los episodios de inmovilidad

Los registros electroencefalográficos permitieron analizar las características de los episodios de inmovilidad espontáneos. Durante un episodio de inmovilidad espontáneo se presenta una desincronización cortical en la banda del ritmo beta, ritmo

theta (4-8 Hz) en el hi pocampo y at onía m uscular, c on c aracterísticas que s e describirán posteriormente (Figura 27).

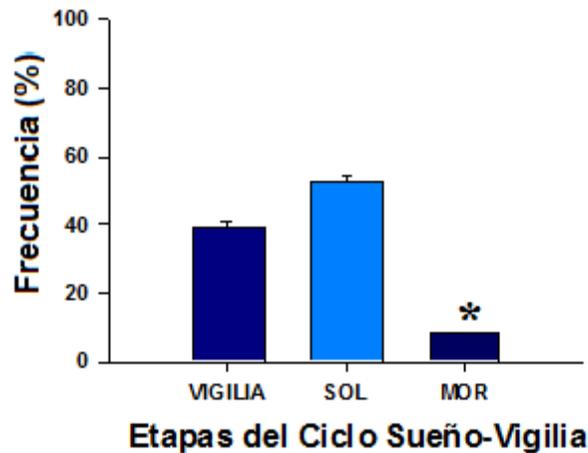


Figura 25. Distribución de los EI espontáneos durante la fase de luz. Los EI espontáneos se presentaron con una frecuencia del 39.7 % durante la vigilia y un 60.3 % durante el sueño total, siendo en el SOL cuando los EI se presentaron en un 52.4 %, y en el sueño MOR tan solo se presentan 7.9 %, lo que es una disminución significativa ($n = 6$ ratas *taiep*), ($F_{(2)}=5.136$; $*P=0.02$; + Newman-Keuls $*P<0.05$).

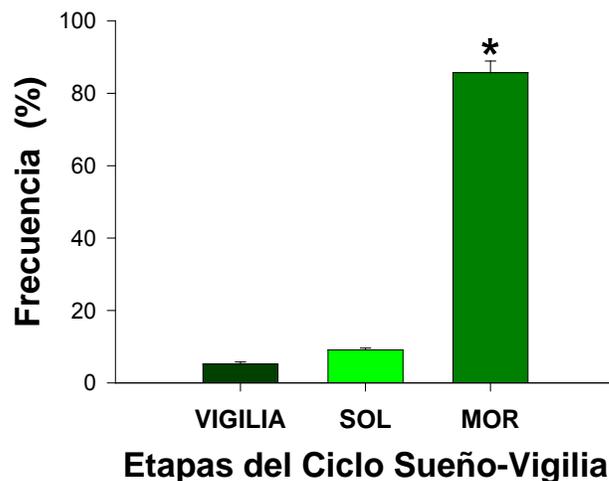


Figura 26. Distribución de los EI espontáneos durante la fase de oscuridad. En esta figura se presenta como los EI ocurrieron durante la vigilia en un 9.1 % y en una mayoría de 90.9 % durante la fase de sueño total. De esta fase, los EI incrementaron significativamente en un 85.7 % durante el sueño MOR y tan solo un 5.2 % en el SOL siendo la frecuencia estadísticamente diferente de las otras dos fases ($n = 6$ ratas *taiep*), ($F_{(2)}=13.5$, $*P<0.001$; + Newman-Keuls $*P<0.05$).

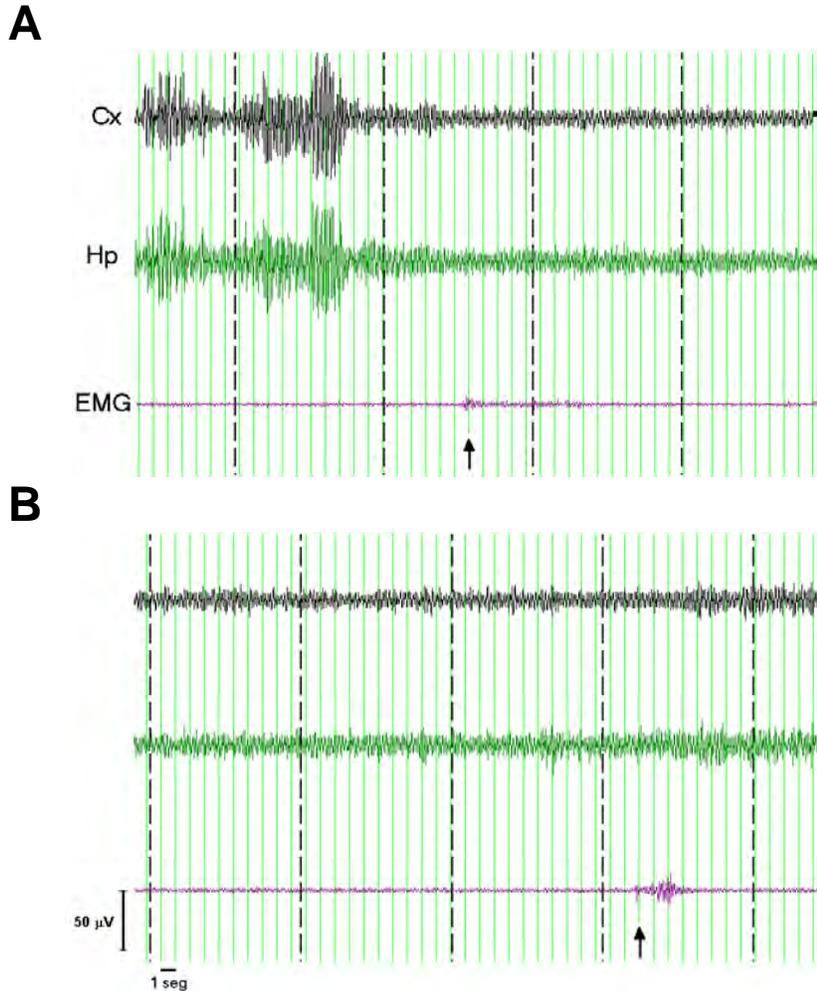


Figura 27. Registro polisomnográfico de un EI espontáneo. La flecha en el panel A muestra el inicio del EI, observe que antes del inicio del EI el animal se encuentra en sueño de ondas lentas. Durante el EI la corteza cerebral se encuentra desincronizada y se presenta ritmo theta en hipocampo, lo que sustenta la presencia de sueño MOR. La flecha en el panel B indica la finalización del EI espontáneo después de éste, la rata continua con actividad de vigilia.

El sistema de registro, también permitió caracterizar electroencefalográficamente los episodios de inmovilidad mediante otro mecanismo para producir inmovilidades que es a través de la manipulación por la cola a nivel de las vértebras cervicales, la estimulación vestibular producto de la suspensión gatilla la inmovilidad. Electroencefalográficamente los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación muestran exactamente el mismo patrón con actividad beta cortical y theta en el

hipocampo, como se ilustra en la Figura 28; note que se produce una atonía en la musculatura de la nuca y un par de sacudidas fásicas.

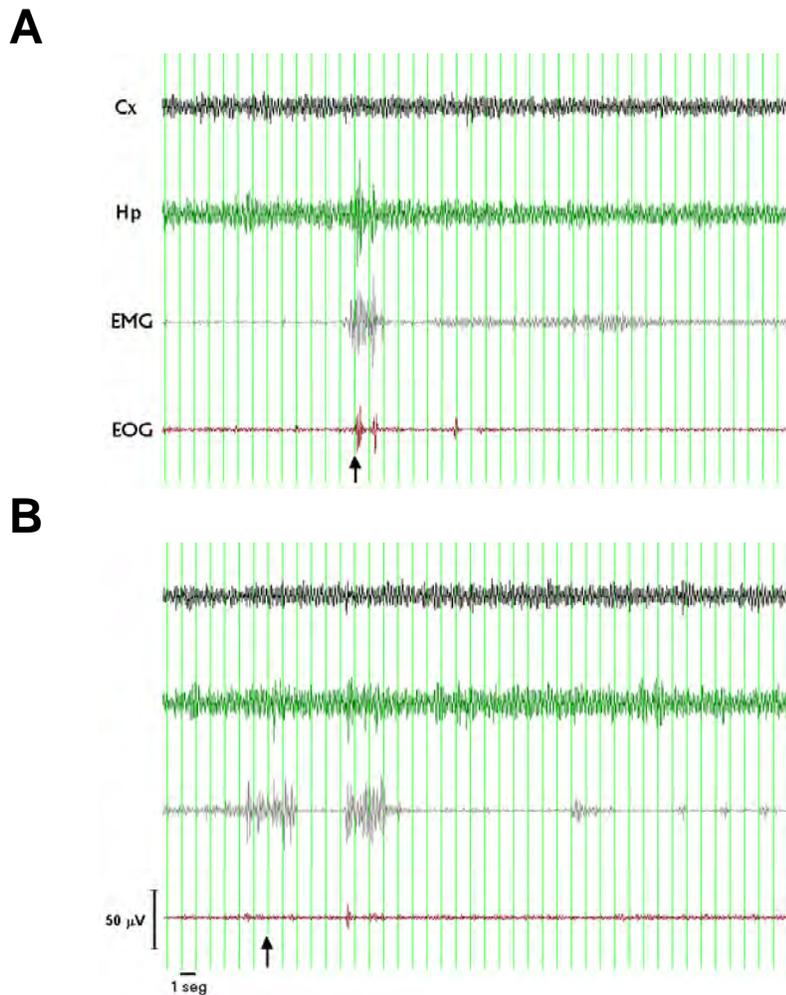


Figura 28. Registro polisomnográfico de un EI inducido por manipulación. La flecha en el panel **A** muestra el inicio del EI, observe que unos segundos antes de la inducción el animal se encuentra un registro que corresponde a la vigilia. Durante el tiempo que dura el EI la corteza cerebral se encuentra desincronizada y se presenta ritmo theta en el hipocampo, lo que sugiere la emergencia de sueño MOR durante la vigilia. La flecha en el panel **B** indica el fin del EI inducido por manipulación. Note que después del EI el animal se activa y muestra actividad de vigilia nuevamente.

Como se pudo observar las características electroencefalográficas de un episodio de inmovilidad son similares a las descritas para el sueño con movimientos oculares rápidos como se muestra en la Figura 29. Note que el ritmo theta es hipersíncrono en el hipocampo, se presenta una clara actividad beta en la corteza y un atonía muscular sostenida.

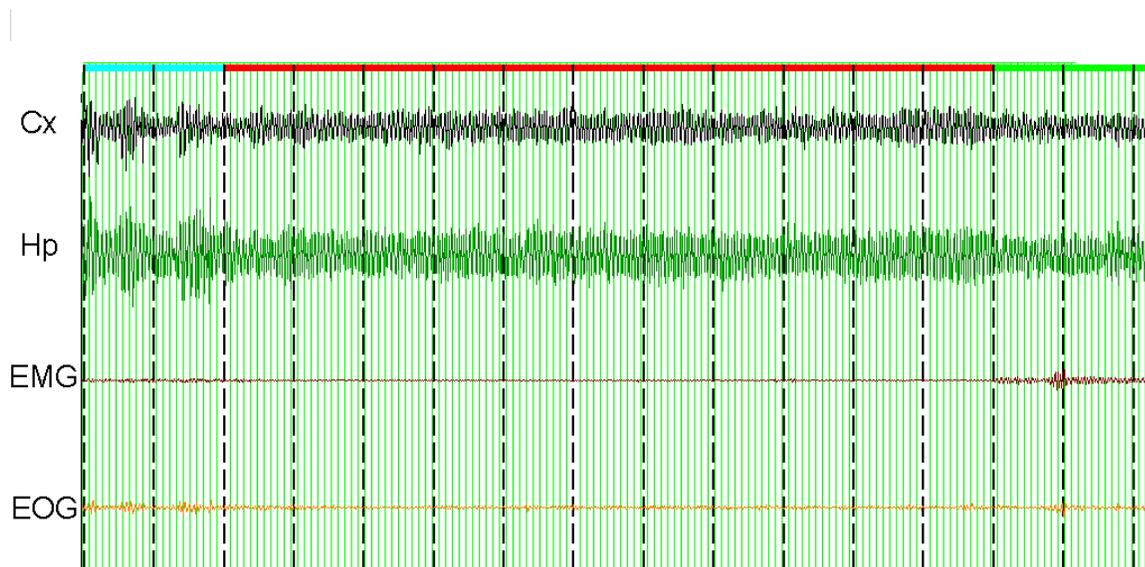


Figura 29. Registro polisomnográfico de un episodio de sueño MOR en la rata taiiep. Durante el tiempo que dura el sueño MOR, señalado con una barra roja, la corteza cerebral se encuentra desincronizada y se presenta ritmo theta en el hipocampo. Note como el animal se encontraba en sueño de ondas lentas (marcado con barra azul) y al terminar el episodio de sueño MOR se presenta la vigilia. Registro de corteza cerebral, Cx, de hipocampo, Hp, electromiograma, EMG, electro-oculograma, EOG.

Los diferentes componentes de la señal observada durante un EI espontáneo puede observarse en la Figura 30 en la zona sombreada. Note como durante el EI las ondas delta se presentan en menor porcentaje, seguidas por las ondas beta y gamma, mientras que las ondas theta son el componente que predomina.

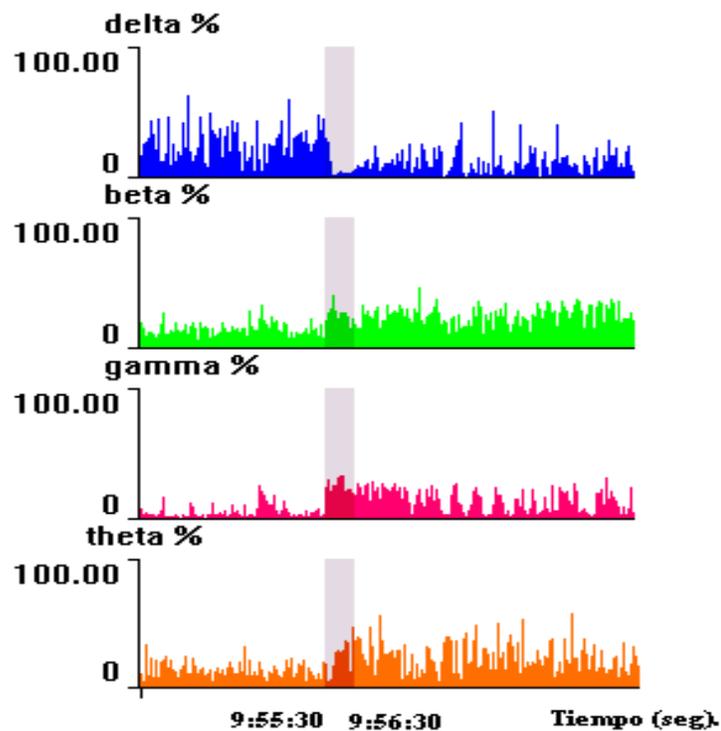


Figura 30. Componentes de la actividad eléctrica durante un EI espontáneo en la rata taiep. Note como durante el EI espontáneo, mostrado por la parte sombreada, se presenta un predominio de las ondas theta del hipocampo, asociado a una disminución de las ondas delta, lo cual es característico del sueño MOR.

Para determinar qué tipo de frecuencias se encuentran predominantemente durante un EI espontáneo, se realizó la transformada rápida de Fourier (TRF) para obtener el espectro de potencia del registro del hipocampo, el cual se muestra en la Figura 31. Se encontró la presencia de un componente principal (se indica con la flecha), el cual tuvo una frecuencia de 5.86 Hz.

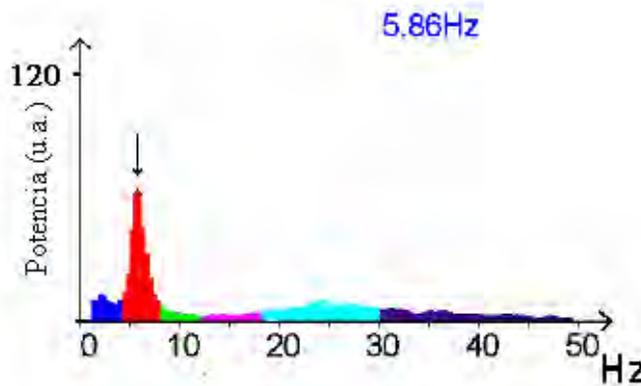


Figura 31. Espectro de potencia durante un EI espontáneo en la rata taiep. En la figura puede observarse la presencia de un componente principal, indicado con la flecha, el cual se presenta con una frecuencia de 5.86 Hz.

Los diferentes componentes de la señal observada durante un episodio de sueño con movimientos oculares rápidos se puede observar en la Figura 32 en la zona sombreada. Note como durante el s MOR las ondas del tase presentan en menor porcentaje, seguidas por las ondas beta y gamma, mientras que las ondas theta son el componente que predomina.

Al aplicar la TRF al registro del hipocampo durante un episodio de sueño MOR en la rata taiep (Figura 33), se encontró, un componente principal con una frecuencia de 6.64 Hz y una amplitud de 1,158 μ V, el cual se indica con una flecha.

Características electromiográficas de los episodios de inmovilidad.

En registros de 2-4 horas, se registró la actividad electromiográfica de los músculos de la nuca de 6 ratas macho taiep durante los episodios de inmovilidad. De acuerdo a la actividad muscular que se presentó durante el episodio de inmovilidad se clasificaron en tres grupos denominados: tipo I, II y III.

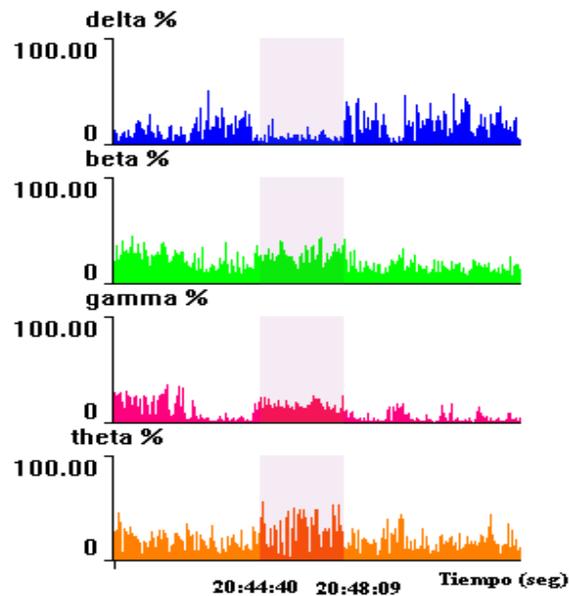


Figura 32. Componentes de la actividad eléctrica durante el sueño MOR en la rata taiep. Note como durante el sueño MOR, ejemplificado por la zona sombreada, se presentan predominantemente las ondas theta, mientras que las ondas delta se disminuyen durante el sueño MOR. Esta actividad resulta característica del sueño MOR en la rata.

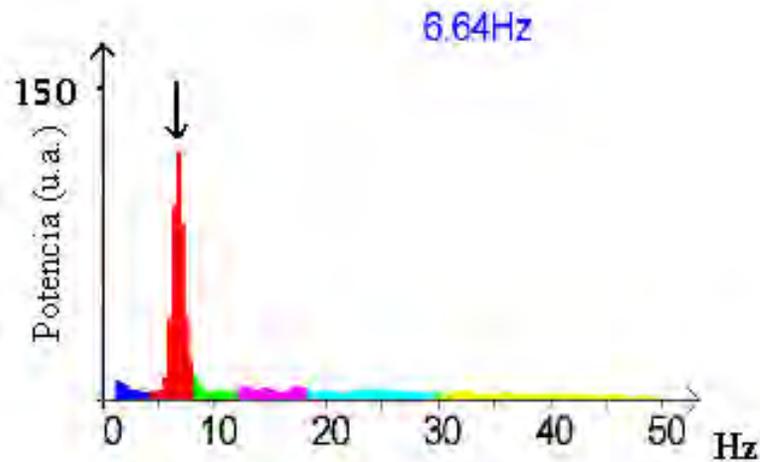


Figura 33. Espectro de potencia durante el sueño MOR en la rata taiep. Con la TRF, se aprecia que la señal se encuentra conformada por un componente principal, indicado con la flecha, el cual se presenta con una frecuencia de 6.64 Hz.

Tipo I: Al inicio del episodio de inmovilidad se presenta un incremento máximo de la actividad muscular, el cual disminuye progresivamente. El aumento en la actividad muscular es menor del 50% del tiempo total del episodio. Cabe la pena mencionar que este podría considerarse como el episodio de inmovilidad clásico de la rata *taiep* (Figura 34 A).

Tipo II: En este tipo de episodios, la actividad muscular alcanza su máximo incremento a la mitad y al final del episodio (Figura 34 B).

Tipo III: EL incremento del tono muscular se presenta de manera intermitente durante todo el episodio (Figura 34 C).

Respecto a la frecuencia de este tipo de actividad muscular durante los episodios de inmovilidad en registros de 24 horas se presenta con mayor frecuencia el tipo I en un 59.8%, del tipo II en un 17.72 % y del tipo III en un 22.42% (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación de los Els de acuerdo a la actividad electromiográfica y el ciclo luz- oscuridad

Actividad electromiográfica	Fase de luz (%)	Fase de oscuridad (%)
Tipo I	35.9	23.9
Tipo II	7.3	10.42
Tipo III	9.4	13.02
Sub-Total	52.6	47.34
Total	100%	

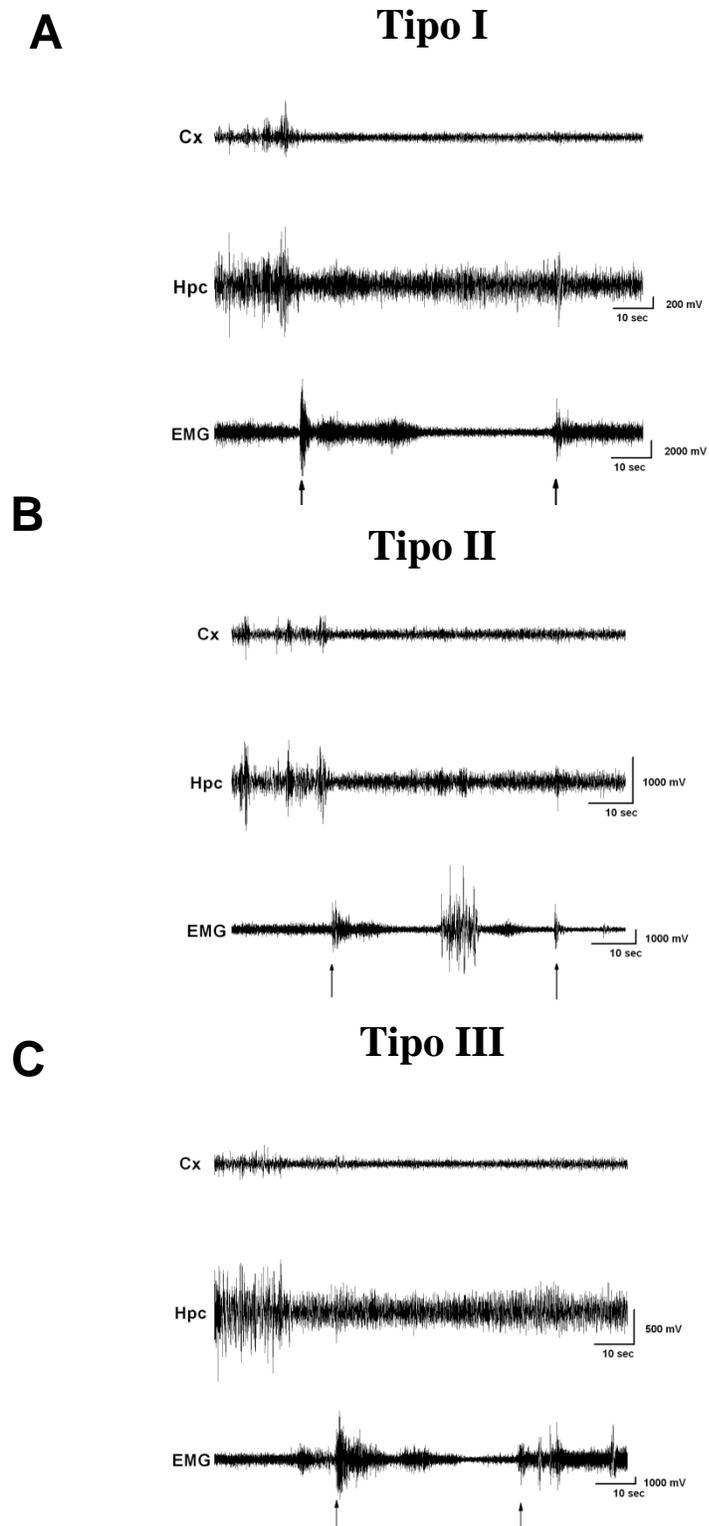


Figura 34. Electromiogramas durante un episodio de inmovilidad. Se muestra el registro electroencefalográfico de un episodio de inmovilidad, con flechas se señala el inicio y fin del episodio. Se presenta ritmo beta en la corteza, ritmo theta en el hipocampo y la actividad muscular característica de cada grupo. Cx, corteza parietal; Hp, hipocampo; EMG, electromiograma.

Si se consideran las fases de luz y oscuridad, observamos que el tipo I se presenta con mayor frecuencia en la fase de luz en un 35.9% y el tipo II y III en la fase oscura con un 10.42 y 13.02 % respectivamente (Figura 35).

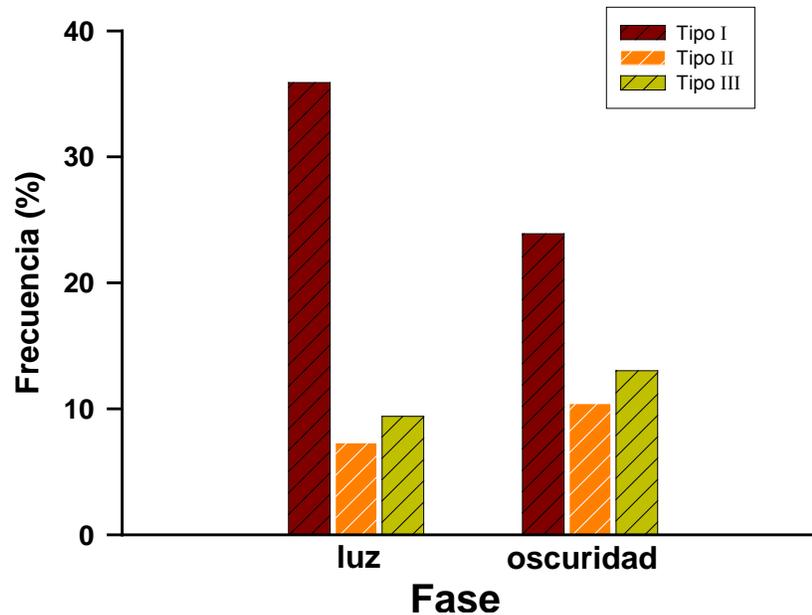


Figura 35. Frecuencia de la distribución de la actividad electromiográfica. Se observa que considerando las fases de luz y oscuridad, predomina el tipo I en las dos fases, en segundo lugar el tipo III con 13.02% en la fase de oscuridad y 9.4% en la fase de luz.

Respecto a las duraciones promedio de este tipo de descargas electromiográficas durante los episodios de inmovilidad, los resultados muestran que no existen diferencias significativas (U Mann-Whitney $t = 15.0$; $P = 0.081$), considerando la fase en la que se presentan (Tabla 8).

Tabla 8. Duración de la actividad electromiográfica durante un EI

Actividad electromiográfica	Fase de luz (s)	Fase de oscuridad (s)	Fase de luz (%)	Fase de oscuridad (%)
Tipo I	54.92 ± 1.76	41.95 ± 1.60	20.11	15.32
Tipo II	50.0 ± 2.57	43.00 ± 1.63	18.28	15.72
Tipo III	48.88 ± 2.78	34.8 ± 1.64	17.84	12.72
Sub-Total	153.8	119.7	56.23	43.76
Total			100%	

DISCUSIÓN EXPERIMENTO 2

Los resultados muestran por una parte, que las ratas Sprague-Dawley y *taiep* adultas de 8 meses, tienen un porcentaje similar de su sueño con movimientos oculares rápidos en la fase de oscuridad. Mientras que, durante la fase de luz la rata Sprague-Dawley pasa más tiempo en sueño MOR. Si se considera que los episodios de inmovilidad presentan características electroencefalográficas de sueño MOR, por lo tanto consideramos que el sueño MOR total está formado tanto por el sueño MOR propiamente dicho, como por los episodios de inmovilidad, entonces vemos que el porcentaje de sueño MOR durante la fase de luz es semejante entre ambas sublíneas. De hecho, en este trabajo, se muestra que durante los episodios de inmovilidad la actividad cortical se encuentra en ritmo beta y se asocia a ritmo theta en el hipocampo, con cambios variables del tono muscular con tres patrones característicos, lo que esencialmente es un patrón similar a lo que se presenta durante el sueño MOR.

En el caso de los perros narcolépticos el criterio electroencefalográfico para el sueño MOR, es que exista una actividad de la corteza cerebral con actividad de alta frecuencia y baja amplitud, asociada a ritmo theta hipersincronizado en el hipocampo o en el cuerpo geniculado, lo que se ha asociado a una disminución parcial o completa en el electromiograma (Kaitin y cols., 1986 a, b; Kushida y cols., 1985; Mitler y cols., 1977).

Cabe la pena destacar que en los perros narcolépticos se presentan también episodios de atonía sin ritmo theta y estos se caracterizan por periodos cortos de inmovilidad con “quiescencia” parcial o completa del electromiograma, pero sin

actividad theta en los registros de campo en el hipocampo o del cuerpo geniculado (Mittler y Dement, 1977). Estos hallazgos son similares a los tres tipos de inmovilidades que muestra la rata *taiep*, en donde se muestra un ritmo theta síncrono durante los episodios de inmovilidad asociado a actividad de alta frecuencia y baja amplitud, que es un patrón similar a lo que se encuentra en el sueño MOR, pero con un patrón de cambio de la actividad muscular.

De hecho en los perros narcolépticos, tanto Döbermann-pinscher como Beagle, los episodios de catalepsia se han dividido en tres fases: el primero se caracteriza por un estado parecido al del sueño MOR, sin cambios en la postura o en el tono muscular en el electromiograma y que dura de 30 a 100 segundos, y constituye el inicio de una actividad con theta hipersíncrono en el hipocampo y una disminución de las frecuencias mixtas en las áreas fronto-parietales y occipitales de la corteza. En la fase 2 de la catalepsia, la correlación con el sueño MOR se hace máxima ($r=0.98$); conductualmente se caracteriza por movimientos oculares esporádicos con párpados y/o membranas nictitantes abiertas o cerradas y sacudidas musculares con duraciones de 15 a 90 segundos; y la tercera fase, es la transición hacia un periodo de vigilia o de sueño no MOR con una actividad cortical de amplitud y frecuencia variables con una duración de 5 a 15 segundos sin cambios en el tono muscular, movimientos de seguimiento de los ojos o sacudidas musculares (Kushida y cols., 1985). En el caso de las ratas *taiep* la actividad cortical se caracteriza por una actividad de alta frecuencia y baja amplitud en las cortezas frontal, parietal y occipital, asociada con una actividad theta con un incremento en la actividad de alta frecuencia, conductualmente se caracteriza por el resto de la actividad de la musculatura extensora, con sacudidas

musculares aisladas y una fase característica por la retracción de la musculatura facial (Cortés y cols., 2005); y por tres patrones de cambio en el electromiograma de la musculatura de la nuca e incremento de la actividad sostenida en el gas trocnemio-sóleo, musculatura de tipo extensor (Valencia y Aceves, 1992).

Respecto a la organización del ciclo sueño-vigilia, los perros narcolépticos muestran un hipnograma desorganizado con más transiciones entre los distintos estados de conciencia (Kaitin y cols., 1986 a y b); asociado con más eventos de vigilia, sueño ligero y sueño MOR y de menor duración media para cada una de las etapas (Kaitin y cols., 1986 a, b; Mitler y Dement, 1977; Lucas y cols., 1979).

Esta característica es válida tanto para los casos de perros narcolépticos Doberman-pinscher y Labrador con transmisión genética autosómica recesiva de su enfermedad, con un defecto en el receptor de orexinas tipo 2 (ORX-2) (Chemelli y cols., 1999; Kaitin y cols., 1986 a y b); así como en perros con narcolepsia sin un patrón claro de transmisión de la enfermedad entre ellos los de las razas Poodle, Beagle o Terrier (Lucas y cols., 1979; Mitler y Dement, 1977). En el caso de las ratas *taiep* se ha mostrado en este trabajo de tesis que el ciclo sueño-vigilia está desorganizado con menos eventos de vigilia, SOL, y sueño MOR, pero con una duración media mayor, lo que implica que el mutante tiene problemas en las transiciones entre los distintos estados de conciencia.

En el caso de la vigilia, la duración media es mayor, tanto en la fase de luz como en la de oscuridad; y lo mismo para el sueño de ondas lentas en la fase de luz. Cabe la

pena destacar que las ratas Sprague-Dawley mostraron más eventos de sueño MOR en la fase de luz y a lo largo del ciclo luz-oscuridad respecto de las *taiep*, con duraciones medias similares en ambos grupos.

Es importante destacar que en los modelos de lesión del sistema orexinérgico en ratones y a sea por carecer del gen (knockout) de la pre-pro-orexina o del receptor a orexina tipo 2, en todos estos animales se presenta una desorganización del ciclo sueño-vigilia y episodios de “arresto motor” esto es inmovilidades con atonía en los músculos de la nuca y actividad theta en el electroencefalograma, pero no se registra esta banda en el hipocampo o bien en otra región subcortical (Scammell y cols., 2009).

En el caso de las ratas cuyas neuronas orexinérgicas son lesionadas con “*ataxina 3*” o con saporina, muestran de 3 a 4 episodios de atonía cada noche y se acompañan de un electroencefalograma con ritmo theta que domina en el rango de frecuencia y con una duración de alrededor de 2 minutos (Beuckmann y cols., 2004; Gerashchenko y cols., 2001).

En el caso de las ratas lesionadas con saporina, estas muestran una reducción de hasta un 75% de los niveles de orexinas en el líquido cefalorraquídeo y de dos a tres episodios de atonía abrupta con un EEG similar al del sueño MOR (Gerashchenko y cols., 2001); debe destacarse que la atonía en las ratas usualmente se antecede de sueño no MOR, mientras que en los ratones se antecede de vigilia, lo que puede deberse a diferencias entre ambos grupos de roedores, en cuanto a los efectos que produce la pérdida de la innervación orexinérgica sobre los núcleos adrenérgicos (*locus*

coeruleus), serotoninérgicos (rafé dorsal) e histaminérgicos (núcleo tubero-mamilar) sea diferente entre ratas y ratones. Un hallazgo importante e intrigante es que las ratas lesionadas muestran esos casos episódicos de atonía respecto de lo reportado en los modelos en ratones y en los perros narcolépticos; y para el caso de las ratas *taiep*, estos mutantes muestran una mayor incidencia de inmovilidades, con 36 episodios cada 24 h, lo que las homologa con los perros homocigotos narcolépticos (Kaitin y cols., 1986 a y b).

De hecho, en este modelo se realizaron estudios farmacológicos, y del ciclo sueño-vigilia y hemos obtenido resultados similares a los reportados para los perros narcolépticos. Es claro que la noradrenalina a través de los receptores alpha 1 y alpha 2 juega un rol en la regulación de las inmovilidades. Así, se ha reportado que la prazosina, un antagonista alpha 1, incrementa las cataplejías en humanos (Aldrich y Rogers, 1989), perros (Mignot y cols., 1988), y en la rata *taiep* (Cortés y cols., 2007); mientras que, los agonistas alpha 2 adrenérgicos también los incrementan en los perros (Nishino y Mignot, 1997; Nishino y cols., 1993 b) y en la rata *taiep* (Eguibar y cols., 2006). Por otra parte, los antagonistas alpha 2 los disminuyen tanto en los perros como en las ratas *taiep* (Eguibar y cols., 2006; y Mignot, 1997).

Por otra parte, el sistema serotoninérgico también regula las inmovilidades a través tanto de los receptores $5H_{T_{1A}}$ / $5HT_{1B}$ disminuyéndolas en los perros por inducción con alimentos apetitosos, como son las albóndigas de carne (Nishino y Mignot, 1997; Nishino y cols., 1993 a); así como en las ratas *taiep* que disminuyen los episodios de inmovilidad al tomarlas por la cola (Cortés y cols., 2005; Ita y cols., 2009).

Adicionalmente los receptores $5HT_{2A/2C}$, los cuales disminuyen las inmovilidades e incrementan la vigilia con el agonista específico (\pm)-2,5-Dimetoxi-4-iodoanfetamina clorhidrato ((\pm) DOI); (Eguibar y cols., 2009). Por último, los receptores de la familia D_2 dopaminérgicos producen un incremento de las cataplejías en los perros (Nishino y Mignot, 1997), y en las ratas *taiep* (Eguibar y cols., 2010).

Este perfil farmacológico de las cataplejías es similar en ambos grupos, lo que sugiere que las vías neurales involucradas en los factores inductores del sueño MOR y en las cataplejías las comparten, pero con distintas intensidades y temporalidades, lo que por una parte produce una actividad desorganizada en la corteza cerebral y actividad theta en el hipocampo, y por la otra en las vías retículo-espinales que producen la inhibición en las motoneuronas. De hecho la inhibición glicinérgica que se produce durante el sueño MOR es de la mayor amplitud descrita a la fecha (Chase y Morales, 1990); pueden producir inhibiciones completas en las α -motoneuronas como las que se producen en las cataplejías completas en los perros o en otras ocasiones incompletas debido a que la inhibición solo se da en la región lumbosacra, por lo que solo se pierde el tono muscular en los cuartos traseros. Mientras que en la rata *taiep* durante las inmovilidades la actividad eléctrica de las unidades motoras oscila de manera característica presentando los tres tipos de patrones electromiográficos de las inmovilidades. Adicionalmente, esta oscilación de la actividad eléctrica de las motoneuronas puede deberse a la despolarización que producen las vías orexinérgicas descendentes, a través del receptor orexinas-1, como ha sido mostrado en las motoneuronas del gato (Yamuy y cols., 2004; 2010).

Un estudio inicial en la rata *taiep* realizado en colaboración con el Dr. Jerry Siegel en la Universidad de California, Los Angeles U.S.A. (UCLA), no mostró diferencias significativas en los niveles de orexinas en el líquido cefalorraquídeo de las ratas *taiep*, sin embargo el rango de edades fue de 3 a los 11 meses de edad, por lo que es necesario realizar experimentos adicionales limitando el rango de edad al periodo de tiempo cuando las inmovilidades son máximas, es to es , de los 7 a los 9 meses (Cortés y cols., 2005).

Existen enfermedades de la mielina en los humanos como es el síndrome de Rasmussen o la esclerosis múltiple, que presentan lesiones inflamatorias agudas y crónicas que se acompañan de infiltraciones de linfocitos T, pero sin zonas de necrosis. Con la evolución de estas enfermedades los pacientes desarrollan somnolencia diurna excesiva y una latencia corta al sueño MOR, por lo que también se les diagnostica narcolepsia (Lagrange y cols., 2003; Kambayashi y cols., 2006).

La esclerosis múltiple, es la enfermedad de la mielina más frecuente, se caracteriza por presentarse con lesiones inflamatorias crónicas con remielinización parcial y en sus fases agudas con desmielinización en zonas diversas del SNC. La esclerosis múltiple se ha asociado con narcolepsia y con narcolepsia-cataplejía, ya que comparten el haplotipo DQB1*0602 de los antígenos de histocompatibilidad, lo que les da un sustento genético similar (Mignot y cols., 1997). Sin embargo, a la fecha, no se sabe si en estos casos son secundarios a daño hipotalámico, a factores de riesgo medioambientales o tan solo a una coincidencia de ambas enfermedades (Nishino y cols., 2000 b).

También en el caso del lupus eritematoso sistémico, que cursa con autoinmunidad, se ha mostrado que algunos pacientes desarrollan narcolepsia (Pablos y cols., 1993; Haddad y cols., 2010) o algunos casos de trauma cráneo-encefálico tienen como secuela la narcolepsia, con niveles normales o subnormales de orexinas. En los casos de la enfermedad de Parkinson, se ha mostrado que los pacientes cursan con somnolencia diurna excesiva y en la enfermedad de Alzheimer, también se ha reportado dicha asociación (para revisión consulte Kambayashi y cols., 2006). En la rata *taiep* se ha mostrado que tiene una desmielinización progresiva en varias vías centrales (Lunn y cols., 1997) lo que altera la morfología del potencial de acción compuesto de nervios ópticos *in vitro* (Roncagliolo y cols., 2000), así mismo, las velocidades de conducción de los tres grupos de fibras (mielinizadas y poco mielinizadas) decrecen con la edad del mutante (Roncagliolo y cols., 2000). La administración en el baño de 4 aminopiridina, que actúa sobre los canales de potasio rápidos, que se exponen por la desmielinización resarce la velocidad de conducción (Roncagliolo y cols., 2000). En la rata *taiep* se ha descrito, que las ratas *taiep* tienen lesiones similares a las de la esclerosis múltiple, lo que la homóloga con lo reportado en humanos, y en ambos, la narcolepsia es parte del complejo síndrome que las caracteriza (Wilkins y cols., 2010).

Adicionalmente, en las ratas *taiep* hemos mostrado que muestran reacciones inmunológicas secundarias con activación de los astrocitos e incremento de los niveles de interleucinas (León-Chavez y cols., 2001, 2003, 2006). Cabe la pena destacar que en los perros narcolépticos que reciben cuando son cachorros un anti-inflamatorio y un glucocorticoide no muestran en la edad adulta cataplejía, sugiriendo que la inmunidad

juega un rol en el desarrollo de la enfermedad también en perros narcolépticos homocigotos con mutación en los receptores a orexinas tipo 2 (Boehmer y cols., 2004).

La otra posibilidad es que las ratas *taiep*, sean un modelo de trastorno conductual asociado al sueño MOR, que se caracteriza por la pérdida de la atonía durante el sueño MOR, por lo que el sujeto actúa sus sueños. En las etapas iniciales del trastorno, se caracteriza por actividad física y después se desarrolla activación tónica de la musculatura con despliegue de conductas agresivas o bien en otras actividades motoras intensas. Cabe la pena destacar, que el trastorno conductual asociado al sueño MOR se asocia en más del 90% de los casos a la enfermedad de Parkinson, enfermedades cerebrales neurodegenerativas con inclusión de cuerpos de Lewy.

En el futuro podremos determinar la asociación entre la inmunidad y las alteraciones neurológicas, incluyendo la narcolepsia-cataplejía, el trastorno conductual asociado al sueño MOR y las orexinas en el mutante de la mielina *taiep* y sus interrelaciones.

En conclusión, la narcolepsia-cataplejía constituye un trastorno del sueño que a partir del descubrimiento de las orexinas se encontró que es una enfermedad con un origen único. Sin embargo, con estudios ulteriores se pudo establecer que el sustrato genético juega un rol básico, y la inmunidad parece tener también un papel importante y ser probablemente el desencadenante. En este contexto el mutante de la mielina es un modelo importante ya que las alteraciones de la mielina, la astrocitosis y la activación

inmunitaria son inherentes a la rata *taiep* y por ende es un modelo muy adecuado para el estudio neuropatológico de este trastorno del sueño.

CAPÍTULO 3

SISTEMA COLINÉRGICO

Con el uso de la farmacología se puede dilucidar el papel de los sistemas de neurotransmisores y/o neuromoduladores implicados en la inducción de los episodios de inmovilidad; es así que mediante la administración de drogas agonistas y antagonistas del sistema colinérgico muscarínico se obtuvieron los siguientes resultados.

AGONISTAS COLINÉRGICOS

Arecolina.

Agonista colinérgico muscarínico inespecífico

Frecuencia

Respecto a la frecuencia de los EIs inducidos por manipulación, los resultados muestran que la frecuencia osciló alrededor de un valor promedio de 7 episodios con todas las dosis empleadas, no siendo estadísticamente diferente entre ellas ($\chi^2_{(9)}=11.2$, $P=0.3$), de lo obtenido con la sesión control con una frecuencia promedio de 8 episodios de inmovilidad. Se emplearon 5 ratas macho *taiep* (Figura 36 A).

Duración

Con todas las dosis administradas se obtuvo un incremento no significativo de la duración promedio de los episodios de inmovilidad, siendo el incremento más alto con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con una duración promedio de 27.2 seg lo que representa un incremento del 36.6% respecto al grupo control, ($\chi^2_{(9)}=15.16$, $P=0.08$) (ver Figura 36 B).

Latencia

Con la administración del agonista arecolina, las latencias al primer episodio de inmovilidad, en las sesiones experimentales no se modificaron, como se puede observar en la Figura 36 C, siendo la dosis de 1,600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ la que produjo un incremento mayor con una latencia de 32 min, en comparación con la sesión control con tan solo una latencia de 11 min, lo que representó un cambio del 190% ($\chi^2_{(9)}=12.6$, $P=0.2$).

Conducta

La escala de actividad conductual después de la administración de arecolina se mantuvo durante todas las sesiones en una puntuación de 1, que representa una conducta de quieta, esto implica que no produjo cambios (Figura 36 D).

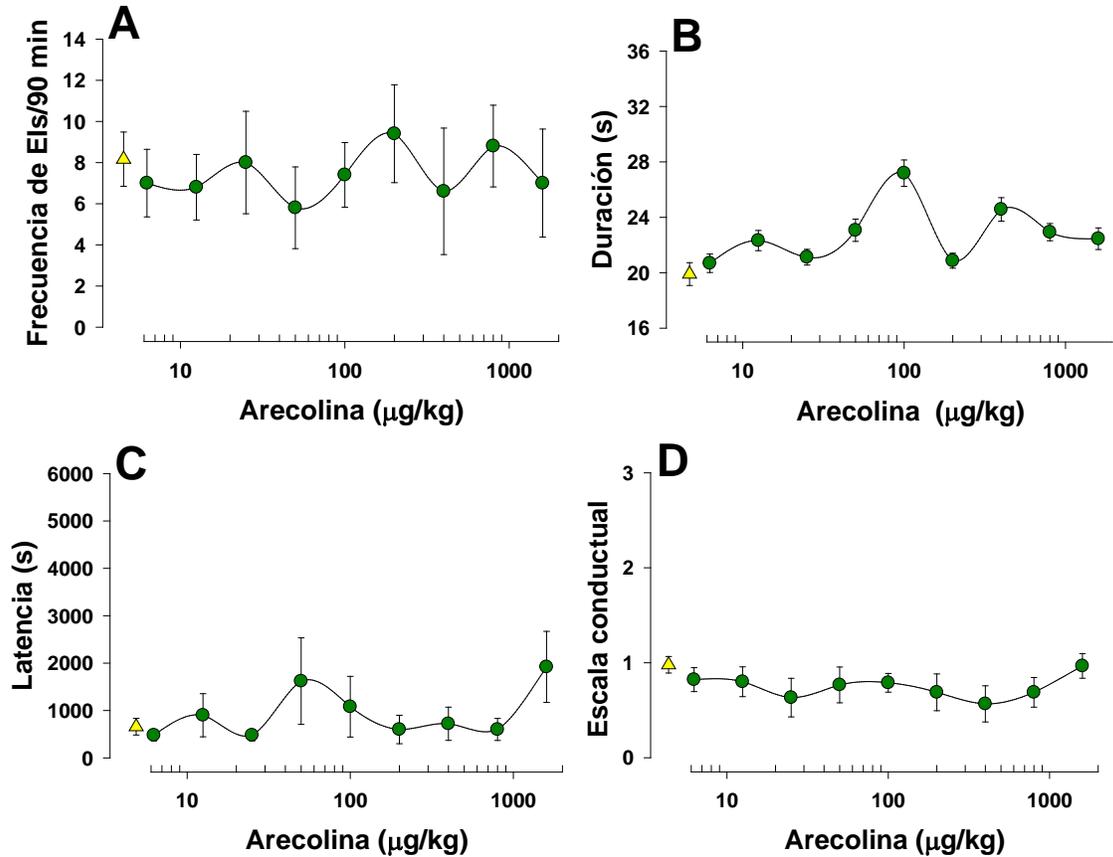


Figura 36. Efecto de la arecolina, un agonista colinérgico muscarínico sobre la frecuencia, duración y latencia de los episodios de inmovilidad. En **A)** se muestra que la arecolina no produce cambios significativos en la frecuencia de los EI ($\chi^2_{(9)}=11.2$, $P=0.26$). **B)** no se obtienen cambios significativos en la duración media de los EI ($\chi^2_{(9)}=15.16$, $P=0.08$), así como también no cambió la latencia al primer EI. En **D)** se muestra que la arecolina tampoco produce cambios en la actividad conductual.

McN-A-343

Agonista colinérgico muscarínico del receptor M₁

Frecuencia

La administración sistémica de I McN-A-343, no modificó la frecuencia de los episodios de inmovilidad ($\chi^2_{(7)}=11.1$ $P=0.13$). Los valores promedio por dosis se mantuvieron en una frecuencia cercana a 1/18 lo que resultó ser un valor promedio de tan solo 1.07 EI (Figura 37 A). El grupo para este experimento fue de 6 ratas macho *taiep*.

Duración

La duración promedio de los episodios de inmovilidad, se incrementó con todas las dosis administradas (1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), en especial la dosis de 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con la cual se obtuvo un incremento desde 18.3 seg hasta 28.5 seg lo que representa un aumento del 56%. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los grupos ($\chi^2_{(7)}=19.6$, $P=0.007$), sin embargo este efecto no fue significativo respecto al grupo control (Figura 37 B).

Latencia

La latencia a presentar el primer episodio de inmovilidad se ve incrementada con las primeras cinco dosis administradas, siendo este incremento de un 48% con la dosis de 100 μg con las dosis subsecuentes se produjo un decremento que alcanza valores similares a los obtenidos con el grupo control. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los grupos ($\chi^2_{(7)}=13.6$, $P=0.05$), sin embargo este efecto no fue significativo respecto al grupo control (Figura 37 C).

Conducta

Por el contrario el efecto de este agonista colinérgico muscarínico, disminuye el estado de alerta de la rata a un estado de somnolencia, siendo este efecto estadísticamente significativo con las dosis de 10, 30, 100 y 300 μg ($\chi^2_{(7)}=30.6$, $P<0.001$ + Dunn, $P<0.05$, Figura 37 D).

Oxotremorina-M

Agonista colinérgico muscarínico inespecífico

Frecuencia

El efecto de este administrado por vía intraperitoneal, disminuyó la frecuencia de los episodios de inmovilidad con todas las dosis administradas. Cabe mencionar que el valor de la sesión control fue de 5.3 ± 1.3 episodios mientras que el promedio de las sesiones en las que se administró la droga disminuyó a 3.3 ± 0.4 ., siendo este cambio estadísticamente significativo solamente con la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\chi^2_{(6)}=18.8$, $P<0.005$ + Dunn $P<0.05$, Figura 38 A).

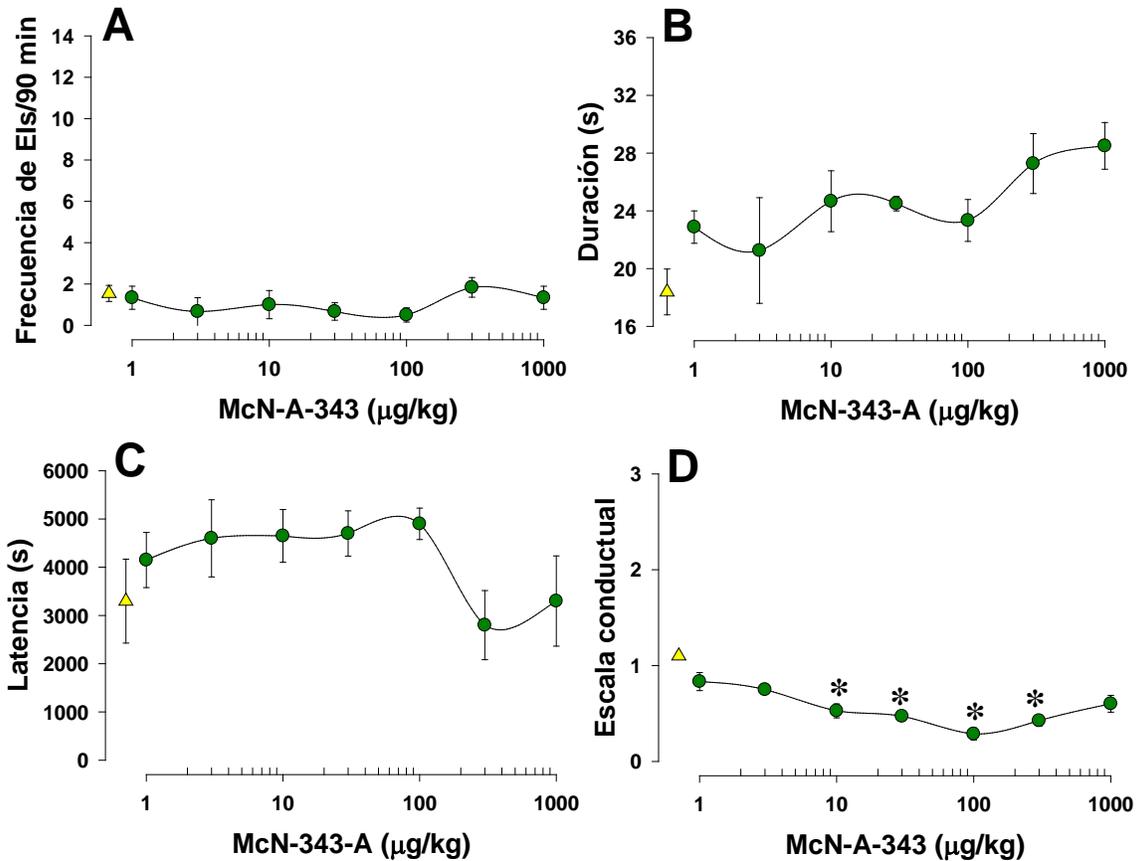


Figura 37. Efecto del agonista colinérgico muscarínico McN-A-343 sobre los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación. En **A**) podemos observar que la administración sistémica de esta droga no modifica la inducibilidad de los EI ($\chi^2_{(7)}=11.1$, $P=0.13$). **B**) la duración promedio de los EI tiende a incrementarse con todas las dosis administradas (1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1,000 µg/kg), análisis de varianza ($\chi^2_{(7)}=19.6$, $P=0.007$), sin que llegue a ser estadísticamente significativos respecto al grupo control. El mismo efecto se puede ver en **C** respecto a la latencia al primer EI ($\chi^2_{(7)}=13.6$, $P=0.05$). En **D** por el contrario el efecto de este agonista disminuye el estado de alerta de la rata hacia la somnolencia, siendo estadísticamente significativo con las dosis de 10, 30, 100 y 300 µg ($\chi^2_{(7)}=30.6$, $P<0.001$ + Dunn, $P<0.05$).

Duración

El incremento en la duración de los episodios de inmovilidad se obtuvo desde la primera dosis administrada; este efecto se obtuvo con todas las administraciones, de tal

forma que con la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se obtuvo la mayor duración (34 seg), siendo esta estadísticamente diferente ($\chi^2_{(6)}=24.7$; $P< 0.001$ + Dunn $P< 0.05$; Figura 38 B).

Latencia

La oxotremorina, es un agonista colinérgico muscarínico inespecífico, el cual incrementó la latencia a presentar el primer episodio de inmovilidad con las primeras cuatro dosis administradas (1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), obteniendo una latencia promedio en estas sesiones de 32 min respecto a los valores obtenidos al administrar este agonista en el grupo control en la cual el primer episodio se presentó en tan solo 14 min. Posteriormente con las dosis de 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se obtiene una disminución de este parámetro, con una latencia promedio de tan solo 8 min ($\chi^2_{(6)}= 15.5$; $P< 0.01$; Figura 38 C).

Conducta

El agonista colinérgico muscarínico no modificó de manera significativa el estado conductual de la rata con ninguna de las dosis administradas, permaneciendo quieta durante todas las sesiones experimentales analizadas ($\chi^2_{(6)}=12.7$, $P<0.05$; Figura 38 D).

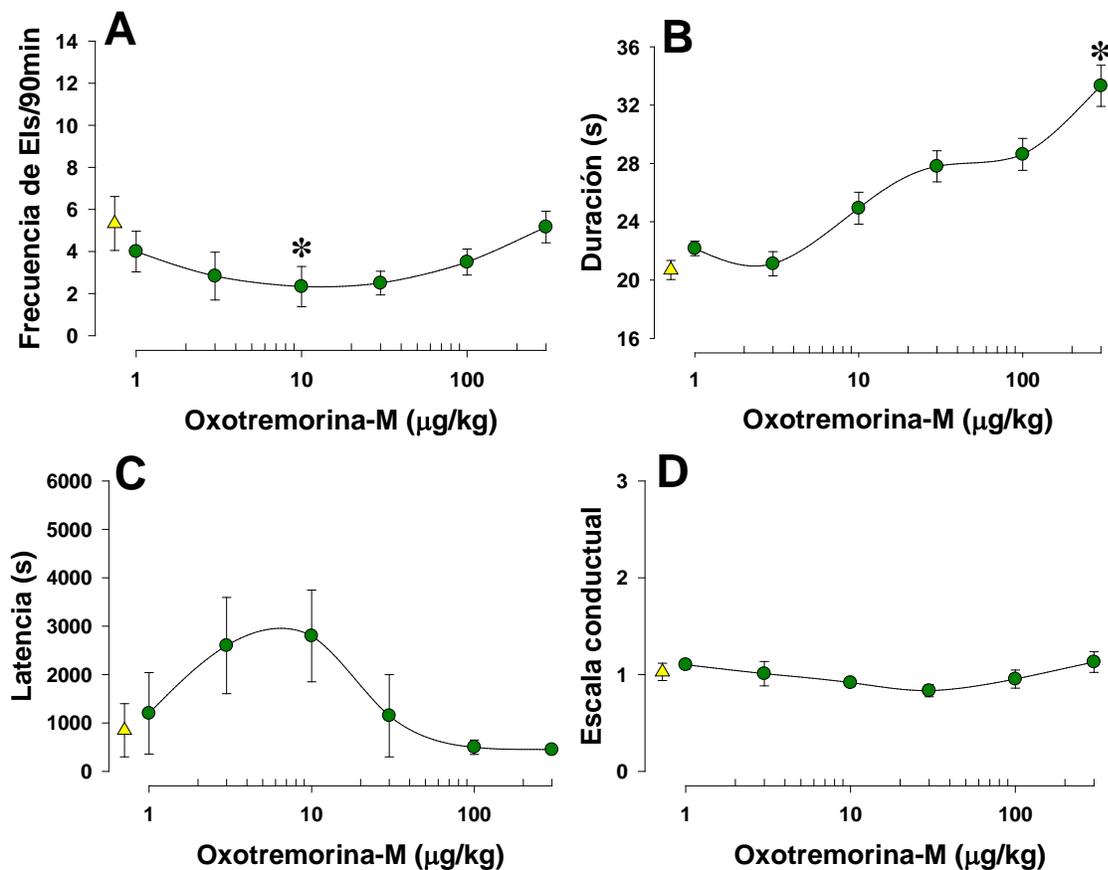


Figura 38. Efecto de la oxotremorina-M un agonista colinérgico muscarínico sobre la frecuencia, duración y latencia de los episodios de inmovilidad. La frecuencia de los EI solamente se disminuye con la dosis de 10 μg/kg como se muestra en **A** ($\chi^2_{(6)}=18.8$, $P<0.005$ + Dunn $P<0.05$); en **B** note como el incremento en la duración promedio de los EI se obtiene desde las primeras dosis administradas, sin embargo este efecto solo es estadísticamente significativo con la dosis más alta empleada (300 μg/kg) ($\chi^2_{(6)}=24.7$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$); en **C** la oxotremorina incrementa la latencia al primer EI en las dosis de 1, 3, 10 y 30 μg/kg, para posteriormente disminuir estos valores respecto al grupo control con las dosis más altas (100 y 300 μg/kg), ($\chi^2_{(6)}=15.5$; $P<0.01$); por último en **D** no se modifica el estado conductual de la rata, permaneciendo quietas como se expresa en la sesión control.

Pilocarpina

Agonista colinérgico muscarínico específico de los receptores M₁ y M₂.

Frecuencia

Con la administración sistémica de la pilocarpina, se obtuvo una disminución de la frecuencia de los episodios de inmovilidad con todas las dosis administradas (100, 200, 400, 800, 1,600 y 3,200 µg/kg). La frecuencia promedio en el grupo control fue de tan solo 5 episodios, reduciéndose este parámetro de manera significativa con las dosis de 800, 1,600 y 3,200 µg/kg, ($\chi^2_{(6)}=24.3$; $P< 0.001$ + Dunn $P< 0.05$); llegando a su máxima disminución (1.1 ± 06 ; promedio \pm e. e.m.) con la dosis más alta empleada (Figura 39 A).

Duración

La pilocarpina incrementó la duración promedio de los episodios de inmovilidad en todas las sesiones experimentales, siendo este incremento estadísticamente significativo con la dosis de 100 µg/kg, ($\chi^2_{(6)}= 15.2$; $P< 0.01$ + Dunn $P< 0.05$; Figura 39 B).

Latencia

Los resultados obtenidos con las primeras tres dosis administradas oscilaron en

valores similares a los obtenidos en la sesión control, es decir, el primer episodio de inmovilidad se presentó al rededor de los 28 minutos después de haber iniciado la sesión experimental. Sin embargo con las últimas tres dosis administradas, que corresponden a las de 800, 1,600 y 3,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, se obtuvo un incremento en la latencia, siendo este efecto estadísticamente significativo con las dosis de 1,600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\chi^2_{(6)}=16.9$; $P<0.01$ + Dunn $P< 0.05$; Figura 39 C).

Conducta

La conducta de los sujetos experimentales no se modificó con la administración de este agonista colinérgico, de manera semejante a lo presentado durante la sesión control ($\chi^2_{(6)}= 4.3$; $P= 0.6$; Figura 39 D).

ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS

Triexifenidil

Antagonista colinérgico muscarínico

Frecuencia

Los resultados muestran que la administración sistémica de triexifenidil, disminuyó la frecuencia de los episodios de inmovilidad con todas las dosis administradas. El valor promedio de la sesión control fue de 11 episodios obteniendo una disminución de 37% con la primera dosis, disminuyendo de manera dos

dependiente hasta alcanzar un decremento del 95% con la dosis más alta que fue de 3,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo significativo este cambio con las dosis de 10, 30, 100, 1,000 y 3,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\chi^2_{(8)}=36$, $P<0.001$ + Dunn, $P<0.05$) (Figura 40 A).

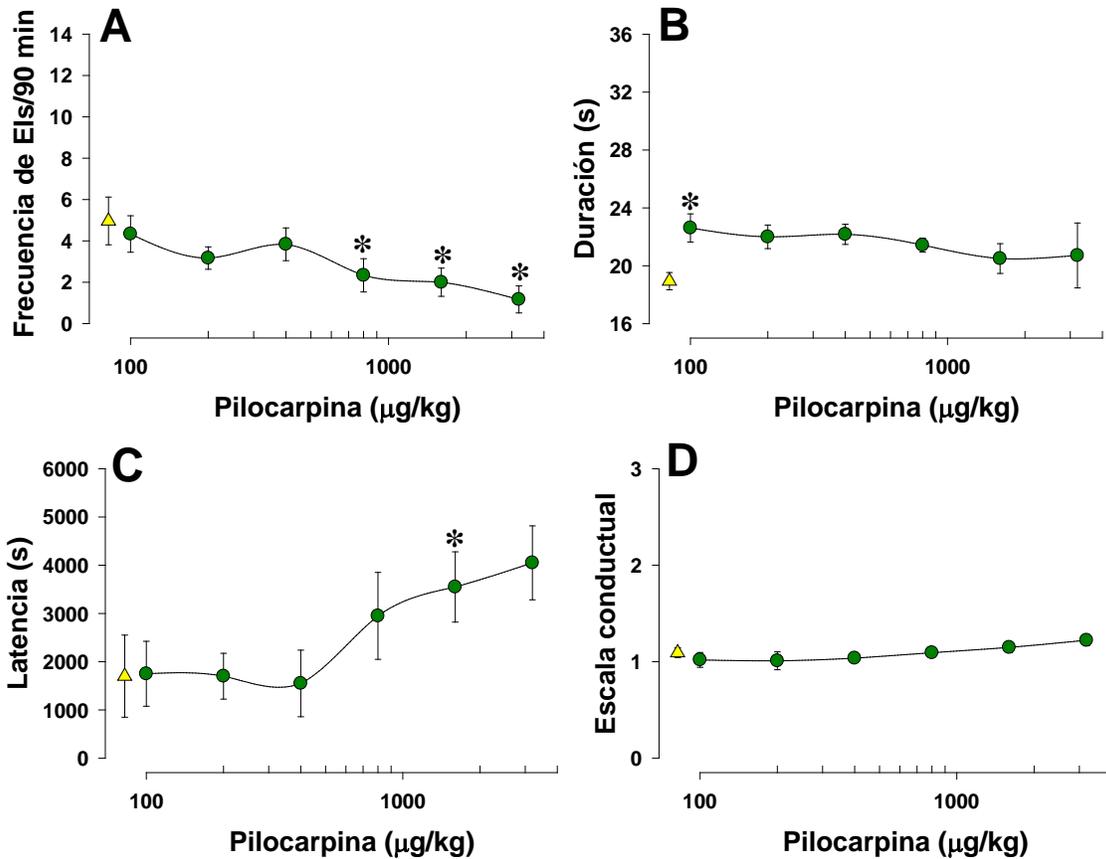


Figura 39. Efecto de la pilocarpina en los episodios de inmovilidad inducida en la rata taiep. **A)** La administración de esta droga muscarínica colinérgica produce una disminución significativa de los EI con las dosis de 800, 1,600 y 3,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\chi^2_{(8)}=24.3$, $P<0.001$ + Dunn, $P<0.05$). **B)** se muestra que la duración de los EI se incrementan en todas las sesiones, siendo este efecto estadísticamente significativo con la dosis más baja empleada ($\chi^2_{(6)}=15.2$; $P<0.01$ + Dunn $P<0.05$). **C)** muestra un cambio bifásico en la latencia de los EI, siendo diferente al valor control respecto del valor obtenido con 1,600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\chi^2_{(6)}=16.9$, $P<0.01$, + Dunn $P<0.05$); los sujetos experimentales no mostraron cambios conductuales con todas las dosis empleadas como se muestra en **D**.

Duración

Sin embargo la duración promedio de los episodios de inmovilidad no se modificó de manera significativa, como se puede observar en la Figura 40 B, donde el valor más alto en la duración se obtiene con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de triexifenidil ($\chi^2_{(8)}=18.8$; $P=0.009$).

Latencia

Este parámetro se incrementó de manera dosis-dependiente, de tal forma que se alcanza un valor de 75 min en la latencia a presentar el primer episodio de inmovilidad con la dosis más alta, lo que representa un incremento de un 900% respecto al valor obtenido en la sesión control, el cual fue de tan solo 7.5 min ($\chi^2_{(8)}=24.4$; $P=0.002$; Figura 40 C).

Conducta

Se puede observar que el triexifenidil modificó la conducta desde un estado de alerta hacia la somnolencia, con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\chi^2_{(8)}=35.6$; $P<0.001$; Figura 40 D) y con las últimas dosis administradas incrementó la actividad locomotora, es decir, tuvo un efecto bifásico.

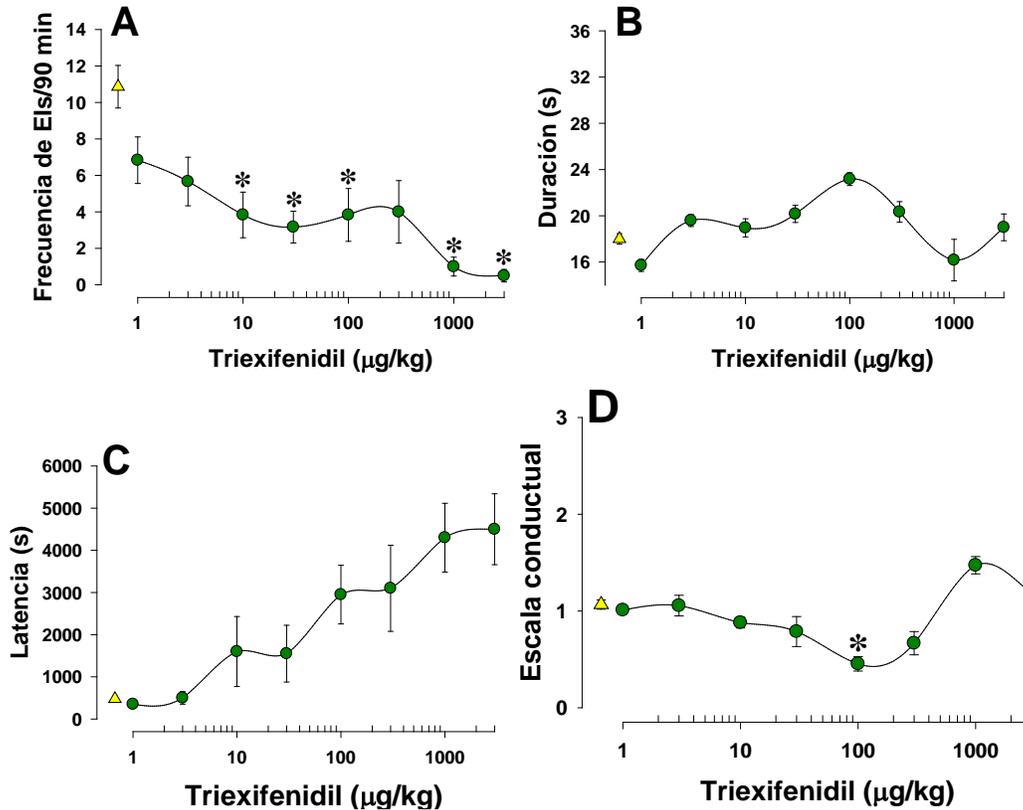


Figura 40. Efecto del antagonista colinérgico muscarínico triexifenidil en la frecuencia, duración y latencia de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación. **A)** muestra el principal efecto que tuvo esta droga sobre los parámetros evaluados disminuyendo la frecuencia de manera dosis dependiente ($\chi^2_{(8)}=36$, $P<0.001$ + Dunnett, $P<0.05$). **B)** Note que la administración del antagonista, la duración promedio de los episodios ($\chi^2_{(8)}=18.8$; $P=0.009$) y la latencia en **C** se incrementa, sin ser estadísticamente significativos en la prueba post hoc ($\chi^2_{(8)}=24.4$; $P=0.002$). En **D)** la modificación de la conducta es significativa con las dosis de 100 µg/kg ($\chi^2_{(8)}=35.6$; $P<0.001$).

Sulfato de atropina

Antagonista colinérgico muscarínico

Frecuencia

La Figura 41 A muestra los promedios de la frecuencia de los episodios de inmovilidad con las distintas dosis administradas. Note como la frecuencia incrementó

con todas las dosis empleadas, siendo el mayor efecto con la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la cual incrementó en un 47 % la frecuencia respecto al valor control que fue de tan solo 6 episodios, El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los grupos ($\chi^2_{(7)}=14$; $P=0.05$), sin embargo este efecto no fue significativo respecto al grupo control (Figura 41 A).

Duración

La duración promedio de los episodios de inmovilidad se incrementó con todas las dosis administradas oscilando en 25 seg como un valor promedio. Sin embargo este incremento fue significativo solo con las dosis de 3 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ya que este parámetro incrementó la duración promedio en un 21% y 26% , respectivamente ($\chi^2_{(7)}=26.4$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$; Figura 41 B).

Latencia

Los resultados obtenidos muestran que la latencia a presentar el primer episodio de inmovilidad no se modificó después de administrar el antagonista colinérgico muscarínico, ya que el valor promedio de las sesiones experimentales fue de 16 min, mientras que en la sesión control se obtuvo un valor similar de 18 min en promedio, no encontrándose diferencias significativas entre ambos ($\chi^2_{(7)}=4$; $P=0.8$, Figura 41 C)

Conducta

Al evaluar el efecto del antagonista colinérgico en la conducta de la rata no encontramos diferencias en cuanto a su actividad locomotora durante todas las sesiones experimentales ($\chi^2_{(7)}=15.5$; $P=0.03$, Figura 41 D). El puntaje conductual que mostraron las ratas permaneció alrededor del valor control que fue de 1 ± 0.02 , puntaje que nos indica que las ratas permanecieron quietas.

4-DAMP

Antagonista colinérgico muscarínico de los receptores M₃

Frecuencia

La administración sistémica de 4-DAMP, un antagonista colinérgico muscarínico específico para los receptores M₃, produjo una disminución de la frecuencia con 6 de las 7 dosis empleadas. La frecuencia disminuyó con las dosis de 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, reduciéndola en un 64% y 76% respecto a la sesión control cuya frecuencia fue de tan solo 4 EIs, ($\chi^2_{(7)}=26$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$; Figura 42 A) y aunque con el resto de las dosis permaneció por debajo de la sesión control, no es significativo.

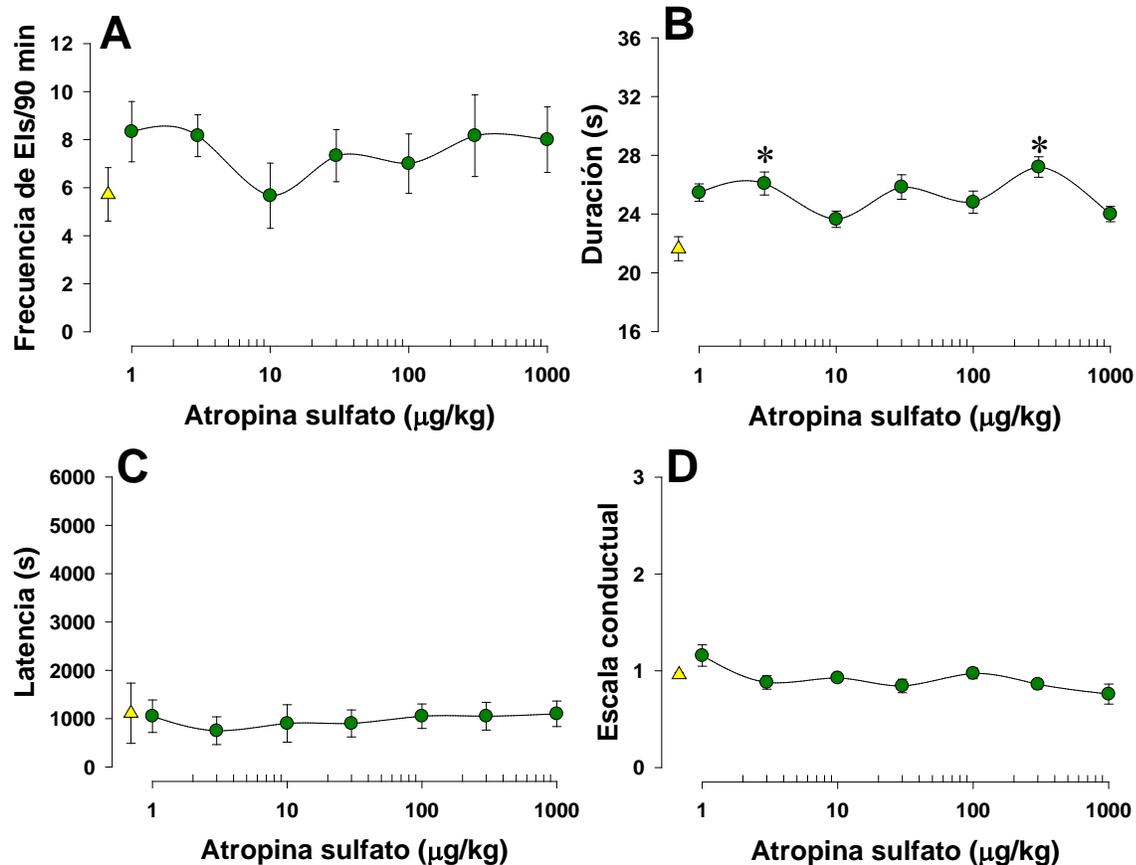


Figura 41. Efecto de la atropina sulfato, un antagonista colinérgico muscarínico, sobre la frecuencia, duración y latencia de los episodios de inmovilidad. En **A**) se muestra que la atropina incrementa la frecuencia de los EI inducidos por manipulación., el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los grupos ($\chi^2_{(7)}=14$; $P=0.05$), pero no con respecto al grupo control **B**) la atropina produce un incremento significativo en la duración promedio de los EI con las dosis de 3 y 300 µg/kg ($\chi^2_{(7)}=26.4$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$). **C**) la latencia al primer episodio oscila alrededor del valor del grupo control con todas las dosis administradas, de manera similar sucede con la conducta que en **D** se muestra que las ratas no cambiaron su actividad conductual permaneciendo en la escala de quietas.

Duración

En cuanto a la duración promedio de los episodios de inmovilidad se puede observar en la Figura 42 B que se obtuvo un incremento con las dosis más altas administradas siendo este efecto significativo con la dosis de 300 µg/kg, con la cual se

obtuvo una duración promedio de 26 ± 1 seg, lo que representa un incremento del 22.5 % respecto al grupo control ($\chi^2_{(7)}=26.8$; $P=0.001$ + Dunn $P< 0.05$; Figura 42 B).

Latencia

El antagonista colinérgico 4-DAMP no mostró efectos significativos sobre la latencia de los episodios de inmovilidad ($\chi^2_{(7)}=15$; $P=0.03$ (Figura 42 C).

Conducta

Como podemos observar en la Figura 42 D los valores de la actividad locomotora después de la administración de 1, 3 y 10 $\mu\text{g/kg}$ la droga colinérgica 4-DAMP permanecen en valores similares a los de la sesión control, sin embargo estos valores disminuyen el estado de alerta con las dosis de 30, 100, 300 y 1,000 $\mu\text{g/kg}$ siendo significativo este cambio tan solo con las dos últimas dosis administradas ($\chi^2_{(7)}=29.7$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$)

Pirenzepina

Antagonista colinérgico muscarínico específico de los receptores M_1

Frecuencia

La administración sistémica de la pirenzepina, disminuyó la frecuencia de los episodios de inmovilidad en un 16.8, 46.4 y 55.4 % con las dosis de 1, 3 y 10 $\mu\text{g/kg}$

administradas respectivamente, con respecto a la frecuencia obtenida en el grupo control que fue de 5.6 episodios.

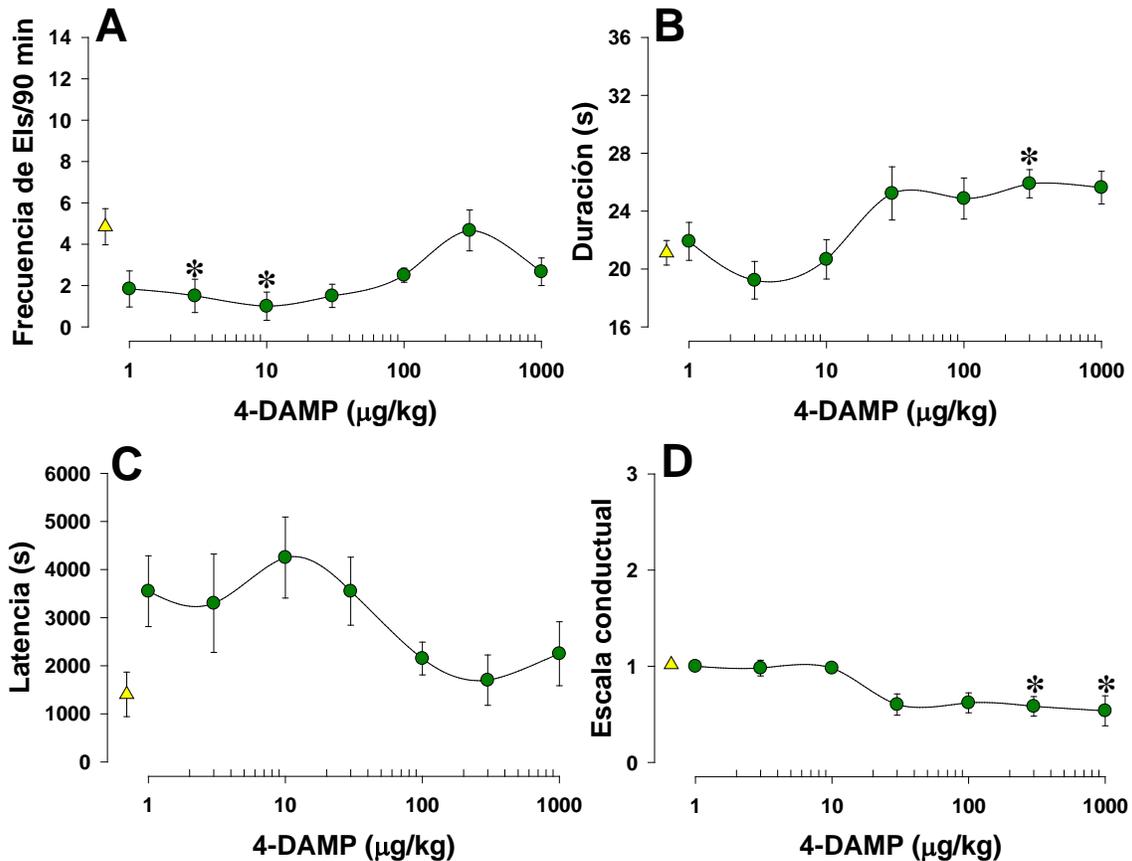


Figura 42. Efecto de la administración intraperitoneal del antagonista colinérgico muscarínico 4-DAMP. A) La administración de este fármaco produjo una disminución significativa en la frecuencia de los EI en las dosis de 3 y 10 µg/kg ($\chi^2_{(7)}=26$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$). **B)** La duración promedio de los EI se incrementa con las dosis más altas administradas, siendo este efecto significativo a la dosis de 300 µg/kg ($\chi^2_{(7)}=26.8$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$). **C)** El 4-DAMP produce un incremento significativo de la latencia al primer episodio de inmovilidad con todas las dosis administradas, ($\chi^2_{(7)}=15$; $P=0.03$) sin que este sea estadísticamente diferente respecto al grupo control, sin embargo este antagonista si produjo cambios en la conducta en las últimas cuatro dosis empleadas (30, 100, 300 y 1,000 µg/kg); ($\chi^2_{(7)}=29.7$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$) como se muestra en **D**.

La disminución de este parámetro no resultó estadísticamente significativa ($\chi^2_{(7)}=13$; $P=0.06$; Figura 43 A).

Duración

El antagonista colinérgico muscarínico incrementó la duración promedio de los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación, de manera significativa solo con la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\chi^2_{(7)}=28.6$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$; Figura 43 B).

Latencia

La latencia a presentar el primer episodios de inmovilidad no se modificó con la administración de la pirenzepina, los valores de las sesiones experimentales oscilan al rededor de 24 minutos, valor cercano al obtenido en la sesión control ($\chi^2_{(7)}=3.7$; $P=0.08$; Figura 43 C)

Conducta

Cabe destacar que la conducta que presentó la rata *taiep* durante las sesiones, cambió de la escala de quieta a un estado de somnolencia con las dosis más altas (ver Figura 43 D), siendo este cambio significativo con las dosis de 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ($\chi^2_{(7)}=26$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$).

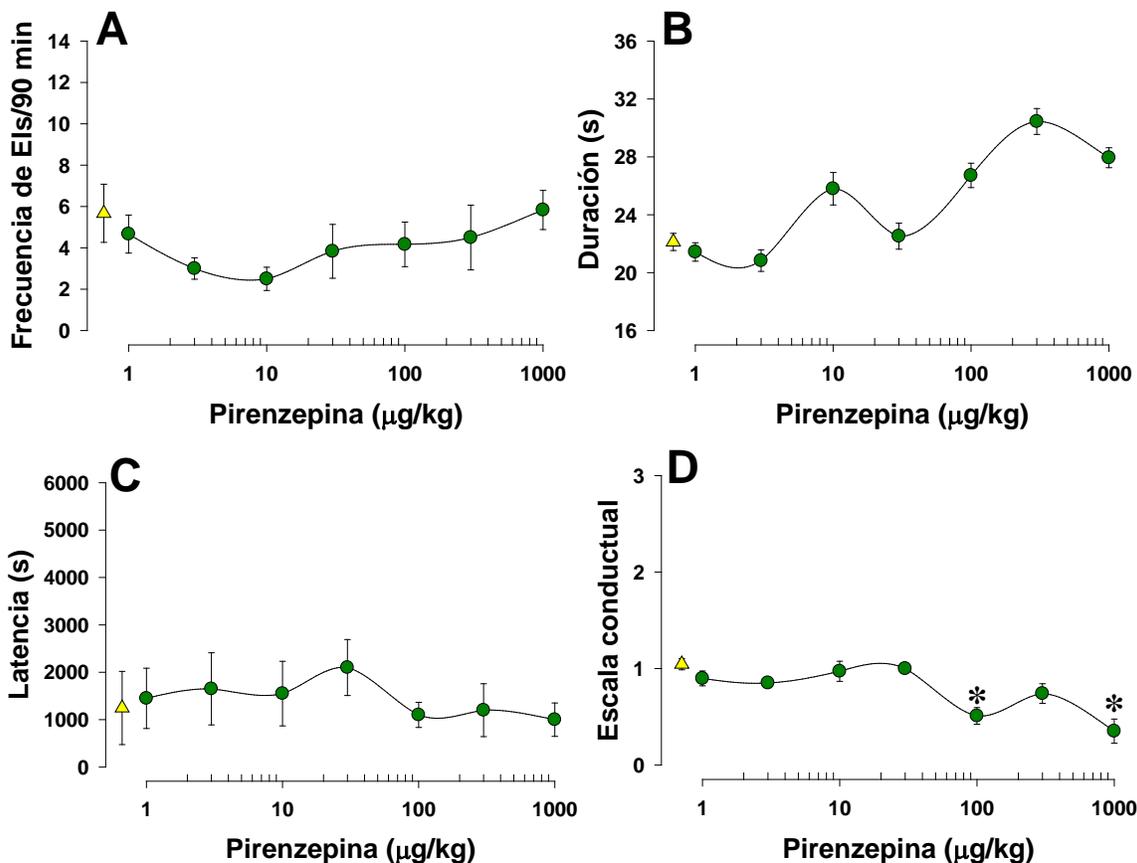


Figura 43. Efecto de la pirenzepina, un antagonista muscarínico del receptor M_1 . **A)** La administración sistémica de la pirenzepina no modifica la frecuencia de los EI ($\chi^2_{(7)}=13$; $P=0.06$). En **B)** podemos observar una tendencia a incrementar la duración promedio de los EI resultando este cambio diferente con la dosis de 300 µg/kg ($\chi^2_{(7)}=28.6$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$) **C)** La latencia de los EI osciló dentro de los valores del grupo control en todas las dosis administradas (1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1,000 µg/kg) no siendo estadísticamente diferentes ($\chi^2_{(7)}=3.7$; $P=0.08$). En **D)** se muestra que en las primeras dosis la conducta no cambia de manera significativa como sí sucede con las dosis de 100 y 1,000 µg/kg donde se presenta somnolencia ($\chi^2_{(7)}=26$; $P<0.001$ + Dunn $P<0.05$).

Tabla 9. Resumen del efecto de drogas colinérgicas en los episodios de inmovilidad

Droga	Episodios de inmovilidad			Edo. de alerta	Receptor
	Frecuencia	Duración	Latencia	Conducta	
Agonistas					
Arecolina	—	—	—	—	inespecífico
McN-A-343	—	—	—	↓	M ₁
Oxotremorina-M	↓	↑	—	—	inespecífico
Pilocarpina	↓	↑	↑	—	M ₁ – M ₂
Antagonistas					
Triexifenidil	↓	—	—	↓	inespecífico
Sulfato de atropina	—	↑	—	—	inespecífico
4-DAMP	↓	↑	—	↓	M ₃
Pirenzepina	—	—	—	↓	M ₁

DISCUSIÓN EXPERIMENTO 3

El modelo clásico de la regulación de la vigilia-sueño propuesto por Jouvet en 1967 implicaba un sistema recíproco de regulación entre las monoaminas y la acetilcolina. De tal forma que durante la vigilia predomina la acción de las monoaminas, principalmente la noradrenalina (NA) y la serotonina (5-HT), y que durante el sueño predominan las acciones de tipo colinérgico (Jouvet, 1967). Esto es, la acetilcolina juega un rol central en el cambio hacia sueño en un circuito que se ha homologado al funcionamiento de los “flip-flop” en un circuito eléctrico. Dado que la narcolepsia-cataplejía implica la irrupción del sueño con movimientos oculares rápidos en la vigilia, se ha propuesto que la acetilcolina juega un rol central en esta patología.

De hecho, la administración sistémica de inhibidores de la acetilcolinesterasa incrementa la frecuencia de episodios de cataplejía, pero a dosis que producen varios efectos colaterales como son taquicardia, sialorrea, vómito e hipertensión. Sin embargo, la mayoría de los estudios se hicieron hace más de 15 años y la falta de agonistas específicos y la presencia de efectos colaterales evitó una exploración específica del rol de los efectos muscarínicos. Sin embargo, cuando se administró carbacol en el tegmento pontino o en cerebro basal anterior, que incrementa las cataplejas en perros narcolépticos (Reid y cols., 1994a, Nishino y cols., 1995) y mediante la coadministración de antagonistas permitió determinar que el subtipo de receptores M_2 son los que participan en la regulación de las cataplejas.

Es importante destacar que los receptores colinérgicos muscarínicos se encuentran elevados en la formación reticular de los perros narcolépticos (Kilduff y cols., 1986), lo que explicaría la sensibilidad post-sináptica aumentada. Reid y cols., (1994b), han mostrado que en la región meso-pontina existe un mayor tono colinérgico. Experimentos recientes en ratones carecidos de los receptores de orexinas (DKO, double knock-out orexin mice, de sus siglas en inglés) han mostrado que dosis bajas de fisostigmina (10 a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) pero no las dosis altas (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$), incrementan los arrestos motores en DKO pero no su duración; y la atropina (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) los disminuye (Kalogiannis y cols., 2011). Así mismo, la administración de neostigmina en el núcleo pontis oralis o en el núcleo pontis caudalis incrementan los arrestos motores, efecto que es bloqueado por la co-administración de neostigmina con atropina, pero no su duración media. Estos autores concluyen que los mecanismos colinérgicos participan en el gatillaje de los arrestos motores, pero no en su duración promedio (Kalogiannis y cols., 2011).

Las ratas *taiep* muestran un perfil de respuestas farmacológicas modificando las cataplejías, de manera similar a lo que ha sido reportado en los perros narcolépticos. Sin embargo, la administración de agonistas colinérgicos no resultó en un perfil similar a los obtenidos en este modelo; pero sí en el caso de la administración de los antagonistas colinérgicos muscarínicos que los disminuyen, indicando que existe una cierta homología, pero con diferencias que deberían ser investigadas con agonistas más específicos para los diferentes tipos de receptores muscarínicos, para poder tipificar el perfil farmacológico colinérgico fino en las ratas *taiep* o en su defecto explorar la administración local de agonistas colinérgicos en la región del puente. Por

otra parte, experimentos preliminares, hemos mostrado que el donepecilo, un inhibidor de la acetilcolinesterasa de última generación, en la rata *taiep* disminuyen significativamente los episodios de inmovilidad, como ha sido reportado en los perros narcolépticos, lo que apunta a que sí hay una participación de la acetilcolina en la cataplejía de las ratas *taiep*.

Cabe la pena des tacar que las ratas *taiep* fueron obtenidas de una mutación espontánea durante el proceso de selección de las ratas HY (high-yawning, por sus siglas en inglés; Urbá-Holmgren y cols., 1990; Holmgren y cols., 1989). Las ratas HY muestran cambios en su respuesta a la acción de drogas colinomiméticas, siendo más sensibles a la acción de la fisostigmina que las ratas de bajo bostezo LY (del inglés low yawning; Urbá-Holmgren y cols., 1993); por lo que es plausible pensar que las ratas *taiep* muestren también respuestas diferentes ante la administración de agonistas y antagonistas colinérgicos. Es necesario explorar el posible rol de los receptores colinérgicos nicotínicos para tener un perfil completo del papel de la acetilcolina en este mutante de mielina.

El grupo de Dr. Mignot realizó una exploración farmacológica sistemática en la colonia de perros narcolépticos de la Universidad de Stanford, para analizar el papel que juegan las vías noradrenérgicas, serotoninérgicas, así como colinérgicas en la frecuencia y duración de las cataplejías inducidas por el juego o al presentarles alimentos apetitosos. De tal forma que antagonistas alpha 1 y agonistas alpha 2 noradrenérgicos, o los agonistas dopaminérgicos presinápticos y serotoninérgicos 5HT_{1A}, 5HT_{1B} o 5HT_{2A/2C} incrementan las cataplejías en perros narcolépticos (Nishino y

Mignot, 1997). Un patrón similar de sensibilidad farmacológica hemos descrito en la rata *taiep* con una correspondencia exactamente igual a lo reportado en los perros narcolépticos (Cortés y cols., 2007; Eguibar y cols., 2006, 2009, 2010; Ita y cols., 2009).

Es importante destacar que validamos que al sostener a las ratas por la cola en las primeras tres vértebras coccígeas o alrededor del tórax es un estímulo eficiente y eficaz para inducir inmovilidades (Cortés y cols., 2005). La estandarización de la prueba nos ha permitido realizar un análisis farmacológico exhaustivo de las cataplejías en las ratas *taiep* y hemos mostrado que tanto los receptores noradrenérgicos alpha 1, como los alpha 2, regulan los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación. De tal forma que la prazosina, un antagonista alpha 1, así como los agonistas alpha 2 como la clonidina o la xilacina incrementan su frecuencia, mientras que los antagonistas alpha 2 como la yohimbina o el idaxozan la disminuyen. Este perfil de las vías noradrenérgicas es similar a lo obtenido en los perros narcolépticos (Nishino y cols., 1990; Mignot y cols., 1988, 1989).

Por otra parte, otras aminas biogénicas como son, la dopamina y la serotonina, también están involucradas en la modulación de las inmovilidades tanto en los perros narcolépticos como en las ratas *taiep*. De tal forma que los agonistas de los receptores serotoninérgicos de la familia 5HT_{1A/1B} o 5HT_{2a/2c} incrementan las cataplejías en ambos modelos (Nishino y cols., 1995; Ita y cols., 2009; Eguibar y cols., 2009). Lo mismo es válido en el caso de los agonistas dopaminérgicos de la familia D₂ cuyos agonistas específicos incrementan la cataplejía en los perros narcolépticos y en la rata *taiep* (Eguibar y cols., 2010; Okura y cols., 2000). Este tipo de análisis fino de la farmacología

de las cataplejías no se ha realizado en los ratones carentes de orexina o de sus receptores. En estos modelos solo se han explorado los inhibidores de recaptura de noradrenalina y serotonina, como son la imipramina y la desimipramina, que disminuyen significativamente las inmovilidades que en este modelo, los cuales han sido denominados “*arrestos conductuales*”. En el caso de los perros narcolépticos estos inhibidores también disminuyen las cataplejías, particularmente los inhibidores de recaptura de noradrenalina (Nishino y Mignot, 1997). En el caso de la rata *taiep* son los inhibidores de recaptura de serotonina, como es la fluoxetina, las que disminuyen los EIs (Gavito, 2001).

En los perros narcolépticos han sido explorados inhibidores inespecíficos de aminas biogénicas, así como inhibidores específicos para cada neurotransmisor (para una revisión detallada véase Nishino y cols., 2000b). De hecho, en este modelo son los inhibidores de recaptura de noradrenalina como la nisoxentina, la que ejerce un mayor efecto inhibitorio sobre las cataplejías inducidas por la exposición a un alimento apetitoso. Debo destacar que la fluoxetina, un inhibidor específico de la recaptura de serotonina, también disminuye las cataplejías (Babcock y cols., 1976). En el caso de las ratas *taiep* la fluoxetina administrada de forma aguda disminuye las inmovilidades, y este efecto se acentúa hasta a birlas cuando se administra crónicamente mediante bombas osmóticas AlzetTM (Gavito, 2001).

En futuros experimentos, analizaremos la concentración y la unión específica de los cinco subtipos de receptores muscarínicos en las vías involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia, como son la formación reticular pontina, el cerebro basal anterior,

el tegmento pedúnculo pontino, y el tegmento latero-dorsal. Se hace necesario analizar la posible participación de los receptores nicotínicos a pesar de que en los perros narcolépticos no se han encontrado efectos con la administración sistémica de la nicotina a 30 µg/kg, ni el antagonista mecamilamina a dosis de 0.3 y 1 mg/kg (Delashaw y cols., 1979).

Es importante destacar, que en experimentos recientes en nuestro laboratorio, la D-anfetamina y el modafinil, dos drogas comúnmente empleadas para tratar la somnolencia en los humanos dieron resultados en la rata *taiep*, incrementando la vigilia e inhibiendo las inmovilidades de manera similar a lo obtenido con los perros narcolépticos. El modafinil, no solo incrementa la vigilia, sino que también disminuye de manera significativa la frecuencia de las cataplejías (Lara-Lozano, 2011), lo que es una evidencia adicional de que las respuestas farmacológicas son similares en ambos modelos animales. Es importante destacar entonces que los modelos animales juegan un papel fundamental para el estudio de los agentes causales de la narcolepsia/cataplejía, y de forma importante abrir nuevas opciones terapéuticas entre ellas el modafinil y recientemente el gamma hidroxibutirato, el cual disminuye la somnolencia excesiva diurna, uno de los síntomas más discapacitantes en los pacientes afectados de narcolepsia y con la administración a largo plazo también disminuye las cataplejías (Vienne y cols., 2010).

A nivel neuropatológico, en perros narcolépticos se ha descrito un incremento en la astrocitosis en varias estructuras del sistema nervioso central. En el caso de la rata *taiep*, también se ha mostrado que existe un incremento de la astrocitosis (León-

Chávez y cols., 2001) y de hecho las células gliales en cultivo responden más ante el lipopolisacárido (LPS) sugiriendo que han sido pre-sensibilizados en sus respuestas inmunes, seguramente debido a factores intrínsecos de la patología de la rata, o bien debido a las alteraciones en los mecanismos de transporte en los oligodendrocitos (Couve y cols., 1997), Duncan y cols., 1992).

Cabe la pena desatar, que la narcolepsia/cataplejia se presenta asociada a varias patologías del sistema nervioso central, como son el infarto cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, e inclusive en neoplasias del sistema nervioso central; muchas de ellas asociadas con trastornos de la mielina. Por lo que la rata *taiep* es un modelo adecuado para el estudio de esta patología del sueño MOR y su tratamiento. Recientemente Wilkins y cols., (2010) mostraron que en la rata *taiep* además de los trastornos de la mielina, se presentan placas con ovillos neurofibrilares similares a las que se presentan en la enfermedad de Alzheimer, por lo que la hace un modelo interesante para el estudio de las patologías del sistema nervioso.

DISCUSIÓN GENERAL

La rata *taiep* es un modelo adecuado para el estudio de las enfermedades crónicas de la mielina, ya que es un mutante de la mielina con una larga expectativa de vida, similar a la de una rata normal (\cong 2 años); a diferencia de otros mutantes de la mielina como es la rata deficiente de mielina (MD, myelin deficient), la cual tiene una sobrevivencia de tan solo 28 días (Hogan y Greenfield, 1984). Esta característica ha sido fundamental para poder realizar en el mutante *taiep* estudios electrofisiológicos, inmunológicos, de microestructura y los del sueño-vigilia como se muestra en este trabajo de tesis, en el cual se han analizado los trastornos del sueño-vigilia, de las inmovilidades y del tono muscular que presenta la rata *taiep* y el papel del sistema colinérgico en la inmovilidad.

Los presentes resultados muestran que la organización del ciclo sueño-vigilia a lo largo de las 24 h se encuentran alterados, con una distribución del sueño MOR; con mayor proporción en la fase de oscuridad, respecto de la fase de luz; mientras que esta diferencia es tá atenuada en las ratas Sprague-Dawley, lo que implica que los mecanismos de control circádico y/o los sitios de control hipotalámico y del tallo cerebral que controlan la vigilia, el SOL y el sueño MOR, así como sus transiciones se encuentran alterados en el mutante mielínico *taiep*. De hecho las ratas *taiep* muestran una disminución de las transiciones en las distintas fases del ciclo sueño-vigilia, por lo que sus duraciones medias son significativamente más largas.

Los hallazgos de la última década muestran que el estado de vigilia depende de manera importante de la actividad de las neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral (de Lecea y cols., 1998; de Lecea y Sutcliffe, 2005). La descarga de las neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral se sabe activan tanto a neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, como a neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe, así como de neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar (Hagan y cols., 1999; Nakamura y cols., 2000; Yamanaka y cols., 2002; de Lecea y Sutcliffe, 2005).

Estas tres estructuras y sus neurotransmisores promueven la vigilia. El registro simultáneo de EEG y de la actividad neuronal unitaria han podido mostrar que durante la vigilia se incrementa la actividad neuronal en el locus coeruleus, en los núcleos del rafe y en el núcleo tuberomamilar (Jones, 2005); mientras que disminuyen la frecuencia de sus potenciales de acción durante el SOL y se silencian durante el sueño MOR, por lo que a estas neuronas se les han denominado neuronas MOR-off (Hobson y cols., 1986; Fuller y cols., 2007).

Durante el SOL la estructura cerebral encargada de generar y mantener este estado son las neuronas GABAérgicas del área preóptica ventrolateral (POVL), ya que su mayor tasa de disparo se correlaciona con el SOL. Por otra parte, la lesión del POVL produce insomnio, tanto en animales como en humanos (Mignot y cols., 2002). Otra evidencia es que durante el SOL las neuronas GABAérgicas disminuyen su tasa de disparo por lo que sus efectos inhibitorios disminuyen sobre los grupos neuronales que mantienen la vigilia y esto a su vez promueve el SOL.

Por último, en el caso del sueño MOR, este es producido por la actividad de las neuronas colinérgicas de los núcleos pedúnculo-pontino (NPP) y el núcleo latero-dorsal (NLD) los cuales cambian el patrón de descarga en el tálamo, de uno tónico a un patrón en meseta, lo que cambiaría a su vez la actividad cortical hacia un patrón de sueño paradójico (Pace-Schott y Hobson, 2002). Cabe la pena destacar que en la rata, Luppi y cols., (2005) han propuesto que el núcleo sublaterodorsal (SLD) sería el responsable de gatillar el sueño MOR, esta estructura sería el equivalente del NPP/NLD del gato.

El sistema de operación con cambios en el estado de vigilia, hacia el SOL y las transiciones hacia el sueño MOR ha sido modelado como un circuito eléctrico tipo sube/baja o “*flip-flop*”, con cambios de estados dependientes de la activación de grupos neuronales específicos como se ilustra en la Figura 44.

Las estructuras cerebrales mencionadas se encuentran bajo la influencia de mecanismos fisiológicos que se encargan de la regulación y del control del sueño. Por una parte, existe un mecanismo homeostático que se encarga de regular el sueño considerando el tiempo previo en que el animal se mantuvo en vigilia, de tal forma que a mayor número de horas de vigilia se genera un incremento de la demanda de sueño (factor S); estas señales de control interaccionan con el reloj circadiano localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, que generan la oscilación diaria de los períodos de actividad y reposo (factor C) mediante la expresión de genes como son: los *Per 1-3*, *Tim*, *Cry 1 y 2*, *Clock*, *Bmal1* (Roenneberg y Merrow, 2003; Lakin-Thomas, 2006).

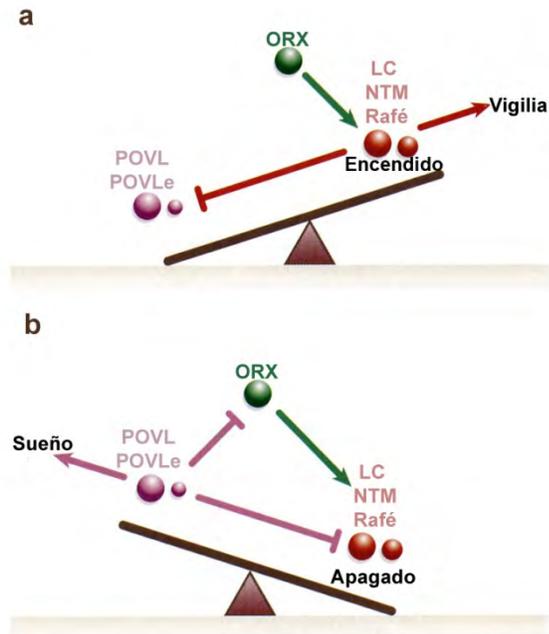


Figura 44. Diagrama del modelo sube/baja o “flip-flop”. El modelo propone que durante la vigilia **(a)** los núcleos monoaminérgicos inhiben al P OVL, a lo que se agrega el efecto de las neuronas orexinérgicas. Dado que el P OVL no tiene receptores para las orexinas solo se ve reforzado el tono monoaminérgico, manteniéndose así la vigilia. En **(b)** el disparo de las neuronas del POVL inhiben a los núcleos monoaminérgicos y a los núcleos orexinérgicos, esta inhibición monoaminérgica impide que se interrumpa el sueño. La inhibición mutua entre P OVL y los núcleos monoaminérgicos corresponde al modelo clásico “flip-flop” que produce las transiciones de la vigilia al sueño y viceversa (Modificado de Saper, 2006).

La cadena de traducción-transcripción genera las señales para mantener la ritmicidad cercana a las 24h en estas neuronas marcapaso, la cual se ajusta a través de la luz que impacta a los fotorreceptores de la retina, quienes, envían señales al núcleo supraquiasmático para ajustarlo a través del haz retino-hipotalámico (Zlomanczuk y Schwartz, 1999; Aguilar-Roblero y cols., 2004).

Considerando estos dos factores, que regulan la vigilia y el sueño, los trastornos del sueño pueden deberse a cambios en el ritmo circadiano (Factor C) o bien a cambios

en la demanda de sueño (Factor S) y deben por lo tanto ser evaluados considerando ambos componentes; así como las estructuras cerebrales que participan en dichos procesos. Por ejemplo, la lesión de las neuronas orexinérgicas perifornicales o de los receptores a orexinas producen narcolepsia, tanto en seres humanos como en modelos animales (de Lecea y cols., 1998; Lin y cols., 1999; Mieda y Yanagisawa, 2002); mientras que las lesiones del POVL producen insomnio (Lu y cols., 2000).

De hecho en perros narcolépticos, el modelo más estudiado, de este trastorno del sueño, se ha podido mostrar que el receptor a orexinas 2 está mutado; tanto en perros Doberman como Labrador, haciéndolo no funcional (Chemelli y cols., 1999). Por otra parte, en ratones carentes de ligando de la orexina o de sus receptores particularmente el tipo 2 (OX2), muestran un fenotipo de narcolepsia (Sakurai y cols., 1998; 1999; Sakurai, 2002), o bien, en ratas a las que se les lesionan las neuronas orexinérgicas empleando saponinas, las cuales producen muerte neuronal al internalizarse en las neuronas que poseen este tipo de receptores, lo que conduce a la expresión de narcolepsia (Gerashchenko y cols., 2001). De hecho las ratas lesionadas restauran su ciclo de actividad y reposo al ser transplantadas con tejido proveniente del hipotálamo lateral, el cual contiene neuronas orexinérgicas (Arias-Carrión y cols., 2004). Adicionalmente está el modelo de ratones que portan un fragmento de gen citotóxico denominado "ataxina-3"; estos animales pierden todas las células orexinérgicas postnatalmente y desarrollan los síntomas de narcolepsia en paralelo con la muerte de neuronas orexinérgicas.

Los resultados obtenidos en el mutante mielínico *taiep* muestran que la vigilia y el sueño se encuentran alterados, ya que el mutante muestra sueño MOR fragmentado en: s MOR, y episodios de inmovilidad, en los cuales el tono muscular oscila con patrones específicos. De hecho el porcentaje de sueño MOR de la rata Sprague-Dawley es muy similar a la suma del sueño MOR más los episodios de inmovilidad de las ratas *taiep* (Tabla 5).

La fragmentación del sueño MOR y la actividad electroencefalográfica durante los episodios de inmovilidad, sugieren que el mutante *taiep* es un modelo animal adecuado de trastorno del sueño como la narcolepsia/cataplejía.

Esto implica que los mecanismos que generan el sueño MOR, es decir, la sincronía tálamo–cortical cambian debido a que el patrón de descarga de las neuronas reticulares intralaminares del tálamo, las cuales pasan, desde un tipo de descarga tónica hacia uno de tipo meseta (Llinás y Steriade, 2006). Adicionalmente, la descarga de las neuronas de los núcleos TPP/TLD activan neuronas de la parte medial del bulbo raquídeo, en la formación reticular del bulbo, particularmente en su porción gigantocelular, las cuales proyectan hacia la médula espinal a través de vías mielinizadas, con velocidades de conducción de $\cong 120$ m/s, donde activan interneuronas espinales GABAérgicas, las cuales son las encargadas de producir la inhibición de la descarga de las motoneuronas durante el sueño MOR (Chase y cols., 1989; Chase, 2008); o bien por cambios en la actividad excitatoria de las vías descendentes a través de receptores glutamatérgicos.

Dado que en la rata *taiep* se producen además de sueño MOR, los episodios de inmovilidad; estos hallazgos sugieren que existe una desregulación entre las estructuras que comandan en el tallo cerebral el sueño MOR, de aquellas responsables de la atonía muscular (Chase y cols., 1989; Luppi y cols., 2005).

Estos hallazgos implican que el transporte intracelular de las proteínas y los ARN mensajeros en los oligodendrocitos de la rata *taiep* están alterados y producen una pérdida de la mielina de manera progresiva. Adicionalmente, la acumulación de microtúbulos en el citoplasma y los procesos de los oligodendrocitos en ratas *taiep* alteran los mecanismos de transporte constitutivo o regulado de las proteínas desde el retículo endoplásmico hacia la porción Cis del aparato de Golgi; lo que impide el mantenimiento normal de la mielina (Duncan y cols., 1992; Couve y cols., 1997; Duncan y Hoffman, 1997) y por ende de la relación estructura y función como se ha mostrado en el nervio óptico, donde hemos podido correlacionar la estructura de la mielina con la transmisión del potencial de acción compuesto (Roncagliolo y cols., 2006).

En el caso del nervio óptico es claro que el proceso de desmielinización altera de manera importante el potencial de acción compuesto (PAC) y que este presenta un deterioro progresivo de la velocidad de conducción y de la estructura de su mielina, producto de la desmielinización progresiva, las cuales se recuperan con la perfusión en el baño de 4-aminopiridina (4-AP), un inhibidor de los canales de potasio rápidos (Roncagliolo y cols., 2000). Las ratas *taiep* muestran también en un tercio de los animales ausencia de los reflejos monosinápticos, los cuales se restauran también con la administración sistémica de 4-AP (Morales, 2000). Lo mismo sucede con los

potenciales provocados auditivos, somatosensoriales y visuales, los cuales alteran su morfología debido a que la transmisión de los potenciales de acción es asincrónica (Roncagliolo y cols., 2006), lo cual puede ser responsable, al menos en parte, de las alteraciones motoras de este mutante (Anch y Laposky, 2000), y del aumento del ángulo de sustentación de las extremidades para sostener el cuerpo del animal (Powell cols., 1999) como un mecanismo de adaptación a la pérdida progresiva de la mielina y sus consecuencias en el sistema motor.

Adicionalmente, la transmisión sináptica entre las fibras Ia provenientes de husos musculares y las motoneuronas, así como de la vía de Schaffer y las neuronas piramidales del cerebro de A⁺món, muestran que los potenciales postsinápticos excitatorios (PPEs) tienen un alto grado de asincronía, que alcanza hasta un 40% de los eventos, lo que refuerza lo antes expuesto (Bonansco y cols., 2004; 2007). Esta asincronía genera que no exista una correspondencia entre los estímulos aferentes y la generación de los potenciales de acción postsinápticos. Esta falta de correspondencia entre la entrada y la salida en estas vías, probablemente esté presente en otras vías de transmisión sináptica en la rata *taiep*, ya que la pérdida de la mielina sucede en todo el SNC del mutante, con mayor afectación en las vías con mielinización tardía (Duncan y cols., 1992; O'Connor y cols., 2000; Lunn y cols., 1997, véase Figura 45).

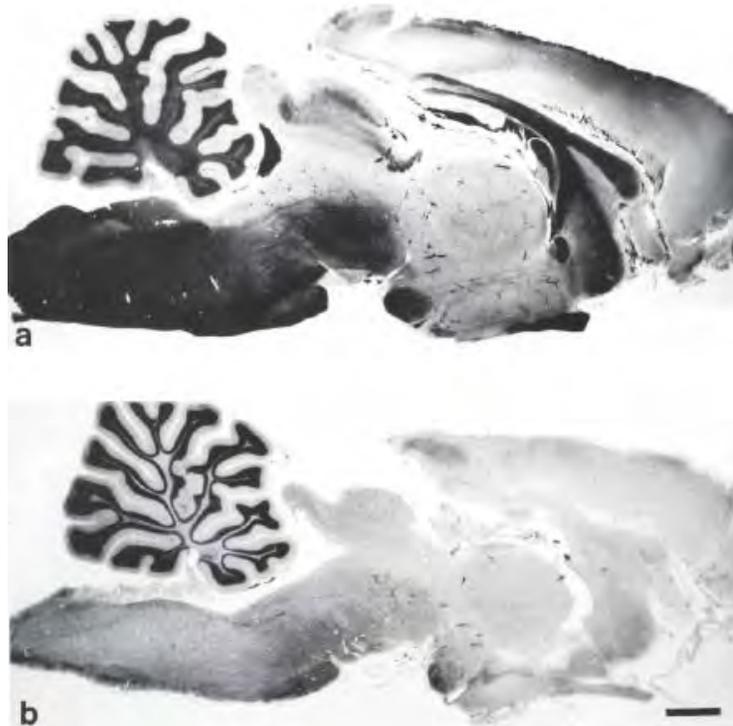


Figura 45. Corte sagital de cerebros de rata Sprague-Dawley y taiep. En a) el cerebro de una rata Sprague-Dawley al año de edad, en b) el cerebro de una rata *taiep*, note la disminución en la tinción de la mielina en el cerebro de la rata *taiep* (b), principalmente en la región del tallo cerebral. Tinción de Heidenhain. Cal= 1.0 mm. (Tomado de Duncan y cols., 1992).

Dadas las características de mielinización peculiares del velo del cerebelo, se ha empleado esta estructura para el análisis de las alteraciones del proceso de mielinización en el mutante. El velo del cerebelo es una estructura de forma más o menos romboidal con tres áreas principales. En la porción caudal se encuentran primordialmente axones gruesos mielinizados tempranamente y por oligodendrocitos tipo III y IV; la porción intermedia corresponde al IV par craneal, mielinizado tempranamente, y el cual está poco afectado en las ratas *taiep*; y la porción anterior en donde la mayoría de sus axones son delgados y están mielinizados tardíamente y por oligodendrocitos tipo I y II (Song y cols., 2001). Dado que los oligodendrocitos III y IV

mielinizan tempranamente formando axones gruesos y por ende con altas velocidades de conducción; a diferencia de las vías de mielinización tardía, esto es las que suceden en las últimas etapas embrionarias y posnatal temprana, las cuales son mielinizadas preferentemente por oligodendrocitos tipo I y II; por lo que la porción rostral del velo se mieliniza tempranamente y la porción caudal tardíamente. En la rata *taiep* es la porción caudal la más afectada, así como otras vías de mielinización tardía como son: el nervio óptico, el haz gracilis de las columnas dorsales y la vía corticoespinal, indicando que existe cierta especificidad en las alteraciones de la mielina en la rata *taiep* (Figura 46; Song y cols., 2001; Couve y cols., 1997; Lunn y cols., 1997; Roncagliolo y cols., 2006).

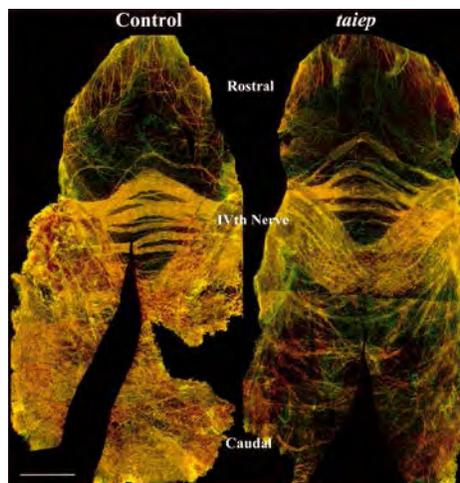


Figura 46. Deficiencias de mielina en el velo anterior del cerebelo en la rata *taiep*. En la rata *taiep* se ve reducida la tinción para mielina (amarillo) en comparación con el control. El inmunomarcaje para los axones de pequeño calibre fue poco, y en los axones de mayor calibre fue discontinuo. Barra de calibración 5, 500 mm.

Con base en los procesos de mielinización del mutante, es posible que las estructuras comando en el tallo cerebral que generan los estados de sueño-vigilia no se transmitan sincrónicamente, como se ha demostrado en la médula espinal, en el

hipocampo y en los potenciales provocados (Bonansco y cols., 2007; Roncagliolo y cols., 2006).

En el caso del sueño, es por tanto altamente probable que los mecanismos neuronales que gatillan tanto el sueño MOR, como el SOL, así como la vigilia funcionen con una dinámica diferente en el mutante; y a que las ratas *taiep* tienen un menor número de episodios de vigilia y del SOL y MOR, pero de una duración media mayor, lo que implica una dificultad en la rata *taiep* para transitar entre los distintos estadios de conciencia. En el caso del sueño MOR en ratas Sprague-Dawley adultas jóvenes (2 a 3 meses); se ha reportado un porcentaje mayor de sueño MOR en la fase de luz (Borbély y Neuhaus, 1979).

Las ratas macho Sprague-Dawley de 8 meses de edad muestran una distribución homogénea del sueño MOR en las fases de luz y oscuridad; 5.6% en la fase de luz, respecto de 9% en la fase de oscuridad.

En el caso de la rata *taiep* tiene una distribución porcentual de 2.6 % en la fase de luz y de 8.9% en la de oscuridad, por lo que tiene una disminución significativa del sueño MOR en la fase de luz en el mutante (Tabla 10).

Adicionalmente, las ratas *taiep* muestran episodios de inmovilidad en los cuales las características del electroencefalograma son similares a las del sueño MOR (Cortés y cols., 2005). Cabe la pena destacar que durante los episodios de inmovilidad se

presentan tres patrones con base a los cambios del tono muscular, siendo este el criterio para definirlos (véase Figura 34).

Tabla 10. Porcentajes de sueño MOR y episodios de inmovilidad en ratas Sprague-Dawley y *taiep*.

	MOR (%)			Els (%)			Total (%)		
	luz	oscuridad	24 h	luz	oscuridad	24 h	luz	oscuridad	24 h
Taiep	2.6	8.9	11.5	2.1	1.4	3.5	4.7	10.3	15.0
Sprague-Dawley	5.6	9.0	14.5	--	--	--	5.6	9.0	14.6

Los porcentajes de sueño MOR se expresan porcentualmente respecto al tiempo total de sueño. *Taiep* (n=6); Sprague-Dawley (n=7). Note que la sumatoria de sueño MOR y los episodios de inmovilidad en la rata *taiep*, es muy similar al sueño MOR de la rata Sprague-Dawley.

Los episodios de inmovilidad son semejantes a los eventos que presentan los perros narcolépticos Doberman-Pinscher o los ratones que carecen del gen de la prepro-orexina o de sus receptores, en particular el tipo 2 (OX2), (Mileykovskiy y cols., 2005; Chemelli y cols., 1999; Willie y cols., 2003; Sakurai y cols., 1999, 1998; Hara y cols., 2001).

De hecho el grupo del Dr. Emmanuel Mignot en la Universidad de Stanford, también ha caracterizado conductual y electrofisiológicamente distintos grados de cambio del tono muscular en los perros narcolépticos durante los episodios de cataplejía, los cuales, pueden ser completos o incompletos (Riehl y cols., 1998). De éstos últimos, existen episodios de cataplejía en donde se pierde el tono muscular solamente en la cabeza, o solo en los cuartos traseros, o pérdida del tono muscular en

las extremidades anteriores y posteriores quedando el animal echado. Esto indica que en la cataplejía de los perros Doberman-Pinscher también se presenta con cambios del tono muscular parciales de manera similar a lo reportado en esta tesis para la rata *taiep* (Eguibar y cols., para ser sometido a consideración editorial). Estudios clínicos también han reportado cataplejías completas o incompletas (Peyron y cols., 2000), por lo que los cambios de tono muscular son variables en aquellos afectados de narcolepsia-cataplejía (Riehl y cols., 1998), probablemente por variaciones en la tasa de disparo de las vías descendentes que excitan o inhiben a las motoneuronas. De hecho es claro que durante los episodios de sueño MOR existe atonía comandada principalmente por potenciales inhibitorios glicinérgicos (Chase, 2008) y fásicos que se deberían a efectos excitatorios e inhibitorios.

Estos hallazgos apuntan a que los mecanismos que controlan los cambios del electroencefalograma se disocian de aquellos que se encargan del tono muscular, como lo hemos propuesto en esta tesis. Esta disociación probablemente se debe a una falta de sincronización en la transmisión de los potenciales de acción desde los generadores hacia las estructuras comando, lo cual hemos mostrado en el caso de los potenciales provocados por diferentes modalidades sensoriales y en los potenciales motores producidos por estimulación cortical (Roncagliolo y cols., 2000). Estos hallazgos deberán ser corroborados mediante el registro unitario en las estructuras responsables de generar el sueño MOR y del sueño SOL o bien a través del inmunomarcaje de proteínas que se producen por la actividad neuronal como puede ser la proteína *C-Fos*. En la rata la estructura a evaluar sería el núcleo sublaterodorsal para el caso del sueño MOR (Luppi y cols., 2005). De hecho, en nuestro laboratorio, se ha

mostrado que el ritmo circadiano de actividad locomotora y de ingestión de agua es también presente en la rata *taiep* (Toriz y cols., 2005) y responde a los cambios de iluminación medio ambientales, de tal forma que en condiciones de oscuridad constante muestran libre corrimiento en su actividad locomotora y en la ingestión de agua (Ita, 2011). Estos hallazgos indican que los ritmos circádicos están operando adecuadamente en el mutante mielínico *taiep* y que las variaciones del ciclo sueño-vigilia podrían deberse a las alteraciones en las estructuras del diencefalo y/o del tallo cerebral encargadas de controlarlo. Cabe la pena destacar que la privación de sueño total por estimulación táctil suave empleando una barra de acrílico, se obtiene un rebote de sueño MOR y de los episodios de inmovilidad (Ita y cols., 2006); lo que indica que los mecanismos de control homeostáticos a nivel del SNC operan y generan las señales de control adecuadas; las cuales deben ser transmitidas al resto del sistema. Es entonces muy probable que la transmisión sea inadecuada, pudiendo ser asincrónica, hacia las estructuras que se encargan de relevar y controlar tanto la actividad cortical, en el tálamo y tallo cerebral y/o a nivel de la médula espinal en el caso de la atonía muscular. De hecho el control de la actividad de las motoneuronas y sus respectivas unidades motoras se ve profundamente alterado durante los episodios de inmovilidad, adicionalmente, la rata *taiep* muestra reflejos monosinápticos alterados, los cuales no responden adecuadamente a la estimulación iterativa (Roncagliolo y cols. 2002). Estas alteraciones se restauran con la administración sistémica de 4-AP (Morales, 2000); una situación similar a lo que sucede en el nervio óptico donde la 4-AP recupera la morfología del potencial de acción compuesto y al menos en parte de su velocidad de conducción (Roncagliolo y cols., 2006).

En esta tesis se describen tres subtipos de cambios de la actividad del electromiograma de los músculos de la nuca asociados a los episodios de inmovilidad, pero todos ellos tienen como característica común que el electromiograma oscila, y debemos considerar que el nivel de tono es la expresión final de la actividad de todas las unidades motoras (Henneman, 1980). Estos hallazgos sugieren que los circuitos neuronales espinales que controlan la actividad de las motoneuronas oscilan durante los episodios de inmovilidad y/o que las estructuras descendentes que controlan el tono muscular cambian a lo largo del episodio de inmovilidad. El grupo de Mori y sus colaboradores, (Mori y cols., 1995; Mori, 1999), han mostrado que a nivel del puente existen dos grupos neuronales: el campo tegmental dorsal y el campo tegmental ventral que son capaces de abatir o incrementar el tono muscular, respectivamente. De hecho el mismo Mori y cols. (Mori y cols., 1995; Mori, 1989; véase Figura 47) han mostrado que el campo tegmental ventral corresponde a la porción más rostral del núcleo del rafe magno, de naturaleza serotoninérgica (Halliday y cols., 2005), la estimulación de lo mismo incrementa el tono muscular, aún en animales libres de anestesia y deambulando (Mori, 1987); y estos cambios en las propiedades biofísicas de las motoneuronas que transitan a otro estado estable en forma de meseta, el cual se acompaña de espigas de calcio sobre la meseta, por lo que ha sido denominado biestabilidad por el grupo danés de Hounsgaard (1988). Estos cambios de la actividad neuronal se correlacionan con los del tono muscular y podrían participar en los cambios de tono muscular durante los episodios de inmovilidad como se ha mostrado en esta tesis. De hecho la susceptibilidad a mostrar episodios de inmovilidad es espontánea o inducidos por manipulación disminuyen por la administración sistémica de \pm (DOI), un agonista serotoninérgico postsináptico del subtipo 5HT_{2A/2C} (Eguibar y cols., 2009); y es

el caso de los inducidos por manipulación con la administración de agonistas para el subtipo de receptor $5HT_{1a}$ y $5HT_{1b}$ (Ita y cols., 2009).

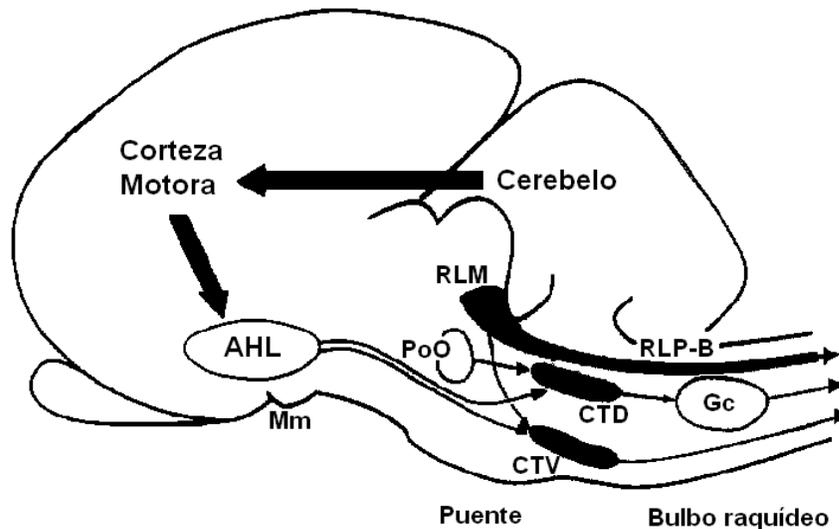


Figura 47. Estructuras involucradas en la regulación de la postura y la locomoción. Principales áreas de la región locomotora. Las neuronas del núcleo reticular pontis oralis (PoO) proyectan hacia el CTD y hacia la médula espinal con proyecciones del Gc. Las neuronas del AHL proyectan axones descendentes hacia el CTD y el CTV. Área hipotalámica lateral, AHL; región locomotora mesencefálica, RLM; campo tegmental dorsal, CTD; campo tegmental dorsal, CTV; Núcleo reticular gigante celular, Gc; núcleo reticular pontis oralis, PoO (Modificado de Mori, 1987).

La presencia de serotonina a nivel espinal lumbar aunado a una estimulación aferente adecuada produce biestabilidad en las motoneuronas extensoras, tanto en preparaciones *in vitro* como *in vivo* (Hounsgaard y cols., 1988). La suma de los estímulos, produce descargas en meseta con espigas de calcio sensibles a dihidropiridinas (Perrier y Hounsgaard, 2003). Estos cambios en el patrón de descarga en las motoneuronas producen un incremento importante del nivel de actividad electromiográfica y son probablemente los responsables de los cambios abruptos del

tono muscular durante las transiciones en el sueño y/o la vigilia, y probablemente se expresen durante los episodios de inmovilidad que muestran las ratas *taiep*, dada la hipertonía extensora y la retracción muscular facial, producto de la actividad muscular sostenida como se mostró previamente (Cortés y cols., 2005).

También se mostró, en el caso de los episodios de inmovilidad espontáneos, que estos muestran una distribución homogénea a lo largo de las 24 h (Cortés y cols., 2005); mientras que los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación muestran dos picos de incremento de susceptibilidad, el primero en la transición de la fase de luz hacia la oscuridad y un segundo pico a la mitad de la fase de oscuridad (Cortés y cols., 2005). Existe una correlación importante entre la desmielinización y la susceptibilidad a mostrar episodios de inmovilidad inducidos por manipulación, ya que muestran un pico entre los 7 y los 9 meses de edad, a partir de esta fecha decrecen progresivamente, lo que quizá se deba a cambios en los sistemas neurotransmisores y/o peptidérgicos involucrados en producir episodios de inmovilidad y/o en la transmisión de potenciales de acción producto de la desmielinización (Lunn y cols., 1997). De hecho los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación se incrementan por la administración sistémica de prazosina un antagónista α_1 noradrenérgico (Cortés y cols., 2007), tal y como sucede en los perros narcolépticos (Mignot y cols., 1988); y en los humanos en los cuales la prazosina (Minipress®) está contraindicada, porque puede inducir inclusive un estado de cataplejía constante denominado "*status cataplexicus*" (Aldrich y Rogers, 1989). Por otra parte, la administración de antagónistas α_2 noradrenérgicos como la yohimbina, abol en los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación, y se

incrementan con la administración de agonistas α_2 (Eguibar y cols., 2006). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura en perros y humanos en los cuales agonistas α_2 incrementan la cataplejía. Por otra parte, la administración de agonistas dopaminérgicos del subtipo D_2 como el quinpirol o del subtipo D_3 como el 7-OH-DPAT o el (\pm) PD-128907, incrementan los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación y el sulpiride, un antagonista D_2 , los incrementa (Eguibar y cols., 2010). En perros narcolépticos también la cataplejía se incrementa por la administración de agonistas dopaminérgicos (Honda y cols., 1999; Nishino y cols., 1991).

La exploración farmacológica del sistema serotoninérgico mediante la administración de agonistas y antagonistas serotoninérgicos de los subtipos $5HT_{1a}$, $5HT_{1b}$ o bien de la familia $5HT_{2a/2c}$ disminuyen los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación (Ita y cols., 2009; Eguibar y cols., 2009; Tabla 11).

Adicionalmente, se exploró el rol de la acetilcolina en los episodios de inmovilidad inducidos por manipulación con los agonistas colinérgicos que inducen cataplejía en los perros narcolépticos, los cuales actúan preferentemente, sobre los receptores muscarínicos tipo 2 (M_2), responsables de incrementar la cataplejía (Delashaw y cols., 1979; Reid y cols., 1994 a y b). En el caso de la rata *taiep* los resultados con la administración de agonistas colinérgicos no corresponden con lo reportado en los perros narcolépticos. Probablemente debido a la alta incidencia de efectos colaterales como son: la sialorrea, piloerección, micción y defecación en la rata *taiep*. Esto es, las ratas *taiep* muestran un cierto grado de hipersensibilidad a la acción

de las drogas colinérgicas. Cabe la pena destacar que las ratas *taiep* fueron obtenidas de una mutación espontánea durante el proceso de selección de las ratas HY (high-yawning, por sus siglas en inglés) (Urbá-Holmgren y cols., 1990; Holmgren y cols., 1989). Las ratas HY muestran cambios en su respuesta a la acción de drogas colinomiméticas, siendo más sensibles a la fisostigmina que las ratas de bajo bostezo LY (del inglés low yawning; Urbá-Holmgren y cols., 1993), por lo que es plausible que las ratas *taiep* muestren también respuestas diferentes ante la administración de agonistas y antagonistas colinérgicos. En este sentido, el incremento de las inmovilidades inducidas por manipulación con el doncepecilo, el cual inhibe selectivamente a la acetilcolinesterasa, lo que apunta a que la acetilcolina tiene un rol en el control de la cataplejía en la rata *taiep*. Es necesario en el futuro inmediato explorar además la acción del carbacol administrado a nivel del puente y valorar sus efectos sobre los episodios de inmovilidad espontáneos e inducidos por manipulación, dado que este agente colinérgico incrementa el sueño MOR. La predicción es que, existirá un incremento sostenido de los episodios de inmovilidad, siendo necesaria la evaluación neuroquímica de los niveles de acetilcolina y de sus receptores en este mutante.

Tabla 11. Efecto de agonistas y antagonistas de neurotransmisores involucrados en la narcolepsia-cataplejía en la rata *taiep*.

Neurotransmisores		Efecto en la narcolepsia-cataplejía
Dopamina	Agonistas	incrementan
	Antagonistas	disminuyen
Noradrenalina	Agonistas	incrementan
	Antagonistas	disminuyen
Serotonina	Agonistas	disminuyen
	Antagonistas	incrementan
Acetilcolina	Agonistas	incrementan
	Antagonistas	disminuyen

CONCLUSIÓN

En conclusión, las cataplejías inducidas por manipulación en la rata *taiep* muestran un perfil farmacológico similar al de los perros narcolépticos, considerando las vías noradrenérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas, sin embargo para el caso del sistema colinérgico muestran hipersensibilidad a estas drogas. Por otra parte, la rata *taiep* es un modelo adecuado para el estudio de los trastornos del sueño MOR y es único en el sentido de que, una enfermedad desmielinizante es el sustrato de las alteraciones del ciclo sueño-vigilia y de los cambios del tono muscular, como se ha mostrado en este trabajo de tesis de doctorado. Por lo que la rata *taiep* es un buen

modelo para el estudio de la narcolepsia-cataplejía asociada a la desmielinización del SNC.

En otras patologías del SNC en humanos, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Newmann-Pick tipo C y la esquizofrenia, cursan con alteraciones importantes del sueño MOR asociados a cataplejas con diferentes sustratos neuronales (Nishino y Kanbayashi, 2005). Es claro que las alteraciones del sueño MOR en el mutante de mielina *taiep*. De hecho en un trabajo reciente de Wilkins y cols., (2010) se muestra que el mutante es similar a la esclerosis ya que muestran placas de desmielinización.

Esto es, pueden existir hiposomnolencias y alteraciones del sueño MOR en distintas patologías degenerativas del SNC, siendo la rata *taiep* un mutante de la mielina con una expectativa de vida larga, es pertinente evaluar con detalle el progreso de la desmielinización en las distintas estructuras cerebrales, particularmente en el hipotálamo y en el tallo cerebral, a lo largo del primer año de vida para determinar los sustratos que producen las alteraciones del sueño MOR y del tono muscular y su correlación con cambios en la estructura de los ritmos circadianos y del ciclo sueño-vigilia en el mutante.

PERSPECTIVAS

1. Completar el estudio neuroanatómico de la mielina central a lo largo del primer año de vida.
2. Analizar neuroquímicamente el sistema colinérgico de la rata *taiep*, así como el papel de las orexinas en los trastornos del sueño e inmovilidad.
3. Evaluar el efecto del factor "S" y del factor "C" sobre el rebote del sueño.
4. Analizar los ritmos circadianos de actividad locomotora e ingestión de agua en la rata *taiep*.

APÉNDICE “A”

Inmovilidad

Históricamente el reflejo de inmovilidad (RI) ha sido motivo de estudio por neurólogos, fisiólogos, zoólogos, psicólogos, psiquiatras y aún teólogos. Ya los Egipcios tenían cierto culto a las serpientes encantadas, como las que ahora se encuentran en la India. También se hace referencia en la Odisea a trances que se inducían en animales o personas con ciertos movimientos repentinos. El Talmud se refiere a la inmovilización de lagartos, de escorpiones y de víboras para protegerse de estas criaturas venenosas (Klemm, 1971 a; Klemm, 1990).

Por mucho tiempo se propuso que la paradoja de la función del tallo cerebral era que por una parte mediaba la entrada de estímulos para la preparación a actos motores; y por el otro bajo ciertas condiciones de estimulación, que se describieren más adelante, el organismo desplega una conducta de inmovilidad conductual, de carácter activo (Klemm, 1990).

La conducta de inmovilidad, ha sido descrita en contextos tanto naturales, como experimentales. A esta conducta también se le ha llamado; conducta de congelamiento, catalepsia o muerte fingida. El rasgo común a todas estas conductas es la presencia de la *inmovilidad activa*. Klemm (1971 a), describe la inmovilidad activa como un estado de akinesia; en el cual se presenta una incapacidad para iniciar el movimiento y para que

se presente se requiere un grado mínimo de tono muscular, para mantener ciertas posturas.

Entre las conductas de inmovilidad activa, puede mencionarse la que se induce con un estímulo visual, por ejemplo, la que se presenta cuando un venado se queda quieto ante las luces de un automóvil. La estimulación de la piel produce también inmovilidad activa y esto lo podemos ver claramente en la conducta de acarreo de los cachorros de félidos y cánidos, o bien en ratas (Figura 1).

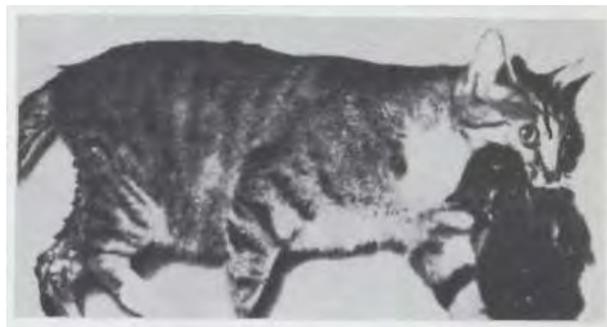


Figura 1. Conducta de acarreo. Se muestra la conducta de acarreo en el gato, durante la cual los cachorros presentan inmovilidad activa. (Modificado de Klemm, 1990).

Otro grupo de términos ha sido usado para referirse a la inmovilidad que es producida solo por manipulación e incluye: hipnosis animal, inmovilidad tónica, reflejo de inmovilidad o inmovilidad fásica; debido a que este estado solo dura de pocos segundos a unos minutos (Klemm, 1990).

Klemm (1971 a) define el reflejo de inmovilidad como un estado reversible de profunda inmovilidad cataleptica y una relativa incapacidad para responder a los

estímulos del medio ambiente, que se presenta tanto en vertebrados como en invertebrados; y cuyo estado puede ser experimentalmente inducido por restricción o por fijación visual. Considera que el término de inmovilidad es el más adecuado debido a que es la característica conductual que destaca más y pertenece a un estado que es reversible. Esta conducta es estereotipada e involuntaria en respuesta a un estímulo específico, como es la sujeción cuando se ponen en decúbito dorsal al sujeto (Figura 2).

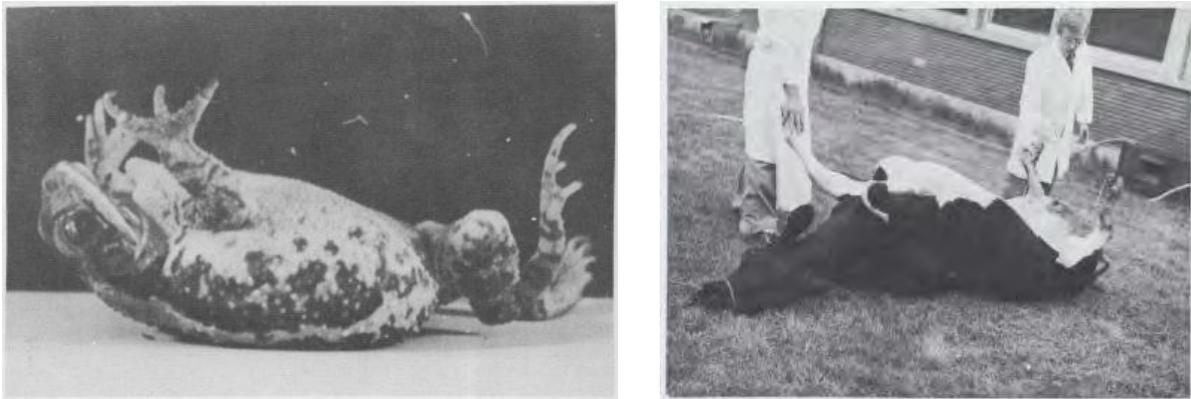


Figura 2. Reflejo de inmovilidad. Se puede ver la postura adoptada durante el reflejo de inmovilidad activa en un anfibio y un mamífero (Modificado de Klemm, 1990).

Inducción del reflejo de inmovilidad.

Existen varios métodos para inducir el reflejo de inmovilidad, que van desde la simple fijación de la mirada hasta sujetar el cuerpo del animal, generalmente en decúbito dorsal. El método para inducir inmovilidad en la gallina involucra restricción, esto es fijar su cabeza contra una superficie plana; y utilizando un objeto en el que fije su atención.

Otro método utiliza la estimulación visual o la táctil que involucra movimientos ondulatorios con las manos, como sería el caso de las cobras y los encantadores de serpientes; o la estimulación repetitiva que se realiza al balancear al animal hacia atrás y hacia delante (Klemm, 1971 a).

El método más utilizado es el de la inversión repentina que se caracteriza por una estimulación gravitacional y táctil, colocando al animal en decúbito dorsal y estirándolo; sin embargo, aunque se utilice un solo método de inducción de inmovilidad el tono muscular puede variar entre las distintas especies estudiadas (Klemm, 1971 a, b).

Como puede observarse existen varios métodos para inducir la inmovilidad, sin embargo de acuerdo a Gilman y Marcuse (1949) estos se pueden agrupar en cuatro grandes grupos:

- 1) Inducción por estimulación repetitiva
- 2) Inducción por presión de ciertas partes del cuerpo
- 3) Inducción por inversión
- 4) Inducción por restricción
- 5) Inducción farmacológica

La restricción del animal unida a una estimulación táctil y propioceptiva pueden desencadenar condiciones con características visibles que se presentan en el reflejo de inmovilidad, aunque no precisamente todas estas características se tienen que presentar en un mismo episodio:

- 1) pérdida de la posición erecta y de los reflejos de soporte postural
- 2) cambios en el tono muscular.
- 3) temblor fino de las extremidades que pueden incluso ser de tipo clónico.
- 4) ojos abiertos e inmóviles.
- 5) incremento o disminución de la frecuencia cardíaca y respiratoria.

Hipótesis sobre la inmovilidad.

La primera hipótesis se relaciona con el empleo del término “*muerte fingida*” que se atribuyó a la presencia de inmovilidad en circunstancias de temor, este fenómeno tuvo significado evolutivo y fue considerado como un mecanismo de defensa contra los depredadores; debido a que la inmovilidad se presentaba en los animales cuando enfrentaban situaciones de peligro extremo, que pone en riesgo la vida (Klemm, 1971 a, b).

La segunda hipótesis se basa estrictamente en la fisiología de los reflejos. Esta hipótesis sostiene que ciertos patrones de estímulos; particularmente los táctiles y los propioceptivos, ante la inducción manual, activen un grupo de neuronas inhibitorias a nivel del tallo cerebral (Klemm, 1976).

En el campo de la fisiología se han realizado estudios para elucidar las estructuras cerebrales involucradas en el reflejo de inmovilidad. Así Klemm (1990) reporta resultados experimentales al efectuar secciones caudales y progresivas de todo el tallo cerebral hasta la parte más caudal del bulbo raquídeo en ranas, localizando que

la influencia inhibitoria procede de la formación reticular medial, como la estructura más importante de la inhibición generalizada, suficiente para iniciar y mantener el reflejo de inmovilidad.

Por otra parte, el sistema que controla los reflejos posturales se encuentra localizado en el bulbo raquídeo y en la médula espinal, recordando que las influencias inhibitorias son descendentes y directas hacia la médula espinal, desde las regiones inhibitorias del tallo cerebral.

El mismo Klemm (1965), mostró que la estimulación eléctrica en el tallo cerebral inducía un reflejo de inmovilidad, pero este se potenciaba cuando las regiones estimuladas eran la región pontina y/o la formación reticular bulbar (Klemm, 1965).

Por otra parte, Magoun y Rhines (1946) demostraron que la estimulación en grandes regiones de la formación reticular medial abolía la actividad muscular tónica y la respuesta refleja bilateral en el gato descerado. De tal forma que cuando los movimientos corporales son inhibidos, existe un incremento en la actividad de ciertos grupos de neuronas, por lo que Klemm (1971) propone que este grupo de neuronas son inhibitorias, las cuales actúan sobre sistemas excitatorios descendentes los cuales a su vez inhiben a las motoneuronas espinales a través de interneuronas. Klemm (1971 b), revela que el incremento en la actividad unitaria múltiple en el bulbo raquídeo durante un reflejo de inmovilidad también ocurre durante cualquier movimiento de cabeza o de las extremidades, de manera similar a lo que sucede también espontáneamente al despertar. Sin embargo, los movimientos y el incremento unitario también coincide con

un cambio hacia el ritmo theta en el hipocampo. Lo cual sugiere que la formación reticular es el origen de una mezcla de influencias descendentes inhibitorias y excitatorias como se muestra en la Figura 3.

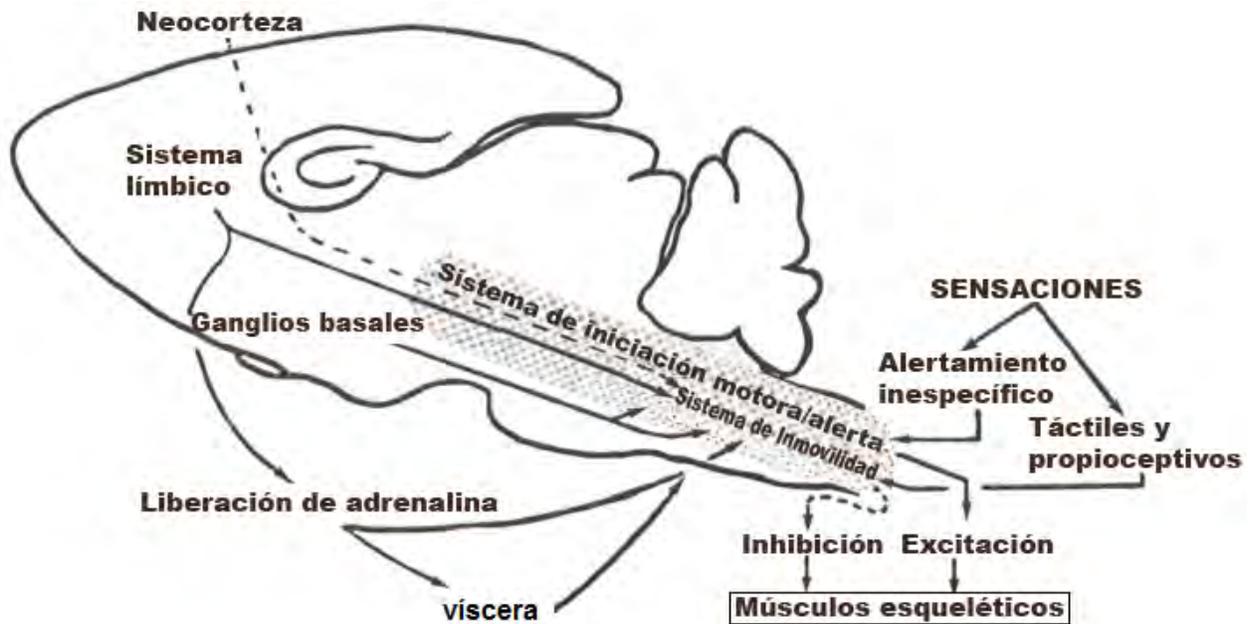


Figura 3. Modelo de los mecanismos sensoriales y motores que activan la inmovilidad activa. La figura muestra las entradas sensoriales y propioceptivas que activan el sistema reticular ascendente o el sistema que controla la inmovilidad. Estos estímulos llegan también al sistema límbico, el cual actúa a través de la liberación de noradrenalina. Con líneas punteadas se marca la influencia antagonista de la corteza hacia estas respuestas. La respuesta de salida de la información reticular puede activar por una parte la inhibición, o por otra a activar los sistemas motores. Note que es en el tallo cerebral donde coexisten ambos sistemas de activación o de inhibición en las motoneuronas (Modificado de Klemm, 1990).

Klemm (1971a) demostró que durante el reflejo de inmovilidad la actividad electroencefalográfica puede ser de dos tipos, una de ellas con una actividad rápida en la corteza cerebral de baja amplitud y ritmo theta en el hipocampo; el otro tipo que sería

con una actividad lenta e irregular de alto voltaje en la corteza cerebral y ritmo theta en el hipocampo (Klemm, 1971 a, b; Rakshit y Klemm, 1980).

Green y Arduini (1954) fueron de los primeros en mostrar que durante la vigilia el hipocampo presenta descargas rítmicas de 5–9 Hz y a este ritmo se le llamó “*ritmo theta*”. Posteriormente Vanderwolf y su grupo (1975), describieron dos tipos de ritmo theta. El tipo I (theta alto) para el ritmo theta que se presentaba durante la vigilia, cuando el animal realiza movimientos voluntarios como lo es caminar o correr y cuya frecuencia se presenta de 6 a 12 Hz, y el tipo II (theta bajo) que se presenta durante la inmovilidad con una frecuencia de 4 a 9 Hz (Kramis y cols., 1975).

El desarrollo de las técnicas electroencefalográficas y los descubrimientos de Moruzzi y Magoun (1949) abrieron un nuevo campo en la investigación de los sistemas que se activan durante la vigilia. Ellos mostraron que la estimulación eléctrica de la zona medial del tallo cerebral producía un estado de alertamiento cortical caracterizado por actividad rápida de bajo voltaje. Propusieron así, que el sistema activador ascendente, estaba localizado en la formación reticular, extendiéndose por la línea media del tallo cerebral que abarca tanto al bulbo raquídeo como al puente (Steriade, 1996). La formación reticular es una zona de relevo y de integración para la mayoría de las entradas sensoriales, la información es transmitida a los núcleos talámicos y de aquí hacia la corteza cerebral (Hobson y cols., 1986).

Rhines y Magoun (1946) observaron que la estimulación de la formación reticular, desde el bulbo raquídeo hasta el hipotálamo y el tálamo incrementaba la

amplitud de los movimientos inducidos por la estimulación. Posteriormente Magoun (1948), demostró que lesionando la formación reticular inducía el estado de coma en monos, lo que reforzaba su propuesta de que este sistema reticular activador ascendente producía la vigilia.

Experimentos realizados por Mori (1989) en gatos en libre movimiento mostraron que la estimulación eléctrica del campo tegmental dorsal suprime el soporte postural, es decir, se pierde el tono muscular completamente. En contraste, cuando se estimula el campo tegmental ventral el gato se pone de pie y si se continúa con la estimulación eléctrica se induce la marcha de forma rígida; como el denominado paso alemán. Por otra parte, la estimulación de la región locomotora mesencefálica puede inducir marcha lenta, marcha rápida, trote y galope; dependiendo de la intensidad de la estimulación (Shik y Orlovsky, 1976). En esta preparación no solamente se inducía la marcha, sino que se presentaron además conductas de alertamiento electroencefalográfico. Neuroanatómicamente las regiones estimuladas del campo tegmental ventral que corresponde a la región más rostral del núcleo de la rafe mesencefálica, un núcleo serotoninérgico, y el dorsal, a regiones que reciben fibras de paso que proyectan hacia la formación reticular del bulbo raquídeo en el área del núcleo reticular gigantocelular (NRGC) que proyecta a interneuronas glúcinérgicas de la médula espinal, las que producirían en última instancia la inhibición (Mori, 1989).

Es interesante el hecho de que varios estados de conciencia se encuentran modulados por la formación reticular pontina y el hipotálamo participa en la regulación de los procesos asociados con el mantenimiento de la homeostasis y los ritmos

biológicos. A la fecha está bien establecido, que en el tallo cerebral se encuentran los mecanismos involucrados en la vigilia y el sueño. Los mecanismos involucrados en el sueño y los que inducen el reflejo de inmovilidad se encuentran localizados en la región ponto-bulbar (Jouvet, 1967). Estos estados presentan ciertas similitudes, pero también sus diferencias. Mencionando en primer orden las similitudes, podemos decir que se presentan de manera natural, tienen semejanzas ontogenéticas, inhiben movimientos voluntarios y pueden presentar activación cortical (Klemm, 1971 b). Dentro de las diferencias se puede mencionar, que durante un reflejo de inmovilidad no se presentan sacudidas musculares, no hay movimientos oculares rápidos, no se abole el tono muscular de la nuca y no lo antecede el sueño, por lo que estamos hablando de vías compartidas en eventos fisiológico-conductuales diferentes.

Inmovilidad Farmacológica

Otra conducta de inmovilidad es la catalepsia, esta se induce farmacológicamente con drogas dopaminérgicas o con opiáceos y es una condición en la cual la persona o el animal permanece por largos periodos en una sola postura, impuesta externamente. El sistema nigro-estriatal ha sido considerado importante para la inducción de estados catalépticos, ya que al administrar antagonistas dopaminérgicos como el haloperidol se induce, y puede bloquearse al administrar canabinoides (De Ryck y cols., 1980).

En resumen, los cambios del tono muscular, que ocurren en los diferentes tipos de inmovilidad dependen de zonas en la formación reticular del tallo cerebral. Algunas

zonas también están involucradas en la atonía muscular que se produce durante el sueño MOR.

APÉNDICE “B”

Sueño

La definición conductual del sueño es la de un estado reversible en el cual el organismo disminuye su percepción sensorial y por ende disminuye las respuestas ante estímulos externos (Carskadon y Dement, 2000). La mayor parte de lo que conocemos del sueño se debe a estudios realizados en mamíferos, particularmente humanos, sin embargo esto no lo hace exclusivo de ellos. Los criterios para que un estado de reposo pueda ser considerado como sueño incluyen: la permanencia del sujeto en calma, adopta una postura especie-específica (Figura 1), ojos cerrados, al to umbral para responder a estímulos externos, un ritmo circadiano y cambios característicos en el electroencefalograma que se describirán más adelante (Cambell y T obler, 198 4; Carskadon y Dement, 2000).

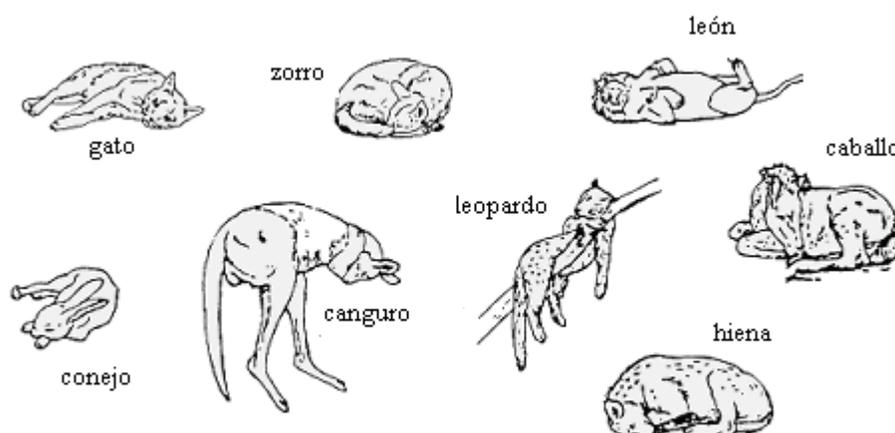


Figura 1. Posiciones adoptadas para dormir en algunos mamíferos. El sueño puede ser identificado conductualmente por las posturas específicas adoptadas durante el sueño. En la figura se presentan posturas que adoptan algunos mamíferos (Modificada de Hassenberg, 1965).

El sueño es un proceso dinámico durante el cual ocurren cambios fisiológicos como son la termorregulación, la síntesis de proteínas, la modulación de la liberación de varias hormonas, el procesamiento de la información y la consolidación de la memoria, así como la secreción de citoquinas involucradas en la regulación del sistema inmune (Fernández-Guardiola y Calvo, 1998). Esto ha llevado a formular nuevas teorías sobre la función del sueño, como son: la teoría de la restauración y la teoría de la adaptación.

Teoría de la Restauración.

La sensación de bienestar que sentimos después de dormir sugiere que este estado nos sirve para reestablecer las funciones del cuerpo. El sueño que se presenta durante una enfermedad o después de una cirugía apoya esta teoría. Adicionalmente, se ha descrito que durante el sueño de ondas lentas (SOL) se presentan cambios hormonales, por ejemplo; incrementan los niveles de la hormona del crecimiento, de testosterona y de prolactina (Aldrich, 2000). Otro punto importante se centra en la alta proporción de sueño con movimientos oculares (MOR), que se presenta durante la infancia, cuando el desarrollo del cerebro es máximo (Marks y cols., 1995).

Teoría de la Adaptación.

Propone que el sueño permite un amplio rango de adaptación a las condiciones ambientales, y a que tiene un papel esencial en la conservación de la energía o la regulación térmica del cuerpo. La reducción de la temperatura corporal y del metabolismo mantiene la homeostasis del organismo, siendo contrario, a lo que sucede

en la vigilia. Otro punto que apoya esta teoría es que los animales pequeños con altas tasas metabólicas duermen más que los animales grandes con metabolismo lento, ya que requerirían menor tiempo de sueño (Aldrich, 2000).

Caracterización electroencefalográfica del sueño.

Una manera de evaluar el sueño es mediante la polisomnografía que incluye el registro simultáneo de distintas variables fisiológicas, dentro de las cuales se encuentran tres básicas para distinguir los periodos de vigilia de los periodos de sueño y son:

- 1) El electroencefalograma (EEG), registra la actividad eléctrica de la corteza del cerebro mediante la diferencia de voltaje registrada entre dos electrodos colocados sobre el cuero cabelludo respecto a uno de referencia.
- 2) El electromiograma (EMG), que permite el registro de la actividad muscular, con dos electrodos colocados en un músculo.

3) El electro-oculograma (EOG), registra el movimiento de los ojos mediante un electrodo colocado en la piel del párpado y otro de referencia colocado en la superficie del cráneo.

El sueño puede dividirse en dos estados que han sido definidos en base a parámetros fisiológicos.

1) El sueño con movimientos oculares rápidos (MOR), también referido como un estado de sueño desincronizado, paradójico o activo.

2) El sueño no MOR (NMOR) o sueño de ondas lentas (SOL), referido como un estado sincronizado, de ondas lentas que comprende, en el humano, los estadios del 1 al 3.

El ciclo del sueño varía en cuanto a su duración y distribución de sueño NMOR y MOR dependiendo de la especie, de la actividad realizada durante la vigilia, de la edad entre otros factores (Hobson y cols., 1986; García-García y Druker-Colín, 1999; Lesku y cols., 2009).

En condiciones normales el sueño MOR y NMOR se presentan alternadamente durante toda la noche. Cada ciclo dura aproximadamente 90 minutos y contiene 20 minutos en promedio de sueño MOR. El sueño MOR comienza 90 minutos después de iniciado el sueño NMOR, por lo que en un periodo de 8 horas de sueño se tendrán de 4 a 5 periodos de sueño MOR (Aldrich, 2000).

Las características electroencefalográficas del sueño y la vigilia en el humano (Figura 2), se detallan a continuación:

1) Vigilia-atenta. Cuando el sujeto es tá des pierto y at ento el pat rón electroencefalográfico se presenta con un a bajo voltaje y al ta frecuencia, lo que se denomina frecuencia beta que es tá comprendida dentro del rango de 20 a 40 Hz. (Aldrich, 2000).

2) Vigilia-quieta. Cuando una persona está despierta pero relajada, con los ojos cerrados; se presenta el ritmo alpha (8 a 13 Hz) en las regiones parieto-occipitales, que pueden alternar con ritmo beta (Aldrich, 2000).

3) SOL Etapa 1. Es la fase inicial del sueño, en la cual el umbral para despertar es bajo. El ritmo alpha desaparece y aparecen actividades esporádicas de bajo voltaje sobre un ritmo beta. Los movimientos oculares desaparecen y el tono muscular disminuye.

4) SOL Etapa 2. Aparecen los “husos de sueño” que es actividad fusiforme con una frecuencia de 14 a 16 Hz. Alternando con actividad beta. Además aparecen también los “complejos K” que alternan con actividad delta (0.5 a 4 Hz) de alto voltaje.

5) SOL Etapa 3. Se caracteriza por la presencia de actividad delta, el tono muscular es bajo y pueden aparecer movimientos oculares lentos.

7) Sueño MOR. En esta etapa existe una gran actividad cerebral cortical asociada a un cuerpo inmóvil, por lo que se le denominó sueño paradójico (Jouvet, 1967). La actividad electroencefalográfica es rápida y de bajo voltaje (ritmo beta); aparecen movimientos oculares rápidos, hay actividad muscular ocasionalmente interrumpida por breves contracciones.

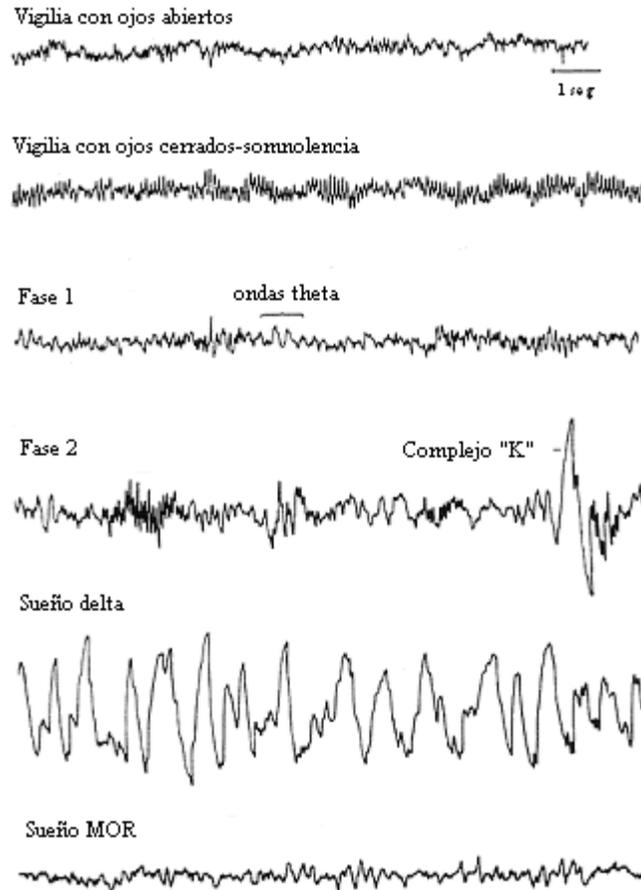


Figura 2. Patrones electroencefalográficos de la vigilia y el sueño. Representación gráfica de las frecuencias que se presentan durante el registro encefalográfico de la vigilia y el sueño en el humano. (Modificada de Hartmann, 1973).

Esta descripción se refiere a las etapas que se presentan en el humano, sin embargo la rata, en tiempos recientes, ha sido uno de los modelos animales utilizados para estudiar los aspectos básicos del sueño en los mamíferos (Alföldi y cols., 1990). El ciclo sueño-vigilia del gato y la rata presenta las mismas características electroencefalográficas que en el humano, sin embargo, existen algunas variaciones en cuanto a la distribución de las etapas durante el ciclo sueño-vigilia.

Los registros electroencefalográficos en la rata usualmente se dividen en tres estados: vigilia, sueño no MOR y sueño MOR (Maloney y cols., 1997). Caracterizándose la vigilia por presentar una alta frecuencia y baja amplitud en el electroencefalograma además de alta actividad electromiográfica. En el sueño no MOR se presenta actividad cortical lenta interrumpida por husos de sueño y muy baja actividad electromiográfica. Finalmente en el sueño MOR se presenta actividad cortical de alta frecuencia y baja amplitud, con ritmo theta en el hipocampo y atonía muscular (Maloney y cols., 1997).

Historia

El estudio del sueño comienza con los trabajos de C. Von Economo; y a que durante la I Guerra Mundial una epidemia de encefalitis letárgica, causó una prolongada y profunda somnolencia en la mayoría de los pacientes infectados. Von Economo reportó que este estado de prolongada somnolencia se debía a una lesión en el hipotálamo posterior y en el mesencéfalo; sin embargo esta misma infección en otros sujetos producía agitación e insomnio, cuyas lesiones estaban localizadas en el área preóptica y en el hipotálamo anterior (Finger, 1994; Jaffe, 2000). Estos hallazgos fueron esenciales para señalar las áreas específicas del cerebro que son responsables de la vigilia y el sueño.

En 1953, Aserinski y Kleitman haciendo observaciones en niños dormidos, describieron que existía una relación entre la actividad de los ojos y la profundidad con la que se dormían los individuos. Considerando que existían periodos en los que los

ojos estaban en reposo y otros en los cuales se movían por periodos cortos, decidieron realizar un electroencefalograma, describiendo que los movimientos oculares rápidos se presentaban cuando la actividad electroencefalográfica era rápida y de baja amplitud y ausencia del tono muscular, por lo que posteriormente se le denominó sueño con movimientos oculares rápidos (sMOR), (Aserinsky y Kleitman, 2003).

Posteriormente Jouvett y su grupo (1967), en estudios realizados en gatos intactos y descerebrados, mostró que existían al menos dos formas de sueño con características electroencefalográficas y sustratos neuronales diferentes, refiriéndose al sueño de ondas lentas y al sueño paradójico o sueño con movimientos oculares rápidos (Jouvett, 1967).

Regulación del ciclo sueño-vigilia

Las neuronas colinérgicas del tegmento pedúnculo pontino intervienen en la regulación del ciclo sueño-vigilia enviando proyecciones al tálamo para la modulación de la actividad cortical. La liberación de acetilcolina en el tálamo, durante la vigilia y el sueño MOR, provoca des polarización de las neuronas tálamo-corticales y cambia su modo de descarga desde uno de tipo tónico hacia una descarga de tipo fásica, interrumpiendo la sincronización entre el tálamo y la corteza cerebral (Datta y Siwek, 1997). La descarga tónica del tálamo, asociada con el sueño lento, se produce cuando cesa la liberación de acetilcolina y las neuronas talámicas regresan a un estado de hiperpolarización, permitiendo a las células marcapasos del núcleo reticular del tálamo

(NRT) descargar de forma tónica y producir la sincronización del electroencefalograma (Steriade y cols., 2001).

En este estado, la respuesta tálamo-cortical no recibe estímulos generados interna o externamente. Un gran número de estudios en gatos han demostrado que la parte dorsal de la formación reticular pontina es crucial para el inicio y mantenimiento del sueño MOR. La supresión de las oscilaciones del sueño lento y el comienzo del sueño MOR ocurren por una desinhibición en el tallo de circuitos locales inhibitorios que hacen cambiar la descarga tálámica; este cambio se le ha atribuido a neuronas colinérgicas de la parte basal del cerebro (Jones, 1991). Por otra parte Sakai y su grupo (1981) reportaron que la gran mayoría de las neuronas pontinas con una actividad tónica, específicamente durante el sueño MOR, estaban localizadas en la región perilocus coeruleus alpha (peri LC α), formada por una pequeña área de la parte dorsal del pontis oralis y del ponto caudalis (Sakai y cols., 1981).

Hobson y su grupo (1975) y más tarde Sakai y cols., (1981) propusieron la activación de las neuronas de la región peri LC α es debida a una interacción excitatoria entre las neuronas MOR-on y una inhibición recíproca con neuronas monoaminérgicas (Hobson y cols., 1975; Sakai y cols., 1981).

De hecho el tegmento pedúnculo pontino (TPP) y el tegmento latero dorsal (TLD) han sido reportados por contener neuronas MOR-on, la gran mayoría de las neuronas

de estos núcleos están tónicamente activas durante la vigilia y durante el sueño MOR (Kayama y cols., 1992).

Entre los principales núcleos reguladores de la vigilia se ha descrito la función del locus coeruleus de actividad noradrenérgica; los núcleos del rafe dorsal (serotoninérgico); y el núcleo tubero-mamilar (histaminérgico), los cuales presentan una alta actividad durante la vigilia, disminuyen sus frecuencia de disparo durante el sueño de ondas lentas (SOL), y pierden su actividad neuronal durante el sueño MOR (Siegel, 2000). El área preóptica ventro-lateral de naturaleza GABAérgica, se activa en el inicio del SOL, y sus proyecciones inhiben la actividad de los núcleos que intervienen en la vigilia, así como de los núcleos del tegmento latero-dorsal (TLD) y del tegmento pedúnculo pontino (TPP); (Saper y cols., 2001). Las neuronas de los núcleos TLD/TPP se consideran neuronas MOR-on, dado que la activación de estos centros colinérgicos da como resultado la atonía muscular característica del sueño MOR, y la activación de la corteza cerebral (Figura 3).

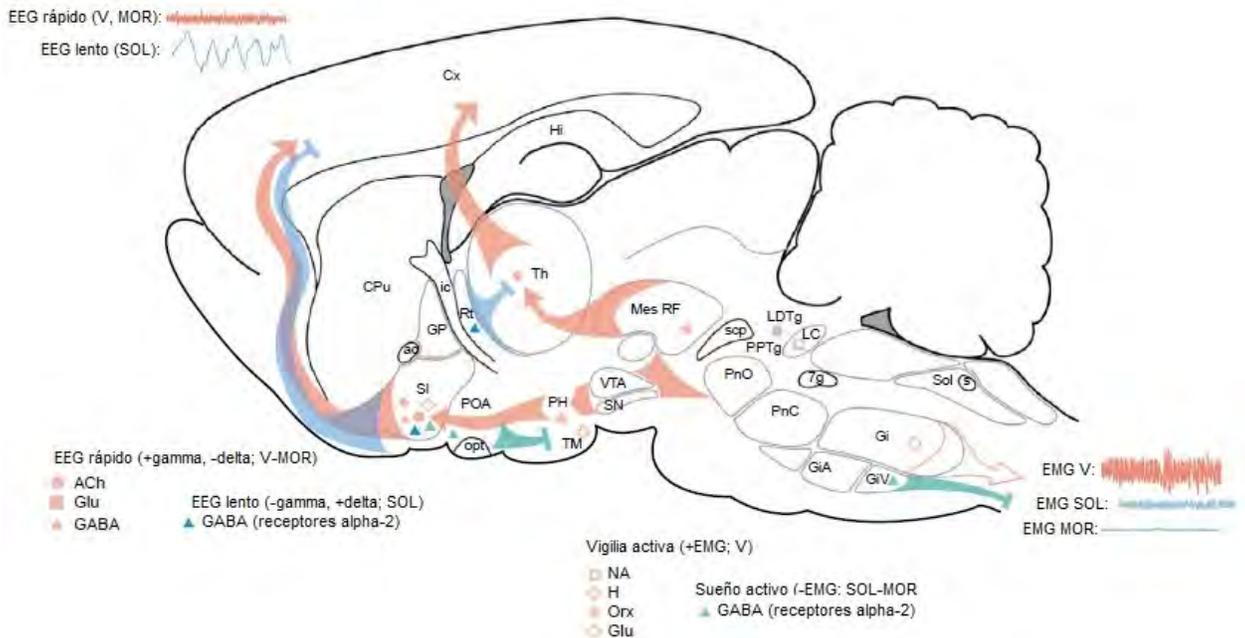


Figura 3. Núcleos, neurotransmisores y vías que intervienen durante el ciclo sueño-vigilia. Los núcleos activos durante la vigilia (rosa) tienen proyecciones ascendentes a la corteza con una actividad cortical rápida, y otras con proyecciones descendentes hacia la médula espinal, los cuales estimulan el tono muscular. Las neuronas activas durante el sueño (azul y verde) incluyen a proyecciones hacia la corteza, las cuales moderan la actividad cortical lenta, y aquellas con proyecciones descendentes hacia el tallo cerebral y la médula espinal, disminuyen el tono muscular. Durante el SOL las neuronas con proyecciones hacia la corteza (triángulos azules) descargan en asociación con actividad lenta del EEG e incluyen algunas neuronas que contienen GABA en el cerebro basal anterior y en el área preóptica que expresa los α_2 -adrenorreceptores. También se muestran los núcleos que contienen GABA del núcleo reticular del tálamo (Rt). Estas descargan en ráfaga produciendo las espigas del sueño y las ondas lentas para inhibir y marcar el ritmo a las interneuronas tálamo-corticales. Abreviaturas: a c, comisura anterior; C Pu, caudado putamen; C x, corteza; E EG, electroencefalograma; E MG, electromiograma; Gi, gigantocelular FR; GiA, gigantocelular, α parte RF; GiV, gigantocelular, parte ventral RF; GP, globo pálido; Hi, hipocampo; ic, capsula interna; LDTg, núcleo tegmental laterodorsal; Mes RF, mesencéfalo R F; o pt, tracto óptico; P H, hipotálamo posterior; P nC, pontino, parte caudal R F; P nO, pontino, parte oral R F; P OA, área preóptica; P PTg, núcleo tegmental pedunculopontino; R t, núcleo reticular del tálamo; s, tracto solitario; scp, pedúnculo cerebral superior; SI, substancia innominada; SN, substancia nigra; S ol, núcleo tracto solitario; T h, tálamo; T M, núcleo tuberomamilar; VTA, área ventral tegmental. (Modificada de Jones, 2005).

Patología del sueño.

Una vez caracterizado el ciclo sueño-vigilia normal se han establecido los criterios conductuales y electroencefalográficos para caracterizar las alteraciones del sueño que se presentan en todas las edades, debido por ejemplo en los niños a aspectos de maduración y en los mayores a procesos degenerativos (Weitzman, 1981).

En 1979, la Asociación de Trastornos del Sueño establece criterios diagnósticos de los trastornos del sueño y los clasifica en cuatro categorías (Tabla 1). Sin embargo en 2005 la Academia Americana de Medicina del Sueño publica la clasificación Internacional de los trastornos del sueño (ICSD-2, por sus siglas en inglés) en donde considera 85 trastornos del sueño contenidos en ocho categorías principales:

1. El insomnio.
2. Trastornos del sueño relacionados con la respiración.
3. Hipersomnia que no se debe a un trastorno de la respiración.
4. Los trastornos del sueño relacionados al ritmo de circadiano.
5. Las parasomnias.
6. Trastornos del sueño relacionados con el movimiento.
7. Síntomas aislados, y cuestiones no resueltas.
8. Otros trastornos del sueño

Debido a que en el laboratorio se cuenta con un modelo animal adecuado para estudiar la narcolepsia-cataplejía, la cual se encuentra clasificada dentro de las hipersomnias, me enfocaré al estudio de este trastorno del sueño.

Tabla 1. Clasificación de los trastornos del sueño

I. Insomnio	II. Trastornos del ciclo sueño-vigilia
<ul style="list-style-type: none"> Dificultad para iniciar el sueño Dificultad para mantenerse dormido Despertar en la fase oscura 	<ul style="list-style-type: none"> Síndrome de retraso de la fase de sueño Síndrome de adelanto en la fase de sueño Cambio repentino del huso horario (jet-lag) Rotaciones en los horarios de trabajo
III. Hipersomnias	IV. Parasomnias
<ul style="list-style-type: none"> Apnea obstructiva del sueño Apnea del sueño de origen central Narcolepsia Debido a medicamentos o alcohol Infecciones virales recientes Hipersomnia idiopática 	<ul style="list-style-type: none"> Movimientos de piernas durante el dormir Trastornos del despertar Trastornos de la transición sueño-vigilia Trastornos conductuales en el sueño MOR Enuresis Sonambulismo

Narcolepsia

Actualmente desde el punto de vista clínico el 80% de las consultas por somnolencia se deben a trastornos del sueño inducidos por daño respiratorio (apneas del sueño), narcolepsia o bien por hipersomnolencia idiopática (Vgontzas, y Kales, 1999, Weitzman, 1981).

La narcolepsia es un trastorno crónico del sueño que se encuentra clasificada dentro de las hipersomnias y afecta a 1 de cada 2,000 sujetos de la población general. La narcolepsia humana es compleja y multifactorial; genéticamente heterogénea con características poligénicas e influencias medio ambientales (Nishino y Mignot, 1997).

La narcolepsia se caracteriza por la tetrada de síntomas que se presentan: excesiva somnolencia durante el día, episodios de cataplejía, parálisis del sueño y alucinaciones. La cataplejía, que es una abrupta y reversible disminución o pérdida del tono muscular durante la vigilia, es específicamente se produce en el humano, por estímulos emocionales como el enojo, la risa, las bromas, el llanto y las sorpresas (Aldrich, 1992).

En la narcolepsia la somnolencia se presenta durante el día aún cuando la persona desee permanecer despierta; incrementa el número de las siestas, las cuales no resuelven la sensación de somnolencia; no importando el tiempo que el sujeto permanezca dormido o la duración de la siesta, la persona continúa con la sensación de sueño y no haber sido suficiente el tiempo que ha dormido. Estos síntomas deben estar bien definidos y no ser confundidos con fatiga, "pérdida de la energía", o depresión (Vgontzas y Kales, 1999).

Adicionalmente, los pacientes con narcolepsia presentan una corta latencia al sueño, conductas automáticas durante el sueño y problemas de memoria a corto plazo, siendo la cataplejía el síntoma más característico del síndrome narcoléptico (Overeem y cols., 2001).

Modelos animales de narcolepsia

Existen varias razas en perros que han presentado el trastorno de la narcolepsia-cataplejía, como por ejemplo los Poodles, Beagles y Dachshunds, sin embargo, durante los últimos treinta años los más estudiados son los Doberman Pinschers que son un modelo animal de narcolepsia-cataplejía. En la Universidad de Stanford existe una colonia de perros Doberman Pinschers, en los que se ha descrito que la transmisión de este trastorno es autosómica recesiva de penetrancia completa, por un gen al que denominaron *canar-1* (del inglés canine narcoleptic), (Foutz y cols., 1979). Años más tarde se identificó que este gen codifica para el receptor 2 de las hipocretinas (Lin y cols., 1999).

En los perros Doberman Pinscher afectados, la cataplejía se presenta a partir de la cuarta semana de edad, la severidad de los síntomas se incrementa de los cinco a los seis meses de edad y disminuye lentamente permaneciendo estable en la vejez (Riehl y cols., 1998, 1999).

Los episodios de cataplejía en los perros narcolépticos son inducidos por un estímulo emotivo como la comida o el juego y comienzan con la disminución del tono muscular de las patas delanteras y caída del cuello; el perro puede caer al piso y permanecen así por unos segundos o minutos (Nishino, 2005). Estudios polisomnográficos han mostrado que estos perros tienen el ciclo sueño-vigilia fragmentado y la duración de cada etapa del ciclo es corta (Kaitin y cols., 1986b; Nishino y cols., 2000b).

La cataplejía en los perros narcolépticos está asociada con el incremento en la liberación de acetilcolina en la formación reticular pontina medial, siendo los agonistas colinérgicos para el receptor M_2 los que la exacerban (Reid y cols., 1992). Por otra parte, los efectos inhibitorios más potentes de la cataplejía se dan por el incremento en la transmisión noradrenérgica, bloqueando la recaptura o incrementando la liberación de noradrenalina. Aunque la fluoxetina y otros inhibidores de recaptura de la serotonina, también inhiben la cataplejía, sus efectos son mediados por su metabolito reducido, el cual inhibe la recaptura de noradrenalina (Nishino y cols., 1993 a, b). Compuestos que incrementan la disponibilidad de dopamina tienen pocos efectos en la cataplejía (Nishino y cols., 1990), disminuyendo los episodios de cataplejía con antagonistas D_1 y D_2 que actúan en el receptor presináptico o en las neuronas noradrenérgicas (Okura y cols., 2000).

En el caso del modelo de narcolepsia-cataplejía en perros Doberman, este trastorno es ocasionado por una mutación en el receptor a la orexina tipo 2 (OX2R) (Lin y cols., 1999; Nishino, 2005).

La mutación en los perros doberman se debe a una inserción de una secuencia pequeña de ADN en el tercer intrón del gen *hcrtr2*, la cual causa una edición aberrante del ARNm (Lin y cols., 1999). Esto provoca que se omita el exón 4 en el mensajero final, lo que resulta en una proteína truncada. Al transfectar el gen mutante en células en cultivo, se observó que la proteína truncada resultante no se inserta correctamente en la membrana y por lo tanto no puede unir a sus ligandos (Lin y cols., 1999).

En 1998, dos grupos de investigación independientes identificaron una clase de neuropéptidos producidos por neuronas localizadas en el hipotálamo lateral. De Lecea y cols., en 1998, los llamaron hipocretinas (HCRT), dada su localización en el hipotálamo y su similitud estructural con la hormona secretina; mientras que Sakurai y colaboradores, en el mismo año, los denominaron orexinas. Su nombre, provino del griego *orexís* = apetito, dado que descubrieron que la administración central de estos péptidos incrementaba la ingesta de alimento en ratas saciadas (Sakurai y cols., 1998). Sin embargo, se trata de los mismos neuropéptidos, por lo que los nombres se manejan indistintamente en la literatura, por lo que en el texto las referiré como orexinas.

Existen dos tipos de orexinas (orexina-1 y orexina-2) con sus respectivos receptores celulares (OX1 y OX2). El receptor a orexina 1 tiene una mayor afinidad por la orexina-1 que por la orexina-2 y el receptor a orexina 2, tiene igual afinidad para ambos péptidos. Las vías anatómicas de las neuronas productoras de hipocretinas en el hipotálamo conectan a esta estructura con otros núcleos del encéfalo, entre los cuales se encuentran: locus coeruleus, ganglios basales, regiones talámicas, formación reticular, núcleo del tracto olfatorio, regiones corticales, núcleos amigdalinos, bulbo olfatorio, núcleo supraquiasmático y médula espinal (Figura 4; Marcus y Elmquist, 2006; Sakurai, 2007).

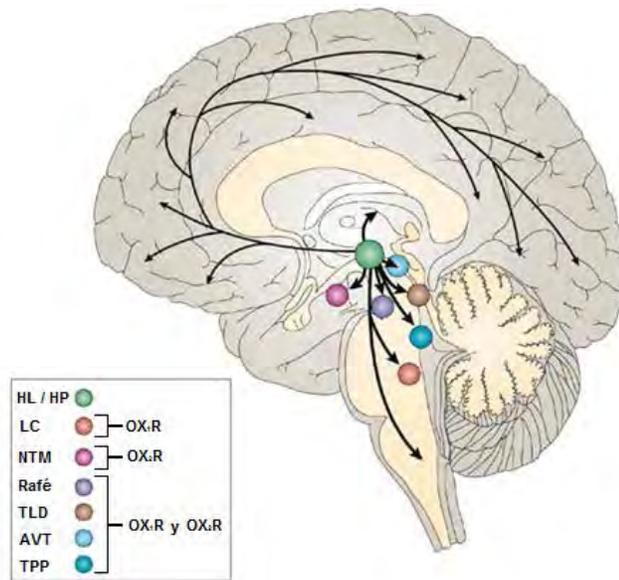


Figura 4. Distribución de las proyecciones orexinérgicas y sus receptores. Las neuronas orexinérgicas se originan en el hipotálamo lateral (HL) y posterior (HP). Los círculos muestran las regiones con proyecciones orexinérgicas y con expresión de receptores a orexinas. Locus coeruleus (LC); núcleo tubero mamar (NTM); tegmento latero-dorsal (TLD); área ventral tegmental (AVT); tegmento pedúnculo pontino (TPP).

Las vías de conexión del hipotálamo a otras estructuras cerebrales mediadas por hipocretinas proporcionan una modulación de otros sistemas de neurotransmisión, por ejemplo, los sistemas que funcionan mediante serotonina, dopamina, histamina, acetilcolina, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glutamato.

Una vez identificados estos péptidos, el grupo de Yanagisawa y cols., creó el ratón carente del gen para la pro-peptidomorfina (*orexin^{-/-}*), el cual presentaba abruptos periodos de inactividad, una corta latencia al sueño MOR, un incremento en el sueño MOR durante la fase oscura y fragmentación del ciclo sueño-vigilia; por lo que se

determinó que estos ratones tienen un fenotipo narcoléptico (Chemelli y cols., 1999; Sakurai y cols., 2005).

Posteriormente desarrollaron otros ratones carentes del gen para uno o ambos de los receptores para las orexinas, de los cuales solamente los ratones carentes del gen para el receptor tipo 2 (OX2R) y los carentes del gen para ambos receptores presentan cataplejía como los ratones *orexin^{-/-}*, lo que no se observa en los ratones carentes del gen para el receptor tipo 1 (OX1R); (ver Tabla 2; Sakurai y cols., 2005).

Adicionalmente, Hara y colaboradores (2001) desarrollaron un ratón transgénico el cual portaba un fragmento de gen citotóxico denominado “ataxina-3”; estos animales perdían todas las células orexinérgicas identificables postnatalmente y desarrollaban los síntomas de narcolepsia en paralelo con la muerte de neuronas orexinérgicas.

Tabla 2. Modelos de narcolepsia en roedores

Ratón	Fenotipo
Carente de Prepro-orexina	Cataplejía (+), somnolencia (+) Fragmentación del ciclo sueño-vigilia (severa)
Carente del receptor OX1	Cataplejía (-), somnolencia (-) Fragmentación del ciclo sueño-vigilia (mediano)
Carente del receptor OX2	Cataplejía (-), somnolencia (+) Fragmentación del ciclo sueño-vigilia (severa)
Orexina/ataxina-3	Cataplejía (+), somnolencia (+) Fragmentación del ciclo sueño-vigilia (severa)
Rata Orexina/ataxina-3	Cataplejía (+), somnolencia (+) Fragmentación del ciclo sueño-vigilia (severa)

(Modificada de Sakurai y cols., 2005)

Otra forma de inducir la muerte en neuronas que contienen orexina es por medio de la inyección de la toxina saponina acoplada a este neuropéptido en células orexinérgicas, la saporina ingresa y produce muerte neuronal solo en las neuronas que lo internalizaron, es to es aproximadamente el 73 %, de tal forma que 6 semanas después se pierden las neuronas que contienen al neuropéptido. Este efecto se correlaciona también con una disminución del 50 % de los niveles de orexinas. Esto indica que la muerte celular de neuronas orexinérgicas correlaciona con la disminución de orexinas en LCR y el fenotipo de narcolepsia (Gerashchenko y cols., 2001).

La existencia de los modelos animales ha facilitado el estudio farmacológico, y fisiopatológico del papel que las hipocretinas tienen en la narcolepsia.

Nishino y cols., en el 2000c reportan que los niveles de orexina-1 son más bajos en el líquido cefalorraquídeo de personas que padecen narcolepsia-cataplejía (Nishino y cols., 2000b). Estudios post-mortem en humanos narcolépticos muestran una disminución en los niveles de orexina-1 y orexina-2, así como en el número de receptores para estos péptidos y en el número de neuronas hipocretinérgicas (Figura 5, Ebrahim y cols., 2002). La ausencia de las neuronas orexinérgicas se puede explicar por mecanismos como la neurodegeneración, fallas en el desarrollo del cerebro durante sus primeras etapas y reducción en la síntesis o liberación de orexinas por alguna mutación en la secuencia del ADN que codifica para éstas (Thannickal y cols., 2000; Ebrahim y cols., 2002).

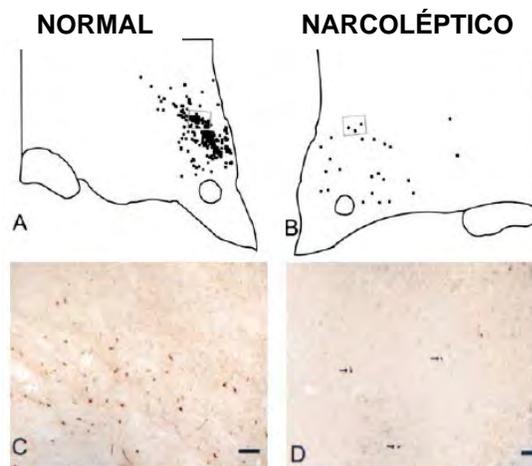


Figura 5. Distribución de células orexinérgicas en el área perifornical y dorsomedial del hipotálamo en sujetos sanos y narcolépticos. A y B región en donde se localizan las neuronas orexinérgicas. **C y D** neuronas inmunomarcadas para orexina del recuadro marcado en A y B. Cal=100 μ m (Modificado de Thannickal y cols., 2000).

Actualmente para realizar el diagnóstico de narcolepsia, se utiliza el líquido cefalorraquídeo de los pacientes y se mide la deficiencia del ligando a orexina 1. Las concentraciones de orexina 1 que son menores a 110 pg/mL, tienen un alto valor predictivo (94 %) para la narcolepsia con cataplejía (Nishino y cols., 2010).

Tratamiento de la narcolepsia

El tratamiento para la narcolepsia no es único y depende de la respuesta terapéutica en cada individuo. Las anfetaminas son las que más se han utilizado para tratar este trastorno, sin embargo, se han reportado efectos secundarios como son: irritabilidad, cefalea, palpitaciones, temblores musculares y sudoración excesiva. El metilfenidato es la sustancia que ha sustituido a las anfetaminas como el tratamiento de

elección; entre las ventajas que tiene es que se observa menos repercusión sobre la presión arterial, menos alteraciones del apetito y menos desarrollo de tolerancia al fármaco (Keam y Walker, 2007).

Los antidepressivos tricíclicos como la imipramina, la desimipramina y la clorimipramina han mostrado ser efectivos en el manejo de la cataplejía (Guilleminault y Anagnos, 2000). Además del tratamiento farmacológico, los individuos deben tener horarios de sueño muy estrictos para obtener los efectos máximos.

Genética de la narcolepsia

En los humanos en el 95% de los casos de narcolepsia es de tipo idiopático y sólo una fracción muy pequeña es de tipo hereditario. Los casos de narcolepsia de tipo familiar en humanos, en los cuales varios sujetos son afectados durante varias generaciones, son muy raros, lo que ha dificultado mapear los genes responsables de la enfermedad. A pesar de que la gran mayoría de los casos de narcolepsia en humanos no son de tipo familiar y no se han asociado a mutaciones en el sistema de las orexinas, sin embargo se ha descrito una reducción considerable (85-95%) en el número de neuronas orexinérgicas en estudios post mortem en cerebros de pacientes narcolépticos. La causa de la muerte neuronal, aún se desconoce, sin embargo se ha propuesto que sea una enfermedad autoinmune cercanamente asociada a los haplotipos HLA (Nishino y cols., 2010).

En el caso de los humanos, solo se ha reportado una mutación de *novo* en el péptido precursor de las orexinas en un niño con inicio de la narcolepsia a la edad de seis meses. En estudios realizados al sujeto se detectó; un cambio de una guanina por una timina introduciendo una arginina al tamentecargada; el sujeto inicialmente presentaba pérdida del tono muscular del cuello al reírse (Peyron y cols., 2000).

Esto explica el fenotipo severo de este paciente que mostró síntomas de narcolepsia en sus primeros meses de vida, a diferencia de la mayoría de casos de narcolepsia que se presentan en la segunda o tercera década de vida.

APÉNDICE “C”

Actividad locomotora

El tegmento pedúnculo pontino se ha considerado de suma importancia en la región mesencefálica para inducir movimientos de locomoción coordinados en el animal con sección precolicular-postmamilar (Takakusaki, 2008). La implicación del tegmento pedúnculo pontino en la actividad locomotora está en relación con las conexiones que establece con los ganglios basales, que intervienen en la regulación del movimiento (Mori, 1987). Los ganglios basales carecen de conexiones directas con centros motores del tronco o de la médula espinal y dado que el tegmento pedúnculo pontino es el punto más caudal del neuro-eje sería la salida de información de los ganglios basales hacia centros motores, por lo que el tegmento pedúnculo pontino recibe información relacionada con el control postural desde los ganglios basales (Kandel y cols., 2000).

Existen dos vías descendentes que tienen un efecto inhibitorio, siendo el tegmento dorsal mesencefálico uno de ellos y a través de la formación reticular del bulbo raquídeo produce una inhibición intensa del tono antigravitorio y el otro, el tracto retículo-espinal lateral produce una inhibición a todos los niveles de la médula espinal (Chase y cols., 1989).

El sistema retículo-espinal controla la postura y el movimiento debido a la integración de entradas sensoriales y vestibulares comandadas por la corteza cerebral. Mori (1987) propuso que existen estructuras neurales localizadas a nivel del tallo

cerebral, del cerebelo y de la médula espinal, que son comunes tanto para el sistema de control postural como para el sistema del control motor voluntario.

El papel inhibitorio de la formación reticular medial, corresponde a los núcleos gigantocelular y paragigantocelular, y es evidente debido a que las lesiones de los núcleos como el núcleo *reticularis gigantocelularis* y el núcleo reticular magnocelular produce un síndrome de incremento en el tono extensor e hiperextensión de las extremidades, lo que indica su papel en el control de la postura (Mori, 1989).

Sistema colinérgico.

Se han descrito de manera general dos grupos principales de neuronas colinérgicas, las neuronas del cerebro basal anterior y las neuronas del tallo cerebral (Figura 1).

Una clasificación neuroquímica utiliza un sistema de letras y números con el fin de identificar los grupos de neuronas específicas de un neurotransmisor. Con las letras se identifica el neurotransmisor y con los números el orden rostro-caudal del grupo celular. Así podemos mencionar que existen seis grupos neuronales colinérgicos como se observa en la Tabla 1 (Nieuwenhys, 1985).

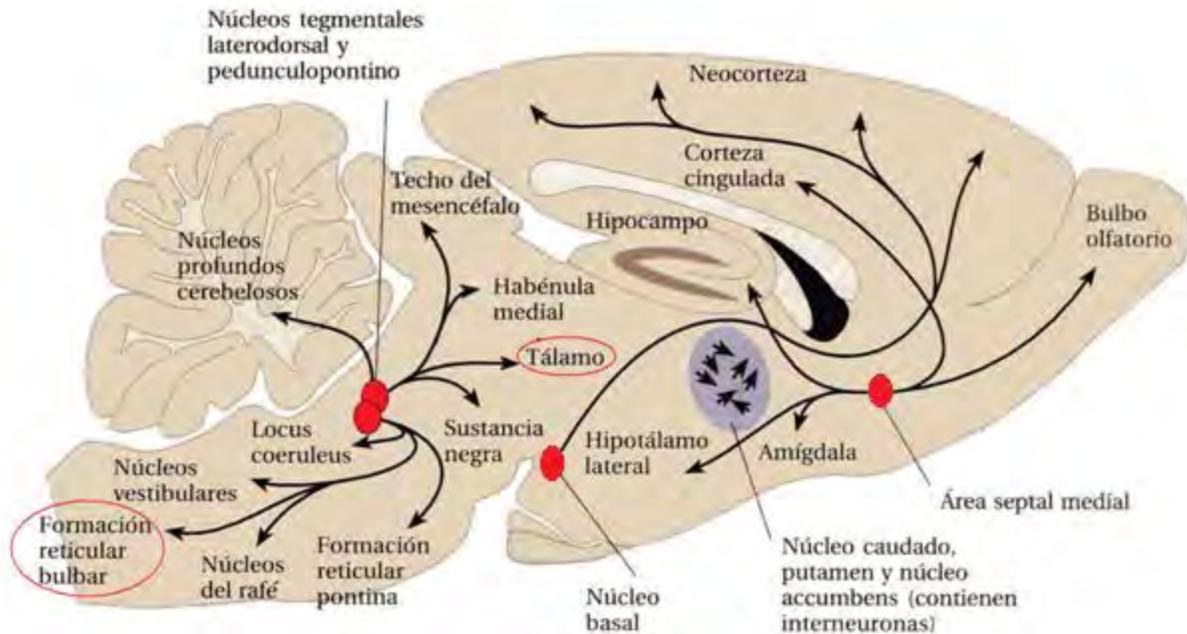


Figura 1. Vista sagital del cerebro de ratona que muestra los principales núcleos de neuronas colinérgicas y sus proyecciones. Note que el tegmento pedúnculo pontino y el tegmento latero dorsal (marcados con rojo) ejercen influencias tanto hacia el tálamo como hacia el tallo cerebral (Modificado de Carlson, 1999).

Los receptores colinérgicos se dividen en dos clases: los muscarínicos y los nicotínicos, los términos se refieren a los efectos farmacológicos basados en la acción de la muscarina, que es una sustancia que proviene del hongo *Amanita muscaria* y la nicotina de la *Nicotiana tabacum*, de la hoja del tabaco.

Los receptores nicotínicos están compuestos por cinco subunidades: 2α , β , γ y δ . A la fecha han sido clonados 9 subunidades alfa y 4 beta, en la unión neuromuscular (Cooper y cols., 2003). Las subunidades delta y gamma también han sido identificadas

y esta última es reemplazada por la subunidad ϵ en el músculo esquelético del adulto (Jones y cols., 1999).

Tabla 1. Núcleos colinérgicos

NÚCLEO	ÁREAS QUE INERVA
Ch1: Medial septal	complejo hipocampal
Ch2: Vertical de la banda diagonal de Broca	complejo hipocampal
Ch3: Horizontal de la banda diagonal de Broca	bulbo olfatorio y núcleo reticular talámico
Ch4: Basal de Meynert	corteza cerebral, amígdala y núcleo reticular talámico
Ch5: Pedúnculo pontino del tallo cerebral	Tálamo
Ch6: Tegmento laterodorsal	corteza cerebral y tálamo

Los receptores nicotínicos se encuentran acoplados a canales iónicos los cuales se hacen permeables a cationes al unirse la acetilcolina (ACh) a la subunidad α , provocando su despolarización (Figura 2).

Las respuestas de la estimulación nicotínica son rápidas, de una corta duración y de naturaleza excitatoria. Los receptores nicotínicos se encuentran en una gran variedad de tejidos, incluyendo al sistema nervioso autónomo, la unión neuromuscular y el SNC (Carlson, 1999).

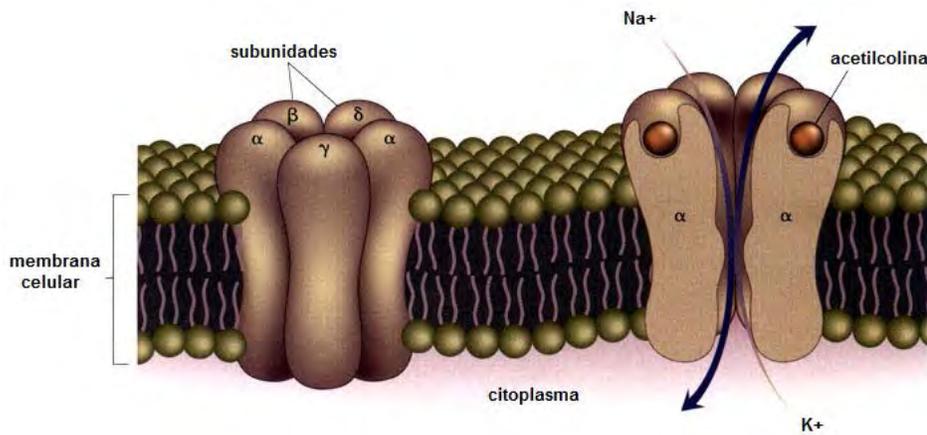


Figura 2. Vista de los receptores nicotínicos acoplados a canales iónicos. Note que se unen dos moléculas de acetilcolina en las subunidades alpha.

Los receptores muscarínicos son de cinco tipos denominados (M_1 - M_5), su tiempo de respuesta es lento (100-250 ms) y tienen 7 dominios transmembranales, los cuales están acoplados a proteínas G activando a su vez una gran variedad de segundos mensajeros. Para el caso de los receptores M_1 , M_3 y M_5 están acoplados a fosfatidil inositol y los receptores M_2 y M_4 están acoplados a adenosina monofosfato cíclico (AMPC), (Cooper y cols., 2003).

A este neurotransmisor también se le ha relacionado con los mecanismos que regulan la memoria, la cognición, el estupor y el coma, así como la regulación de los movimientos voluntarios y del ciclo sueño-vigilia, los cuales son modulados tanto por la acetilcolina como por los sistemas de monoaminas (Cooper y cols., 2003).

Sistema activador reticular ascendente

Moruzzi y Magoun (1949), identificaron regiones adicionales de la formación reticular localizadas en el tallo cerebral rostral, que cuando son estimuladas producían una activación generalizada de la corteza cerebral. A este sistema se le denominó sistema activador reticular ascendente (SARA). Se localiza en el centro del tallo encefálico y se extiende desde el bulbo hasta el diencéfalo (tálamo e hipotálamo). Cuando el SARA se estimula en un animal dormido este se despierta; en cambio si este núcleo es destruido se produce coma (Moruzzi y Magoun, 1949).

Formación reticular

Anatómicamente la formación reticular es la parte central del tallo cerebral y se extiende desde el bulbo raquídeo hasta la porción rostral del mesencéfalo, recibe conexiones de diferentes lugares y envía sus fibras en sentido ascendente, hasta el diencéfalo, y de forma descendente hasta la médula espinal (Lindvall y Björklund, 1983). Las conexiones de la formación reticular son: conexiones corticoreticulares, conexiones con el cerebelo, con el sistema visual, con los núcleos oculares y vestibulares, así como con los núcleos del sistema extrapiramidal. Desde el punto de vista morfológico la formación reticular está constituida por una red neuronal que se encuentra presente en gran parte del SNC: médula espinal, tronco encefálico, diencéfalo. Actualmente, al menos se pueden identificar tres vías principales ascendentes de la formación reticular:

1. Vía que proyecta hacia el núcleo reticular del tálamo y de este a la corteza cerebral.
2. Vía que asciende a través del hipotálamo hasta las estructuras basales del encéfalo anterior incluyendo el sistema límbico.
3. Vía que contiene axones de neuronas serotoninérgicas del rafe mesencefálico y neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus que inervan la neocorteza.

La visión actual de la formación reticular es la de un conjunto de núcleos y fibras que ascienden hacia regiones rostrales y descendentes hacia la médula espinal, así como de interconexión entre los núcleos que producen activación cortical e incremento del tono muscular, así como otras en donde la activación cortical se acompaña de inhibición del tono muscular (Figura 3).

El núcleo tegmental pedúnculo pontino (TPP) fue descrito por primera vez por Jacobson a principios del siglo pasado. A este núcleo se le describió como un conjunto de neuronas grandes que se tiñen intensamente con la tinción de Nissl. Estas neuronas abarcan desde el límite caudal del núcleo rojo al núcleo parabraquial, en estrecha asociación con el núcleo pedúnculo cerebeloso superior (Erro y Giménez-Amaya, 1999).

La función del TPP se ha dilucidado mediante estudios de lesiones en diferentes especies animales. Se le ha relacionado con funciones tan variadas como el control del ciclo sueño-vigilia, la actividad motriz y el comportamiento motivacional (Jones, 1991).

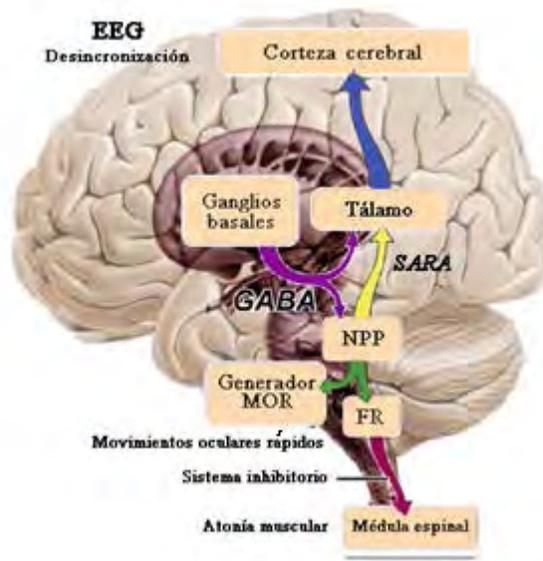


Figura 3. Estructuras involucradas en el sueño MOR y la atonía muscular. Una interconexión entre el núcleo colinérgico mesopontino y la formación reticular ponto-caudal podrían operar como un generador común de sueño MOR. El electroencefalograma (EEG); ácido gamma-aminobutírico (GABA); núcleo pedúnculo pontino (NPP); movimientos oculares rápidos (MOR); formación reticular (FR), (modificado de Takakusaki y cols., 2004).

En un intento de relacionar las diversas funciones que se le atribuyen, se ha planteado la hipótesis de que el TPP, junto con grupos de células catecolaminérgicas y serotoninérgicas del tronco del encéfalo, formarían parte de un complejo ritmogénico, una especie de marcapasos del tronco del encéfalo, que participaría en una serie de funciones que tendrían ritmicidad o bien en controlar su temporalidad. Dentro de estas funciones, la más conocida es quizás la regulación del ciclo sueño-vigilia lo que implica, un ritmo circadiano (García-Rill, 1991).

REFERENCIAS

Aguilar-Roblero, R., Mercado, C., Guadarrama, P., Chávez J.L. (2004). Capítulo XIV: Aspectos celulares y moleculares del núcleo supraquiasmático. En: Fisiología celular y molecular, principios y conceptos. E d. Hernández M .E. y Ortega A . Universidad Veracruzana, pp. 181-192.

Aldrich, M.S. (1992). Narcolepsy. *Neurology*, 42:34-43.

Aldrich, M.S. (2000). Chapter 1: Normal human sleep. En: *Sleep Medicine*. Oxford University Press, New York / Oxford, pp. 3-26.

Aldrich, M.S., Rogers, A.E. (1989). Exacerbation of human cataplexy by prazosin. *Sleep*, 12:254-256.

Alföldi, P., Tobler, I., Borbély, A.A. (1990). Sleep regulation in rats during early development. *American Journal of Physiology*, 258:R634-644.

Anch, A. M., Laposky, A.D. (2000). Rat sleep and eye movement density as a biological markers of demyelinating disease. *Physiology and Behavior*, 71:269-275.

Arias-Carrión, O., Murillo-Rodriguez, E., Xu, M., Blanco-Centurion, C., Drucker-Colín, R., Shiromani, P.J. (2004). Transplantation of hypocretin neurons into the pontine reticular formation: preliminary results. *Sleep*, 27:1465-1470.

Aserinsky, E., Kleitman, N. (2003). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena during sleep, 1953. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 15:454-455.

Babcock, D.A., Narver, E.L., Dement, W.C., Mitler, M.M. (1976). Effects of imipramine, chlorimipramine, and fluoxetine on cataplexy in dogs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 5:599-602.

Beuckmann, C.T., Sinton, C.M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Sakurai, T., Yanagisawa, M. (2004). Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in or exin n eurons i nduces nar colepsy-cataplexy i n t he r at. *Journal of Neuroscience*, 24:4469-4477.

Boehmer, L.N., Wu, M.F., John, J., Siegel, J.M. (2004). Tr eatment w ith immunosuppressive and ant i-inflammatory agent s d elays o nset of c anine gen etic narcolepsy and reduces symptom severity. *Experimental Neurology*, 188:292-299.

Bonansco, C., Fuenzalida, M., Olivares, V., Molina, C., Roncagliolo, M. (2007). Asynchronous t ransmission i n t he C A3-CA1 hi ppocampal s ynapses i n t he neurological mutant *taiep* rat. *Journal of Neuroscience Research*, 85:223-229.

Bonansco, C., Fuenzalida, M., Roncagliolo, M. (2004). Altered synaptic and electrical properties of lumbar motoneurons in the neurological glial mutant *taiep* rat. *Experimental Brain Research*, 156:104-110.

Borbely, A.A., Neuhaus, H.U. (1979). Sleep deprivation: Effects on sleep and EEG in the rat. *Journal Comparative of Physiology*, 133:71-87.

Cambell, S., Tobler, I. (1984). Animal s leep: a r eview of s leep dur ation ac ross phylogeny. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 8:269-300.

Carlson, N.R. (1999). C apítulo 4: N eurotransmisores y neur omoduladores. En: Fisiología de la conducta. Carlson N.R. Ed. Ariel, S.A. Barcelona, España. pp. 7-136.

Carskadon, M.A., Dement, W.C. (2000). Chapter 2: Normal Human Sleep an overview. En: *Principles and Practice of Sleep Medicine*. W.B. Saunders Co, pp. 15-25.

Centeno, M.L., Camacho, M.I. (1992). Determinación de la concentración de lípidos y proteínas totales en el SNC de la rata mutante neurológica Sprague-Dawley “*taiep*”. *Tesis de Licenciatura*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp. 57.

Chase, M.H. (2008). Confirmation of the consensus that glycinergic postsynaptic inhibition is responsible for the atonia of REM sleep. *Sleep*, 31:1487-1491.

Chase, M.H., Morales, F.R. (1990). The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annual Review of Psychology*, 41:557-584.

Chase, M.H., Soja, P.J., Morales, F. (1989). Evidence that glycine mediates the postsynaptic potentials that inhibit lumbar motoneurons during the atonia of active sleep. *The Journal of Neuroscience*, 9:743-751.

Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, Ch.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, Ch., Richardson, J.A., Williams, S.C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T.E., Nakazato, M., Hammer, R.E., Saper, C.B., Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in orexin knock-out mice: Molecular genetics on sleep regulation. *Cell*, 98:437-451.

Cooley, R.K., Vanderwolf, C.H. (1990). Stereotaxic surgery in the rat: A photographic series. Ed. Dobbyn C.P.L., pp. 20.

Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H. (2003). Acetylcholine En: The biochemical basis of neuropharmacology. Ed. Oxford University Press. 8a. Ed., pp.151-180.

Cortés, M.C., Arias-Montaña, J.A., Eguibar, J.R. (2007). Prazosin increases immobility episodes in *taiep* rats without changes in the properties of alpha-1 receptors. *Neuroscience Letters*, 412:159-162.

Cortés, M.C., Gavito, B., Ita, M.L., Valencia, J., Eguibar, J.R. (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse*, 58:95-101.

Couve, E., Cabello, F., Krsulovic, J., Roncagliolo, M. (1997). Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant *taiep* rat. *Journal of Neuroscience Research*, 47:573-581.

Datta, S., Siwek, D.F. (1997). Excitation of the brain stem pedunclopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *Journal of Neurophysiology*, 77:2975-2988.

De la Cruz, F., Russek, M., Junquera, J. (1990). Ontogeny of the endorphinergic and dopaminergic modulation on the immobility reflex by clamping in rats. *International Journal of Psychophysiology*, 9:171-177.

De la Cruz, F., Junquera, J. (1989). Potentiation by vestibular stimulation of the immobility reflex elicited by clamping in developing and adult rats. *Behavioural Brain Research*, 34:235-237.

Delashaw, J.B., Foutz, A.S., Guilleminault, C., Dement, W.C. (1979). Cholinergic mechanisms and cataplexy in dogs. *Experimental Neurology*, 6:745-757.

De Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., Frankel, W.N., van den Pol, A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M., Sutcliffe, J.G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:322-327.

De Lecea, L., Sutcliffe, J.G. (2005). The hypocretins and sleep. *FEBS Journal*, 272:5675-5688.

De Ryck, M., Schallert, T., Teitelbaum, P. (1980). Morphine versus haloperidol catalepsy in the rat: a behavioral analysis of postural support mechanisms. *Brain Research*, 201:143-172.

Duncan, I.D., Hoffman, R.L. (1997). Schwann cell invasion of the central nervous system of the myelin mutants. *Journal of Anatomy*, 190:35-49.

Duncan, I.D., Lunn, K.F., Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Brignolo-Holmes, L. (1992). The *taiep* rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *Journal of Neurocytology*, 21:870-884.

Ebrahim, I.O., Howard, R.S., Kopelman, M.D., Sharief, M.K., William, A.J. (2002). The hypocretin/orexin system. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95:227-230.

Eguibar, J.R., Cortés, M.C., Ita, M.L. (2009). Serotonergic-postsynaptic receptors modulate gripping-induced immobility episodes in male *taiep* rats. *Synapse*, 63:737-744.

Eguibar, J.R., Cortés, M.C., Lara-Lozano, M. (2010). Presynaptic dopaminergic agonists increased gripping-generated immobility episodes in the myelin-mutant *taiep* rat. *Neuroscience Letters*, 483:189-92.

Eguibar, J.R., Cortés, M.C., Valencia, J., Arias-Montaña, J.A. (2006). α -2 adrenoceptors are involved in the regulation of the gripping-induced immobility episodes in *taiep* rats. *Synapse*, 60:362-370.

Erro, E., Giménez-Amaya, J.M. (1999). Pedunculo-pontine tegmental nucleus. Anatomy, functional considerations and neuropathological implications. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 22:189-201.

Fernández-Guardiola, A., Calvo, J.M. (1998). Capítulo X : Sueño y vigilia. En: Fisiología: células, órganos y sistemas. 1ª. Ed., Muñoz-Martínez, E. J. et al. Ediciones Científicas Mexicanas, pp. 301-330.

Finger, S. (1994). Chapter 17: The process of sleep. En: Origins of neuroscience, A history of explorations into brain function. Oxford University Press, pp. 243-255.

Foutz, A.S., Mitler, M.M., Cavalli-Sforza, L.L., Dement, W.C. (1979). Genetic factors in canine narcolepsy. *Sleep*, 1:413-421.

Franken, P., Tobler, I., Borbély, A.A. (1991). Sleep homeostasis in the rat: simulation of the time course of EEG slow-wave activity. *Neuroscience Letters*, 130:141-144.

Fuller, P.M., Saper, C.B., Lu, J. (2007). The pontine REM switch: past and present. *Journal of Physiology*, 584:735-741.

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

García-Rill, E. (1991). The pedunculopontine nucleus. *Progress in Neurobiology*, 36:363-389.

Gavito, B. (2001). Efecto de la administración crónica de inhibidores de recaptura de aminas biogénicas sobre la inmovilidad inducida en la rata *taiep*. *Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp. 96.

Gerashchenko, D., Kohls, M.D., Greco, M.A., Waleh, N.S., Salín-Pascual, R., Kilduff, T.S., Lappi, D.A., Shiromani, P. (2001). Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 21:7273–7283.

Gilman, T.T., Marcuse, F.L. (1949). Animal hypnosis. *Psychological Bulletin*, 46:151-165.

Green, J.D., Aduini, A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *Journal of Neurophysiology*, 17:533-557.

Guilleminault, C., Anagnos, A. (2000) Narcolepsy. En: Principles and practice of sleep medicine. 3er.Ed. W.B. Saunders, Co. pp 676-686.

Haddad, F., Anouti, S., Maalouly, G., Koussa, S. (2010). Narcolepsy associated with systemic lupus erythematosus. *La revue de médecine interne*, 32:e114-e115.

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

Halliday, G., Harding, A., Paxinos, G. (2005). Chapter 34. Serotonin and tachykinin system. En: The rat nervous system. Second Ed. George Paxinos, pp. 929-974.

Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., Sakurai, T. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30:345-354.

Hartmann, E.L. (1973). The functions of sleep. Ed. Yale University, pp.198.

Hassenberg, L. (1965). Posiciones para dormir. Ruhe und Schlaf bei Säugetieren, Wittenberg Lutherstadt, Ziemsen Verlag. pp. 102.

Henneman, E. (1980). Chapter 26: Organization of the motoneuron pool. En: Medical physiology. Pp 718-741. 40th ed. Edited by Vernon B. Mountcastle.

Hobson, J.A., Lydic, R., Baghdoyan, H.A. (1986). Evolving concepts of sleep cycle generation: From brain centers to neuronal populations. *The Behavioral and Brain Sciences*. 9:371-448.

Hobson, J.A., McCarley, B.W., Wyzinski, P.W. (1975). Sleep cycle oscillation: Reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, 189:55-58.

Hogan, E.L., Greenfield, S. (1984). Chapter 14. Animal models of genetic disorders of myelin. En: Myelin. Ed. Pierre Morell. Plenum Press, pp 489-534.

Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Riboni, L., Vega-Saenz de Miera, E.C. (1989). Sprague-Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Laboratory of Animal Science*, 39:226-228.

Honda, K., Riehl, J, Mignot, E., Nishino, S. (1999). Dopamine D3 agonists into the substantia nigra aggravate cataplexy but do not modify sleep. *Neuroreport*, 10:3717-3724.

Houngaard, J., Hultborn, H., Jespersen, B., Kiehn, O. (1988). Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *Journal of Physiology*, 405:345-367.

Ita, M.L. (2011). Participación de los procesos homeostáticos y circádicos en los episodios de inmovilidad y el ciclo sueño-vigilia de la rata *taiep*. Relación con el sistema serotoninérgico. *Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 134.

Ita, M.L., Cortés, M.C., Eguibar, J.R. (2006). The effect of total sleep deprivation on the expression of spontaneous immobility episodes in *taiep* rat. *Society Neuroscience Abstract* # 361.16.

Ita, M.L., Cortés, M. del C., Valencia, J., Eguibar, J.R. (2009). Activation of serotonin 5-HT₁-receptors decreased gripping-induced immobility episodes in *taiep* rats. *Neuroscience Letters*, 449:147-50.

Jaffe, S.E. (2000). Chapter 92: Sleep and infectious diseases. En: *Principles and Practice of Sleep Medicine*. W.B. Saunders Co. pp. 1093-1102.

Jones, B.E. (1991). Paradoxical sleep and its chemical substrates in the brain. *Neuroscience*, 40:637-656.

Jones, B.E. (2005). From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends in Pharmacological Science*, 26:578-586.

Jones, S., Sudweeks, S., Yakel, J.L. (1999). Nicotinic receptors in the brain. Correlating physiology with function. *Trends in Neuroscience*, 22:555-561.

Jouvet, M. (1967). Neurophysiology of the states of sleep. *Physiological Reviews*, 47:117-177.

Junquera, J., Ramirez, M.G., De la Cruz, F. (1989). Quantitative measurement of motor activity during the immobility reflex elicited by clamping in developing rats. *Behavioural Brain Research*, 33:111-112.

Kaitin, K.I., Kilduff, T.S., Dement, W.C. (1986a). Evidence for excessive sleepiness in canine narcoleptics. *Electroencephalographic and Clinical Neurophysiology*, 64: 477-454.

Kaitin, K.I., Kilduff, T.S., Dement, W.C. (1986b). Sleep fragmentation in canine narcolepsy. *Sleep*, 9:116-119.

Kalogiannis, M., Hsu, E., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Kisanuki, Y.Y., Yanagisawa, M., Leonard, C.S. (2011). Cholinergic modulation of narcoleptic attacks in double orexin receptor knockout mice. *PLoS One*, 6:e18697.

Kambayashi, T., Arii, J., Kondo, H., Shimizu, T., Nishino S. (2006). Chapter 21: Hypocretin status in neurological disorders in relation to excessive sleepiness and cataplexy. En: The orexin/hypocretin system. Physiology and pathophysiology. Ed. Nishino S. and Sakurai T. Humana Press. New Jersey. pp. 287-316.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000). Ganglios basales. En: Principios de neurociencia. Mc Graw-Hill Co. España, pp. 853-867.

Kayama, Y., Ohta, M., Jodo, E. (1992). Firing of "possibly" cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Research*, 569:210-220.

Keam, S., Walker, M.C. (2007). Therapies for narcolepsy with or without cataplexy: evidence-based. *Current Opinion Neurology*, 20:699-703.

Kilduff, T.S., Bowersox, S.S., Kaitin, K.I., Baker, T.L., Ciaranello, R.D., Dement, W.C. (1986). Muscarinic cholinergic receptors and the canine model of narcolepsy. *Sleep*, 9:102-106.

Klemm, W.R. (1965). Potentiation of "animal" hypnosis" with low levels of electric current. *Animal Behaviour*, 13:571-574.

Klemm, W.R. (1971a). Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). *Neuroscience Research*, 4:165-212.

Klemm, W.R. (1971b). EEG and multiple-unit activity in limbic and motor systems during movement and immobility. *Physiology and Behavior*, 7:337-343.

Klemm WR. (1976). Identity of sensory and motor systems that are critical to the immobility reflex ("animal hypnosis"). *Journal of Neuroscience Research*, 2:57-69.

Klemm, W.R. (1990). Behavioral inhibition. En: Brainstem mechanisms of behavior. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp. 497-534.

Kramis, R., Vanderwolf, C.H., Bland, B.H. (1975). Two types of hippocampal rhythmical slow activity (RSA) in both the rabbit and the rat: Relations to behavior and effects of atropine diethyl ether, urethane and pentobarbital. *Experimental Neurology*, 49:58-85.

Krsulovic, J., Couve, E., Roncagliolo, M. (1999). Dysmyelination, demyelination and reactive astrogliosis in the optic nerve of the *taiep* rat. *Journal of Biological Research*, 32:253-262.

Kushida, C.A., Baker, T.L., Dement, W.C. (1985). Electroencephalographic correlates of cataplectic attacks in narcoleptic canines. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 61:61-70.

Lagrange, A.H., Blaivas, M., Gomez-Hassan, D., Malow, B.A. (2003). Rasmussen's syndrome and new-onset narcolepsy, cataplexy, and epilepsy in an adult. *Epilepsy and Behavior*, 4:788-792.

Lakin-Thomas, P.L. (2006). New models for circadian systems in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 259:1-6.

Lara-Lozano M. (2011). Efecto de sustancias promotoras de la vigilia sobre el ciclo sueño-vigilia y en los episodios de inmovilidad en el mutante de la mielina *taiep* Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 110.

León-Chavez, B.A., Aguilar-Alonso, P., Gonzalez-Barrios, J.A., Eguibar, J.R., Ugarte, A., Brambila, E., Ruiz-Arguelles, A., Martinez-Fong, D. (2006). Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the *taiep* rat during its severe demyelination stage. *Brain Research*, 1121:221-230.

León-Chávez, B.A., Gonzalez -Barrios J.A., Ugarte, A., Meraz, M.A., Martinez-Fong, D. (2003). Evidence in vitro of glial cell priming in the *taiep* rat. *Brain Research*, 965:274-278.

León-Chavez, B.A., Guevara, J., Galindo, S., Luna, J., Ugarte, A., Villegas, O., Mena, R., Eguibar, J.R., Martinez-Fong, D. (2001). Regional and temporal progression of reactive astrocytosis in the brain of the myelin mutant *taiep* rat. *Brain Research*, 900:152-155.

Lesku, J.A., Martínez-González, D., Rattenborg, N.C., Tarokh, L., Carskadon, M.A., Rissling, M., Ancoli-Israel, S. (2009). Section III: Ontogeny and Phylogeny of sleep. En: *The Neuroscience of sleep*. Ed. Academic Press. pp 60-84.

Li, F.Y., Song, J., Duncan, I.D. (2003). Mapping of *taiep* rat phenotype to rat Chromosome 9. *Mammalian Genome*, 14:703-705.

Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P.J., Nishino, S., Mignot, E. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98:365-376.

Lindvall, O., Björklund, A. (1983). Anatomy in the rat brain. En: Chemical Neuroanatomy. Editor Emson P.C.. Raven Press New York, pp. 229-255.

Llinás, R.R., Steriade, M. (2006). Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *Journal of Neurophysiology*, 95:3297-3308.

Lu, J., Greco, M.A., Shiromani, P., Saper, C.B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *The Journal of Neuroscience*, 20:3830-3842.

Lucas, E.A., Foutz, A.S., Dement, W.C., Mitler, M.M. (1979). Sleep cycle organization in narcoleptic and normal dogs. *Physiology and Behavior*, 23:737-743.

Lunn, K.F., Clayton, M.K., Duncan, I.D. (1997). The temporal progression of the myelination defect in the *taiep* rat. *Journal of Neurocytology*, 26:267-281.

Luppi P.H., Boissard R., Gervasoni D., Verret L., Goutagny R., Peyron Ch., Salvert D., Léger L., Barbagli B., Fort P. (2005). Capítulo 5: The network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: A new theory based on the head-restrained rat model. En: Sleep. Circuit and functions. Ed. Luppi P.H. CRC Press, pp. 83-108.

Magoun, H.W. (1948). Regional physiology of the central nervous system. *Progress in Neurology and Psychiatry*, 3:51-62.

Magoun, H.W., Rhines, R. (1946). An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation. *Journal of Neurophysiology*, 9:165-171.

Maloney, K.J., Cape, E.G., Gotman, J., Jones, B.E. (1997). High-frequency gamma electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience*, 76:541-555.

Marcus J. N., Elmquist J. K. (2006). Chapter 3. Orexin projections and localization of orexin receptors. In: *The orexin/hypocretin system*. Ed. Nishino S. and Sakurai T. Humana Press, pp. 21-43.

Marks, G.A., Shaffery, J.P., Oksenberg, A., Speciale, S.G., Roffwarg, H.P. (1995). A functional role for REM sleep in brain maturation. *Behavioural Brain Research*, 69:1-11.

Middelkoop, H.A., Lammers, G.J., Van-Hilten, B.J., Ruwhof, C., Pijl, H., Kamphuisen, H.A. (1995). Circadian distribution of motor activity and immobility in narcolepsy: assessment with continuous motor activity monitoring. *Psychophysiology*, 32:286-291.

Mieda, M., Yanagisawa, M. (2002). Sleep, feeding, and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 12:339-345.

Mignot, E., Guilleminault, C., Bowersox, S., Frusthofer, B., Nishino, S., Maddaluno, J., Ciaranello, R., Dement, W.C. (1989). Central alpha 1 adrenoceptor subtypes in narcolepsy-cataplexy: a disorder of REM sleep. *Brain Research*, 490:186-191.

Mignot, E., Guilleminault, C., Bowersox, S., Rappaport, A., Dement, W.C. (1988). Role of central alpha-1 adrenoceptors in canine narcolepsy. *Journal of Clinical Investigation*, 82:885-894.

Mignot, E., Hayduk, R., Black, J., Grumet, F.C., Guilleminault, C. (1997). HLA DQB1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep*, 20: 1012-1020.

Mignot, E., Taheri, S., Nishino, S. (2002). Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nature Neuroscience*, 5:1071-1075.

Mileykovskiy, B.Y., Kiyashchenko, L.I., Siegel, J.M. (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, 46:787-798.

Mitler, M.M., Dement, W.C. (1977). Sleep studies on canine narcolepsy: pattern and cycle comparisons between affected and normal dogs. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 43:691-699.

Möller, J.R., Durr, P.G., Quarles, R.H., Duncan, I.D. (1997). Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neurological mutant: the *taiep* rat. *Journal of Neurochemistry*. 69:773-779.

Morales, B. (2000). Evaluación de las respuestas sinápticas espinales y de los cambios de frecuencia del temblor antes y después de la administración de 4-aminopiridina en ratas *taiep* de 2 a 3 meses de edad. *Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp. 80.

Mori S. (1987). Integration of posture and locomotion in acute decerebrate cats and in awake, freely moving cats. *Progress in Neurobiology*, 28:161-195.

Mori, S. (1989). Contribution of postural muscle tone of full expression of posture and locomotor movements: Multi-faceted analyses of its setting brainstem-spinal cord mechanism in the cat. *Japanese Journal of Physiology*, 39:785-809.

Mori, S., Iwakiri, H., Homma, Y., Yokoyama, T., Matsuyama, K. (1995). Neuroanatomical and neurophysiological bases of postural control. *Advance of Neurology*, 67:289-303.

Moruzzi, G., Magoun, H.W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 4:455-473.

Nakamura, T., Uramura, K., Nambu, T., Yada, T., Goto, K., Yanagisawa, M., Sakurai, T. (2000). Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Research*, 873:181-187.

Nieuwenhuys, R. (1985). Chapter 3. Survey of chemically defined cell groups and pathways. En: Chemoarchitecture of the brain. Ed. Springer-Verlag. pp.7-108.

Nishino, S. (2005). Chapter 4. The canine model of narcolepsy. In: Hypocretins. Integrators of physiological functions. Ed. Springer, pp.39-58.

Nishino, S., Arrigoni, J., Shelton, J., Dement, W.C., Mignot, E. (1993 a). Desmethyl metabolites of serotonergic uptake inhibitors are more potent for suppressing canine cataplexy than their parent compounds. *Sleep*, 16:706-712.

Nishino, S., Arrigoni, J., Valtier, D., Miller, J.D., Guilleminault, C., Dement, W.C., Mignot, E. (1991). Dopamine D₂ mechanisms in canine narcolepsy. *Journal of Neuroscience*, 11:2666-2671.

Nishino, S., Fruhstorfer, B., Arrigoni, J., Guilleminault, C., Dement, W.C., Mignot, E. (1993 b). Further characterization of the alpha-1 receptor subtype involved in the regulation of cataplexy in canine narcolepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264:1079-1084.

Nishino, S., Haak, L., Sheperd, H., Guilleminault, V., Sakai, T., Dement, W.C., Mignot, E. (1990). Effects of central alpha-2 adrenergic compounds on canine narcolepsy and disorders of rapid eye movement sleep. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 253:1145-1152.

Nishino, S., Kanbayashi, T. (2005). Symptomatic narcolepsy, cataplexy, and hypersomnia, and their implications in the hypothalamic hypocretin/hypocretin system. *Sleep Medicine Reviews*, 9:269-310.

Nishino, S., Mignot, E. (1997). Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Progress in Neurobiology*, 52:27-78.

Nishino, S., Okuro, M., Kotoril, N., Anehawa, E., Ishimaru, Y., Matsumura, M., Kanbayashi, T. (2010). Hypocretin/orexin and narcolepsy: new basic and clinical insights. *Acta Physiologica*, 198:209-222.

Nishino, S., Okura, M., Mignot, E. (2000a). Narcolepsy: genetic predisposition and neuropharmacological mechanisms. *Sleep Medicine Reviews*, 4:57-99.

Nishino, S., Riehl, J., Hong, J., Kwan, M., Reid, M., Mignot, E. (2000b). Is narcolepsy REM sleep disorder? A analysis of sleep abnormalities in narcoleptic Döbermans. *Neuroscience Research* 38:437-446.

Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G.J., Mignot, E. (2000c). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet*, 355:39-40.

Nishino, S., Shelton, J., Renaud, A., Dement, W.C., Mignot, E. (1995). Effect of 5-HT_{1A} receptor agonists and antagonists on canine cataplexy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272:1170-1175.

Nishino, S., Tafti, M., Sampathkumaran, R., Dement, W.C., Mignot, E. (1997). Circadian distribution of rest/activity in narcoleptic and control dogs: assessment with ambulatory activity monitoring. *Journal of Sleep Research*, 6:120-127.

O'Connor, L.T., Gotees, B.D., Couve, E., Song, J., Duncan, I.D. (2000). Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the *taiep* rat. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16:396-407.

Okura, M., Riehl, J., Mignot, E., Nishino, S. (2000). Sulpiride, a D₂/D₃ blocker, reduces cataplexy but not REM sleep in canine narcolepsy. *Neuropsychopharmacology*, 23:528-38.

Overeem, S., Mignot, E., Gert, van Dijk, J., Lammers, G.J. (2001). Narcolepsy: clinical features, new pathophysiological insights, and future perspectives. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 18:78-105.

Pablos, J.L., del Rincon, E., Francisco, F., Mateo, I. (1993). Narcolepsy in systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology*, 20:375-376.

Pace-Schott, E.F., Hobson, J.A. (2002). The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 3:591-605.

Paxinos, G., Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. Ed. Academic Press. pp. 246.

Peyron, Ch., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G.J., Bouras, C., Kucherlapati, R., Nishino, S., Mignot, E. (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Medicine*, 6:991-997.

Perrier, J.F., Hounsgaard, J. (2003). 5-HT₂ receptors promote plateau potentials in turtle spinal motoneurons by facilitating an L-type calcium current. *Journal of Neurophysiology*, 89:954-959.

Powell E., Anch A.M., Dyche J., Bloom C., Richtert R.R. (1999). The splay angle: A new measure for assessing neuromuscular dysfunction in rats. *Physiology and Behavior*, 67:819-821.

Prieto, G.J., Urbá-Holmgren, R., Holmgren, B. (1991). Sleep and EEG disturbances in a rat neurological mutant (*taiep*) with immobility episodes: A model of narcolepsy-cataplexy. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 79:141-147.

Rakshit, A., Klemm, W.R. (1980). Depth-duration profile of the immobility reflex: theoretical implications for its triggering, sustaining, and terminating mechanisms. *Journal of Neurosciences Research*, 5:253-262.

Reid, M.S., Geary, J.N., Siegel, J.S., Dement, W.C., Mignot, E. (1992). Acetylcholine release in the medial pontine reticular formation is enhanced during cataplexy in the narcoleptic canine. *Sleep Research*, 21:253

Reid, M.S., Siegel, J.M., Dement, W.C., Mignot, E. (1994b). Cholinergic mechanism in canine narcolepsy-II. Acetylcholine release in the pontine reticular formation is enhanced during cataplexy. *Neuroscience*, 59:523-530.

Reid, M.S., Tafti, M., Geary, J.N., Nishini, S., Siegel, J.M., Dement, W.C., Mignot, E. (1994a). Cholinergic mechanism in canine narcolepsy-I. Modulation of cataplexy via local drug administration into the pontine reticular formation. *Neuroscience*, 59:511-522.

Riehl, J., Choi, S., Mignot, E., Nishino, S. (1999). Changes with age in severity of cataplexy and in sleep/wake fragmentation in narcoleptic Doberman pinschers. *Sleep*, 22S:S3.

Riehl, J., Nishino, S., Cederberg, R., Dement, W.C., Mignot, E. (1998). Development of cataplexy in genetically narcoleptic Dobermans. *Experimental Neurology*, 152:292-302.

Rhines, R., Magoun, H.W. (1946). Brain stem facilitation of cortical motor response. *Journal of Neurophysiology*, 9:219-229.

Roenneberg, T., Merrow, M. (2003). The network of time: Understanding the Molecular Circadian System. *Current Biology*, 13:R198-R207.

Roncagliolo, M., Benitez, J., Eguibar, J.R. (2000). Progressive deterioration of central components of auditory brainstem responses during postnatal development of the myelin mutant *taiep* rat. *Audiology Neuro-Otology*, 5:267-275.

Roncagliolo, M., Fuenzalida, M., Bonnansco, C., Díaz, I., Eguibar, J.R. (2002). Myelin mutant *taiep* rats show an alteration in the spinal cord (SC) monosynaptic responses. *Glia*, 36:108.

Roncagliolo, M., Schlageter, C., León, C., Couve, E., Bonansco, C., Eguibar, J.R. (2006). Developmental impairment of compound action potential in the optic nerve of myelin mutant *taiep* rats. *Brain Research*, 1067:78-84.

Sakai, K., Sastre, J.P., Kanamori, M., Jouvet, M. (1981). State-specific neurones in the pontomedullary reticular formation with especial reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. En: Brain Mechanisms of perceptual awareness and purposeful behaviour. Pompeiano O. and Amigone Marsan C. Eds. Raven Press, New York, pp. 405-429.

Sakurai, T. (2002). Role of orexins in regulation of feeding and wakefulness. *Neuroreport*, 13:987-995.

Sakurai, T. (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Reviews Neuroscience*, 8:171-181.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlovski, G.P., Wolson, S., Arch, J.R.S., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J., Yanagisawa, M. (1998). Orexins and

orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G Protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92:573-585.

Sakurai, T., Mieda M., Yanagisawa M. (2005). Chapter 3: Rodent models of human narcolepsy-cataplexy. En: *Hypocretins: Integrators of physiological functions*. De Lecea L. & Sutcliffe J.G. Ed. Springer., pp. 27-38.

Sakurai, T., Moriguchi, T., Furuya, K., Kajiwara, N., Nakamura, T., Yanagisawa, M., Goto, K. (1999). Structure and function of human prepro-orexin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:17771-17776.

Saper, C.B. (2006). Staying awake for dinner: hypothalamic integration of sleep, feeding, and circadian rhythms. *Progress in Brain Research*, 153:243-252.

Saper, C.B., Chou, T.C., Scammell, T.E. (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends in Neuroscience*, 24:726-731.

Scammell, T.E., Willie, J.T., Guilleminault, C., Siegel, J.M. (2009). A consensus definition of cataplexy in mouse models of narcolepsy. *Sleep*, 32:111-116.

Shik, M.L., Orlovsky, G.N. (1976). Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiological Reviews*, 56:465-501.

Siegel, J.M. (2000). Chapter 9: Brainstem mechanisms generating REM sleep, En: *Principles and practice of Sleep Medicine*. 3a. Ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia, pp. 112-133.

Siegel, J.M., Nienhuis, R., Gulyani, S., Ouyang, S., Wu, M.F., Mignot, E., Switzer, R.C., McMurry, G., Cornford, M. (1999). Neuronal degeneration in canine narcolepsy. *Journal of Neuroscience*, 19:248-257.

Snedecor, G.W., Cochran, W.G. (1989). Statistical methods. 8th Ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. USA. pp. 503.

Song, J., Carson, J.H., Barbarese, E., Li, F.Y., Duncan, I.D. (2003). RNA transport in oligodendrocytes from the *taiep* mutant rat. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24:926-938.

Song, J., Goetz, B.D., Kirvell, S.L., Butt, A.M., Duncan, I.D. (2001). Selective myelin defects in the anterior medullary velum of the *taiep* rat. *Glia*, 33:1-11.

Song, J., O'Connor, L.T., Yu, W., Baas, P.W., Duncan, I.D. (1999). Microtubule alterations in cultured *taiep* rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation. *Journal of Neurocytology*, 28:671-683.

Steriade, M. (1996). Arousal: Revisiting the reticular activating system. *Science*, 272:225-226.

Steriade, M., Timofeev, L., Grenier, F. (2001). Natural waking and sleep states: A view from inside neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, 85:1969-1985.

Takakusaki K. (2008). Forebrain control of locomotor behaviors. *Brain Research Reviews*, 57:192-198.

Takakusaki, K., Saitoh, K., Harada, H., Okumura, T., Sakamoto, T. (2004). Evidence for a role of basal ganglia in the regulation of rapid eye movement sleep by electrical and chemical stimulation for the pedunculo-pontine tegmental nucleus and the substantia nigra pars reticulata in decerebrate cats. *Neuroscience*, 124:207-220.

Teitelbaum, P., Schallert, T., Whishaw, I.Q. (1983). Chapter 2. Sources of spontaneity in motivated behavior. In: Handbook of Behavioural Neurobiology Motivation. Vol. 6. Satinoff, E. and Teitelbaum, P., Eds. New York: Plenum, pp. 23-61.

Thannickal, T.C., Moore, R.Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., Siegel, J.M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27:469-474.

Toriz, C.G., Ita, M.L., Cortés, M.C., Eguibar, J.R. (2005). Circadian rhythm in drinking behavior on *taiep* rat. *Society Neuroscience, Abstract # 767.7*.

Urbá-Holmgren, R., Trucios, N., Holmgren, B., Eguibar, J.R., Gavito, A., Cruz, G., Santos, A. (1990). Genotypic dependency of spontaneous yawning frequency in the rat. *Behavioural Brain Research*, 40:29-35.

Urbá-Holmgren, R., Santos, A., Holmgren, B., Eguibar, J.R. (1993). Two inbred rat sublines that differ in spontaneous yawning behavior also differ in their responses to cholinergic and dopaminergic drugs. *Behavioural Brain Research*, 56:155-159.

Valencia, J., Aceves, J. (1992). Spontaneous rigidity recorded in a mutant rat (*taiep*) with immobility episodes. 22nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Anaheim CA, Resumen 668.11.

Vanderwolf, C.H. (1975). Neocortical and hippocampal activation in relation to behavior: Effects of atropine, serine, phenothiazines and amphetamine. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88:300-332.

Vanderwolf, C.H. (1983). Chapter 3. The role of the cerebral cortex and ascending activating systems in the control of behavior. En: *Handbook of Behavioural Neurobiology Motivation*. Vol. 6. Satinoff, E. and Teitelbaum, P., Eds. New York: Plenum, pp. 67-104.

Verkhatsky A. y Butt A. (2007). Chapter 3: Morphology of glial cells. En: *Glial Neurobiology*. Wiley & Sons Ltd. Ed. Pp. 21-28.

Vienne, J., Bettler, B., Franken, P., Tafti, M. (2010). Differential effects of GABA_B receptor subtypes, γ -hydroxybutyric Acid, and Baclofen on EEG activity and sleep regulation. *The Journal of Neuroscience*, 30:14194-204.

Vgontzas, A.N., Kales, A. (1999). Sleep and its disorders. *Annual Review Medicine*, 50:387-400.

Weitzman, E.D. (1981). Sleep and its disorders. *Annual Review Neuroscience*, 4:381-417.

Wilkins, A., Kondo, Y., Song, J., Liu, S., Compston, A., Black, J.A., Waxman, S.G., Duncan, I.D. (2010). Slowly progressive axonal degeneration in a rat model of chronic, nonimmune-mediated demyelination. *Journal Neuropathology and Experimental Neurology*, 69:1256-1269.

Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Tokita, S., Williams, S.C., Kisanuki, Y.Y., Marcus, J.N., Lee, C., Elmquist, J.K., Kohlmeier, K.A., Leonard, C.S., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Yanagisawa, M. (2003). Distinct narcolepsy syndromes in orexin receptor-2 and orexin null mice: Molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*, 38:715-730.

Yamanaka, A., Tsujino, N., Funahashi, H., Honda, K., Guan, J.L., Wang, Q.P., Tominaga, M., Goto, K., Shioda, S., Sakurai, T. (2002). Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290:1237-1245.

Yamuy, J., Fung, S.J., Xi, M., Chase, M.H. (2004). Hypocretinergic control of spinal cord motoneurons. *The Journal of Neuroscience*, 24:5336-5345.

Yamuy, J., Fung, S.J., Xi, M., Chase, M.H. (2010). State-dependent control of lumbar motoneurons by the hypocretinergic system. *Experimental Neurology*, 221:335-345.

Zlomanczuk, P., Schwartz, W.J. (1999). Chapter 10. Cellular and molecular mechanisms of circadian rhythms in mammals. In: Regulation of sleep and circadian rhythms. Ed. Turek F.W. and Zee P.C. Marcel Dekker, Inc. pp. 309-342.