

03062
5
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

EVALUACION NEUROQUIMICA DE LA TRANSMISION SINAPTICA EN LA
FORMACION RETICULAR PONTINA DE LA RATA Y SUS IMPLICACIONES EN EL
CICLO SUENO-VIGILIA.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(AREA NEUROCIENCIAS)
PRESENTA

IGNACIO CAMACHO ARROYO

FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: Dr. RICARDO TAPIA I.

MEXICO

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se llevó a cabo en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y en la Unidad de Investigaciones Cerebrales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud, bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia I. y fue apoyada por una beca de maestría otorgada por el CONACYT.

Los experimentos realizados en el Instituto de Neurología fueron asesorados por el Dr. Raúl Alvarado C.

Se agradece el apoyo de los colaboradores del Dr. Tapia y del Dr. Alvarado en las diferentes etapas del trabajo de investigación, particularmente a la bióloga Patricia Salazar S. por su participación en la determinación de los niveles de aminoácidos en la formación reticular pontina y al biólogo Joaquín Manjarrez M. por su colaboración en los registros de sueño.

Se agradece la revisión del idioma de las primeras versiones de los manuscritos en inglés realizada por la profesora Flora Itzel García-Formenti Mansilla del Centro de Enseñanza de Lenguas Extranjeras de la UNAM.

Se dan las gracias también a los doctores Herminia Pasantes, Simón Brailowsky, León Cintra, Diego González y Ricardo Tapia por la revisión de esta tesis y su participación como miembros del jurado de la misma.

INDICE

| | |
|-------------------------------|-----|
| RESUMEN DEL TRABAJO..... | 5-6 |
| ORGANIZACION DE LA TESIS..... | 7 |

1. ANTECEDENTES.

1.1.0. LA FORMACION RETICULAR

| | |
|---|-----|
| 1.1.1. Aspectos anatómicos y fisiológicos de la formación reticular..... | 8-9 |
|---|-----|

1.2.0. LA FORMACION RETICULAR PONTINA (FRP).

| | |
|--|-------|
| 1.2.1. Organización anatómica de la FRP..... | 10 |
| 1.2.2. Conexiones de la FRP..... | 11-12 |
| 1.2.3. Participación de la FRP en la fisiología de los mamíferos..... | 12-14 |
| 1.2.4. Neurotransmisores de la FRP..... | 14-17 |

1.3.0. SUEÑO.

| | |
|---|-------|
| 1.3.1. Características del ciclo sueño-vigilia..... | 18-19 |
| 1.3.2. La FRP y la regulación del ciclo sueño-vigilia..... | 19-21 |
| 1.3.3. Papel del ácido γ -aminobutírico (GABA) en el ciclo sueño-vigilia..... | 21-22 |

1.4.0. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

| | |
|---|-------|
| 1.4.1. Objetivos y planteamiento del estudio..... | 22-24 |
|---|-------|

2. ARTICULOS.

- Camacho-Arroyo, I., Alvarado, R. and Tapia, R. 1991. Release of acetylcholine and GABA, and activity of their synthesizing enzymes in the rat pontine reticular formation. Neurochemical Research. 16:837-841.

- Camacho-Arroyo, I., Alvarado, R., Manjarrez, J. and Iapia, R. 1991. Microinjections of muscimol and bicuculline into the pontine reticular formation modify the sleep-waking cycle in the rat. Neuroscience Letters, 129:95-97.
- Camacho-Arroyo, I. and Iapia, R. 1991. Levels, uptake and release of glycine and glutamate in the rat pontine reticular formation. (Enviado para su publicación a Neurochemical Research).

3. DISCUSION.

3.1.0. DISCUSION GENERAL.

- 3.1.1. Datos neuroquímicos y electrofisiológicos.....25-32
- 3.1.2. Perspectivas del estudio.....33-34

4. REFERENCIAS.

- 4.1. Literatura citada en la tesis.....35-46

RESUMEN DEL TRABAJO.

La formación reticular pontina (FRP) es una región del tallo cerebral que participa en diversos eventos fisiológicos de los mamíferos, entre los que se encuentran el sueño, los movimientos oculares y de cabeza y la actividad motora. Estudios farmacológicos y electrofisiológicos han demostrado que la transmisión colinérgica en la FRP está involucrada en la regulación de la fase de sueño paradójico. Sin embargo se carece de datos neuroquímicos sobre los posibles neurotransmisores que actúan en esta región.

En este trabajo se realizó un estudio bioquímico de la neurotransmisión mediada por la acetilcolina, el ácido γ -aminobutírico (GABA), la glicina y el glutamato, con el fin de contribuir al conocimiento acerca de la participación de estas sustancias como posibles neurotransmisores en la FRP de la rata. Con este propósito, se caracterizó la captura de colina (precursor de la acetilcolina) y de los tres aminoácidos ya mencionados, así como la liberación de los cuatro neurotransmisores, en rebanadas de la FRP.

Por otra parte en homogenados de esta región se cuantificó la actividad de las enzimas que participan en la síntesis (colina acetiltransferasa) y la degradación (acetilcolinesterasa) de la acetilcolina, y en la síntesis (glutamato descarboxilasa) del GABA. Además, se determinaron los niveles de aminoácidos libres por cromatografía líquida de alta resolución.

Por otro lado, con el fin de obtener información sobre el papel fisiológico de la transmisión GABAérgica en la FRP, se analizaron los efectos de las microinyecciones en esta región de

un agonista (muscimol) y un antagonista (bicuculina) del receptor GABA_A, sobre el ciclo sueño-vigilia de la rata.

La captura de GABA, glicina y glutamato fue totalmente dependiente de Na⁺, mientras que en el caso de la colina la dependencia a este ión fue parcial. La liberación de los cuatro neurotransmisores se estimuló por despolarización con una alta concentración de K⁺ y fue estrictamente dependiente de Ca²⁺ en el caso de la acetilcolina y de la glicina e independiente de éste en el caso del GABA y del glutamato.

Los ensayos enzimáticos demostraron una actividad importante de las enzimas involucradas en el metabolismo del GABA y de la acetilcolina, comparable a la de otras regiones cerebrales que funcionan con estos neurotransmisores. El análisis de los aminoácidos reveló que el glutamato fue el más abundante en la FRP, aunque sus niveles fueron menores que en el estriado. El contenido de GABA fue similar en ambas estructuras, mientras que la concentración de glicina fue 3 veces mayor en la FRP que en el estriado.

En el registro del ciclo sueño-vigilia se observó un incremento en la fase de vigilia producido por el muscimol y una tendencia a la inducción de la fase de sueño de ondas lentas provocada por la bicuculina.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la acetilcolina, el GABA, la glicina y el glutamato participan como neurotransmisores en la FRP y que la transmisión GABAérgica en esta región está involucrada en la regulación de la vigilia de la rata.

1.2. Organización de la tesis.

Esta tesis está dividida en tres secciones principales. En la primera de ellas se revisan los antecedentes más importantes del problema en estudio, incluyendo los datos anatómicos, fisiológicos y bioquímicos de la formación reticular pontina, así como la participación de esta región y de la transmisión GABAérgica en la regulación del ciclo sueño-vigilia. Al final de la misma se plantean los objetivos del estudio y la manera en que se pretendió cubrirlos.

En la segunda sección se presentan los tres artículos derivados del trabajo experimental. En ellos se detallan tanto los materiales y métodos utilizados como los resultados obtenidos.

Dos de los trabajos están ya publicados, del artículo que apareció en la revista Neurochemical Research se presentan copias de las pruebas de imprenta ya que no han llegado al país ni la revista ni los sobretiros del artículo mientras que de la publicación en la revista Neuroscience Letters se incluyen ya las fotocopias de la misma. En el caso del tercer artículo se presentan las copias del manuscrito que se envió para su publicación a la revista Neurochemical Research en el mes de mayo de este año y que en este momento se encuentra en revisión.

En la sección final se presenta una Discusión General del trabajo, en la que se incluyen los futuros experimentos que proporcionarán una visión más clara de la neurotransmisión en la formación reticular pontina.

1. ANTECEDENTES.

1.1.0. LA FORMACION RETICULAR.

1.1.1. Aspectos anatómicos y fisiológicos de la formación reticular.

La formación reticular (FR) es una de las estructuras cerebrales más conservadas en el transcurso de la evolución de los vertebrados; se encuentra desde los peces hasta los mamíferos, en estos últimos se ha enriquecido con neuronas y fibras que conectan a la médula espinal con las regiones evolutivamente más recientes como la neocorteza.

El término FR se acuñó a finales del siglo pasado con base en el estudio morfológico del tallo cerebral, que en su parte central mostraba la presencia de una masa de fibras dispuestas en forma de red con neuronas de diferentes tamaños dispersas en ella (1).

La FR es un sistema multineuronal y polisináptico situado a lo largo de la parte central del tallo cerebral. Se extiende desde la región más caudal del bulbo hasta el diencéfalo en donde se relaciona con el sistema reticular talámico. Las neuronas que conforman a la FR se encuentran dispersas en una red abundante de fibras o agrupadas en núcleos comunicados entre sí por cortas cadenas de axones que permiten la integración de diferentes estímulos. (2).

Durante muchos años se concibió a la FR como un sistema de neuronas difuso, uniforme y no especializado; sin embargo estudios citoarquitectónicos, histológicos y fisiológicos han modificado esta visión al poder identificar varios núcleos en la

FR con base en el tamaño, densidad y orientación de las células, patrón de arborización dendrítica, sus conexiones específicas y su papel fisiológico (3,4,5).

En la FR se encuentran neuronas cuyos largos axones y dendritas se dividen dicotómicamente para dar origen a una rama ascendente y otra descendente que se comunican con la corteza cerebral y con la médula espinal, de manera tal que la FR puede modificar la actividad de regiones cerebrales tanto anteriores como posteriores (6).

La función de la FR se empezó a conocer a finales de la década de 1940 cuando Moruzzi y Magoun demostraron que la estimulación eléctrica de la FR producía una activación de la corteza cerebral que inducía la aparición del estado de vigilia en gatos somnolientos, mientras que la lesión de esta estructura provocaba un estado de coma, lo que llevó a proponer la existencia de un sistema reticular activador que mantiene el estado de alerta y de conciencia en los mamíferos (1,7,8).

Desde entonces se han realizado una gran cantidad de estudios sobre la FR que han demostrado la participación de sus núcleos en diversos procesos fisiológicos entre los que están la actividad motora, la respiración, la actividad cardiovascular, los reflejos viscerales, el dolor, la transmisión e integración de diferentes tipos de estimulación sensorial, el ciclo sueño-vigilia, la atención, el estado de conciencia, la memoria y el aprendizaje (9).

1.2.0. LA FORMACION RETICULAR PONTINA (FRP).

1.2.1. Organización anatómica de la FRP.

La formación reticular a nivel pontino (FRP) está formada por los núcleos: reticular caudal pontino, oral pontino, ventral tegmental, pedúnculo pontino y paralamniscal (3). Los dos primeros comprenden la mayor parte de la FRP y son los núcleos estudiados en el presente trabajo. Ambos se encuentran en la porción medial de la FRP (correspondiente al campo tegmental gigantocelular del gato) (Fig. 1).

El núcleo reticular caudal pontino se localiza en la región más posterior de la FRP, limita caudalmente con el núcleo gigantocelular y se extiende rostralmente desde el polo caudal del cuerpo trapezoide a nivel de la salida del nervio facial hasta la unión de los tercios medial y rostral del núcleo motor del trigémino.

La característica distintiva de este núcleo es la presencia de neuronas gigantes ($> 65 \mu\text{m}$) en su porción central. Las somas de algunas de estas neuronas tienen un diámetro de $100 \mu\text{m}$ y constituyen las neuronas más grandes de la FR (3,4).

El núcleo reticular oral pontino está limitado a nivel caudal por la porción más anterior del pontis caudalis y se extiende desde el polo rostral del núcleo motor del trigémino hasta el núcleo troclear a nivel del colículo superior. La mayoría de las neuronas son de pequeño tamaño ($20 \mu\text{m}$) y el número de neuronas gigantes es mucho menor que en el núcleo caudal pontino (3).

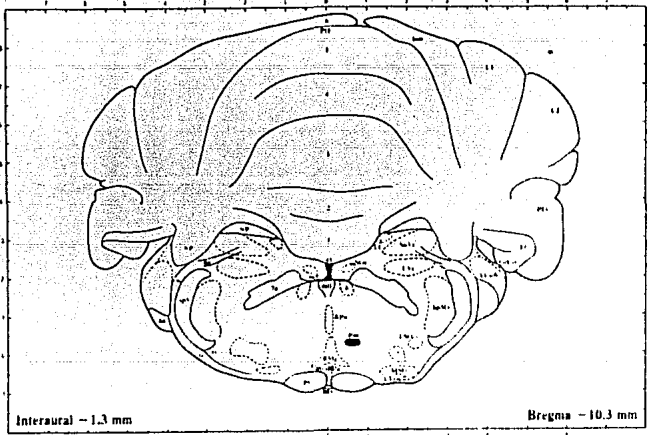
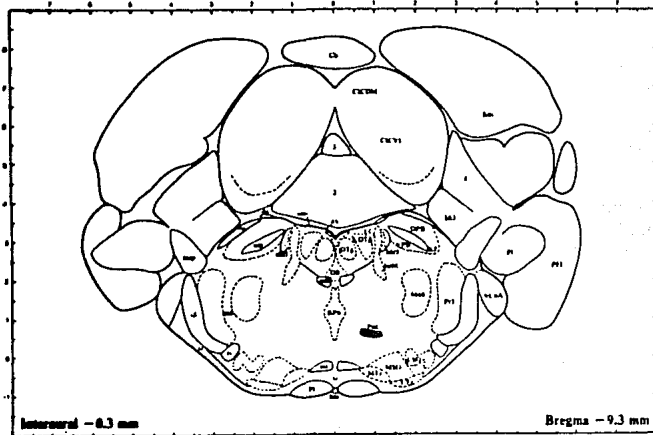
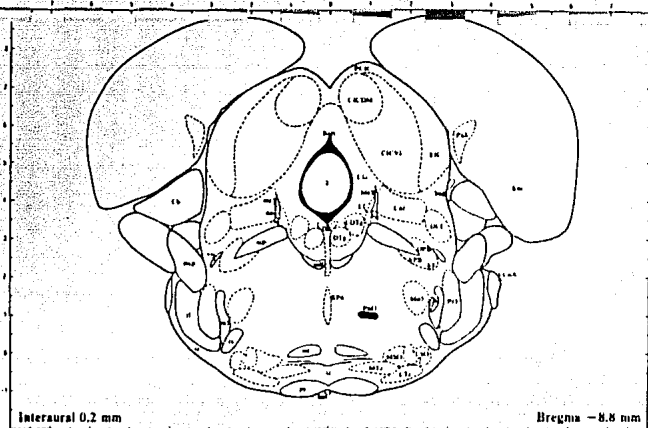
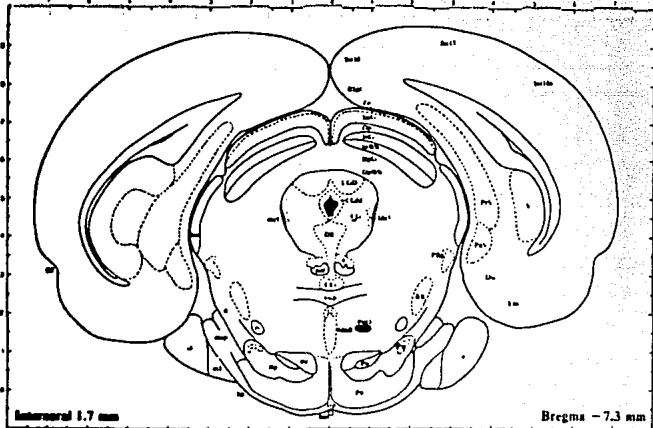


Fig. 1. Localización de las estructuras estudiadas en el presente trabajo. Los núcleos reticular oral pontino (PnO) y caudal pontino (PnC) se encuentran a lo largo de la porción central de la FRP. Tomado del atlas de Paxinos y Watson (10).

1.2.2. Conexiones de la FRP.

Las conexiones que mantiene la FRP con las demás estructuras cerebrales se han reconocido mediante el uso de técnicas de marcaje retrógrado y anterógrado, así como técnicas inmunohistoquímicas y electrofisiológicas (11-14). La FRP recibe y envía proyecciones de diversas regiones del sistema nervioso central, presentándose en la mayoría de los casos conexiones recíprocas.

Las aferencias que recibe la FRP tanto en la región correspondiente al núcleo reticular caudal pontino como al oral pontino provienen, en términos generales, de las mismas regiones y son tanto ipsilaterales como contralaterales. Las estructuras que envían las proyecciones más abundantes a la FRP son: la zona incerta, los campos de Forel, el colículo superior, la sustancia gris central, la corteza prefrontal, el núcleo tegmental laterodorsal, el pedúnculo pontino, la médula espinal y la FR a todos sus niveles (11,13,15).

Las sustancias que actúan como neurotransmisores en las diferentes aferencias que llegan a la FRP son desconocidas en su mayoría a excepción de la acetilcolina y probablemente el glutamato que provienen de los núcleos tegmental laterodorsal y pedúnculo pontino (13,16); las fibras que provienen de la zona incerta posiblemente son GABAérgicas (11,17).

Las principales vías de eferencias ascendentes de la FRP cursan a través del fascículo longitudinal medial y de los tractos de Forel y llegan a los núcleos central lateral, paracentral, parafascicular y geniculado lateral del tálamo, a la zona incerta y a los campos de Forel en el subtálamo, y a los

núcleos lateral y supramamilar del hipotálamo (12,18).

A nivel del tallo cerebral la FRP proyecta a la sustancia gris central, al colículo superior, al área retrorubral, al núcleo medial pretectal, anterior pretectal, al área ventral tegmental, a los núcleos basales del puente, al núcleo abducens, al cerebelo y a la FR (12,19,20). La FRP manda proyecciones descendentes a la médula espinal vía los funículos lateral, ventrolateral y ventral (21).

En la FRP hay conexiones reciprocas entre el núcleo reticular oral pontino y el caudal pontino que son tanto ipsilaterales como contralaterales. Se conocen también proyecciones de estos núcleos hacia su correspondiente región contralateral que en su mayoría son excitadoras (11,12,22).

1.2.3. Participación de la FRP en la fisiología de los mamíferos.

La FRP está involucrada en la regulación de procesos vitales para los mamíferos como son el control motor, la estimulación sensorial, la analgesia, la memoria y el aprendizaje y el ciclo sueño-vigilia.

En animales en libre movimiento se ha demostrado que la tasa de disparo de diferentes neuronas de la FRP está asociada a movimientos específicos de la cabeza, el cuello, los ojos, la lengua y los miembros anteriores (23-25), de manera tal que una neurona de la FRP relacionada con el movimiento de cabeza, solamente incrementa su actividad cuando éste se presenta y no cuando se da un movimiento de la lengua (23).

En estos estudios se observó que la actividad de la mayoría de

las neuronas registradas estaba relacionada con los movimientos de cuello y de cabeza y que el incremento en la tasa de disparo de las mismas estaba asociado principalmente a la salida de la información motora y no tanto a la entrada de información sensorial que se presenta en los movimientos espontáneos de los animales (24).

Estudios de estimulación y lesión de la FRP han confirmado el papel esencial que desempeña la FRP en los movimientos de cabeza, ojos y cuello. La estimulación eléctrica de la FRP induce un giro ipsilateral de la cabeza hacia el sitio de estimulación, mientras que la destrucción de esta zona mediante lesiones electrolyticas bilaterales reduce de manera importante los movimientos de la cabeza (26,27). Las lesiones electrolyticas unilaterales de la FRP eliminan los movimientos de la cabeza ipsilaterales al sitio de la lesión, la fase rápida del nistagmo ocular y el reflejo de enderezamiento en la rata (28,29).

Las lesiones con ácido kainico en la FRP del gato inhiben los movimientos horizontales de orientación de la cabeza y los movimientos oculares sacádicos hacia el sitio lesionado, mientras que las lesiones con ácido iboténico inducen una flexión tónica de la cabeza ipsilateral al sitio de inyección en una primera fase y posteriormente producen giros contralaterales al sitio de inyección e incapacidad de mover la cabeza de manera horizontal (30,31). El primer efecto del ácido iboténico se atribuye a una intensa excitación neuronal y el segundo a la muerte celular (31).

La participación de la FRP en la analgesia se ha evaluado mediante técnicas electrofisiológicas, farmacológicas e inmuno-

histoquímicas. Se conoce que la FRP lleva información nociceptiva al tálamo proveniente de la médula espinal (32), y se han descrito fibras y terminales inmunopositivas a encefalinas y neurotensina en la FRP. La administración de este péptido en esta zona produce una respuesta nociceptiva en la rata (33,34).

Las neuronas de la FRP pueden responder a diversas modalidades de estimulación sensorial. Uno de los sistemas más importantes en este sentido es el sistema vestibular, cuya estimulación induce cambios en la actividad neuronal de la FRP (35,36). La entrada de información somática y auditiva también incrementa la frecuencia de disparo de algunas neuronas de la FRP (24,37).

El papel de la FRP en procesos de memoria y aprendizaje se ha valorado en varios estudios. En paradigmas de condicionamiento discriminativo en conejos se ha observado un patrón de descarga característico que distinguía un estímulo condicionado positivo de uno negativo (38). En ratas con lesiones en la FRP se ha observado una disminución en el aprendizaje de las pruebas de laberinto (39). La participación de la FRP en el ciclo sueño-vigilia se trata en la sección 1.3.2.

1.2.4. Neurotransmisores de la FRP.

A pesar de la importancia de la FRP en la regulación de diferentes procesos fisiológicos de los mamíferos, se desconocen las sustancias que actúan como neurotransmisores en esta región. El estudio de la neurotransmisión en la FRP se ha restringido a la transmisión colinérgica, de la cual se cuenta con diversas evidencias electrofisiológicas, farmacológicas e histoquímicas.

Se ha demostrado que la administración del agonista colinérgico carbacol en un sistema de rebanadas de la FRP de la rata provoca una despolarización de la mayoría de las neuronas de esta región que es similar a la que ocurre durante la aparición normal de la fase de sueño paradójico (SP) (40,41). En gatos en libre movimiento, la aplicación de carbacol en la FRP también altera el patrón de descarga neuronal en esta zona (42).

La modificación de la transmisión colinérgica en la FRP tiene diversos efectos conductuales. Las inyecciones de carbacol inducen inmovilidad, catalepsia, convulsiones clónicas generalizadas y SP (43-45). La presentación de estas conductas depende tanto de la dosis del agonista como del sitio de inyección en la FRP.

Estudios inmunohistoquímicos y de marcaje retrógrado han demostrado que las aferencias colinérgicas que llegan a la FRP se originan en los núcleos tegmental laterodorsal y pedúnculo pontino (13). En los cuerpos neuronales de estos núcleos, así como en las fibras y terminales que envían a la FRP se ha detectado la presencia de la colina acetiltransferasa que es la enzima de síntesis de la acetilcolina. (46,47). Por técnicas inmunohistoquímicas esta enzima no se ha detectado en los somas de las neuronas de la FRP, lo que sugiere que esta región es colinoceptiva mas no colinérgica (48,49).

Sobre la neurotransmisión mediada por el ácido γ -aminobutírico (GABA) en la FRP, principalmente se tienen datos histoquímicos al respecto. Con la combinación de técnicas inmunohistoquímicas y de marcaje retrógrado se ha observado la presencia del GABA y de su enzima de síntesis (glutamato descarboxilasa) en los somas de las

neuronas de la FRP (50-52). Algunas de las neuronas inmunopositivas a la glutamato descarboxilasa proyectan a los núcleos basales del puente (50). Con técnicas histoquímicas se ha localizado a la enzima que degrada al GABA (GABA transaminasa) en neuronas de la FRP situadas principalmente en su porción rostral (53).

La existencia de la transmisión GABAérgica en la FRP está también apoyada por la presencia de los receptores GABA_A y GABA_B. Los primeros se localizaron por medio de una hibridización *in situ*, utilizando como sonda a un oligonucleótido con bases complementarias al RNA mensajero de la subunidad α -1. (54). Los receptores GABA_B se han identificado en la FRP con técnicas autorradiográficas en las que se emplean agonistas específicos de este tipo de receptor en experimentos de desplazamiento de la unión específica ligando-receptor (55).

Por otra parte se ha registrado una inhibición de la actividad neuronal en la FRP del gato después de la aplicación iontoforética de GABA (56).

La neurotransmisión mediada por aminoácidos excitadores se ha explorado en un estudio por medio de la inyección de glutamato y aspartato en la FRP del gato y el registro de la actividad neuronal. En ese estudio se registró un incremento en la excitabilidad (56).

Recientemente se han inyectado agonistas que interactúan con los diferentes receptores sensibles al glutamato y al aspartato. La administración de N-metil-D-aspartato, kainato y quisqualato en un sistema de rebanadas de la FRP incrementó la excitabilidad

de la mayoría de las neuronas registradas en esta zona (57).

El papel de la glicina como neurotransmisor en la médula espinal y en el tallo cerebral se ha descrito en varios estudios (58). La concentración de glicina cuantificada en una preparación que contiene al bulbo y al puente es similar a la encontrada en la médula espinal y se sabe que la administración de glicina en la FR bulbar disminuye la tasa de disparo de las neuronas que proyectan hacia la médula espinal (59,60).

La neurotransmisión mediada por glicina en la FRP se ha evaluado en un solo estudio en el que la aplicación iontoforética de glicina inhibió la actividad de las neuronas de esta región en el gato (56).

La neurotransmisión peptidérgica en la FRP se ha valorado principalmente por técnicas histoquímicas. Se han detectado fibras y terminales inmunopositivas a encefalinas y neurotensina (33,34) así como la presencia de receptores al polipéptido intestinal vasoactivo (61).

La presencia de una actividad aminérgica inhibitoria en la FRP, con base en la tasa de disparo de las neuronas de los núcleos del rafe, del locus coeruleus y de la FRP durante las diferentes fases del ciclo sueño-vigilia se ha propuesto desde 1975 (62), y aunque hay un estudio en el que se demuestra una disminución en la tasa de disparo después de la administración de serotonina o noradrenalina (56), no hay datos claros que demuestren una acción inhibitoria mediada por estas aminas en la FRP.

1.3.0. SUEÑO.

1.3.1. Características del Ciclo sueño-vigilia.

El ciclo sueño-vigilia es un fenómeno biológico rítmico que se manifiesta en las especies más evolucionadas del reino animal con patrones electroencefalográficos y conductuales característicos de los diferentes taxa (63). La vigilia se caracteriza electroencefalográficamente por la presencia de ondas de alta frecuencia (8-12 cps) y bajo voltaje ($< 50 \mu\text{V}$) así como por un tono muscular elevado y la manifestación de diversas conductas motoras.

El sueño consta de dos fases: el sueño de ondas lentas (SOL), sincronizado o quieto, y el sueño paradójico (SP) también llamado activo, desincronizado o con movimientos oculares rápidos. En el SOL se presenta una actividad lenta ($< 5 \text{ cps}$) de alto voltaje ($100-200 \mu\text{V}$) con un tono muscular medio. Grupos de ondas de mediana frecuencia (12-18 cps) conocidas como husos de sueño se observan también en esta fase, durante la cual disminuyen la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca y la respiratoria (64).

Los eventos característicos del SP fueron analizados por vez primera por Aserinsky y Kleitman, quienes en 1953 describieron la aparición de movimientos oculares rápidos en el sueño y señalaron que durante esta fase se presentan las ensueños. El SP siempre va precedido por una fase de SOL y en el humano aparece con una ritmicidad aproximada de 90 minutos (65,66).

En el SP la actividad eléctrica cerebral es similar a la que se presenta durante la vigilia, sin embargo el tono muscular

alcanza los niveles mas bajos del ciclo sueño-vigilia.

El SP presenta dos tipos de fenómenos: los tónicos, que se manifiestan durante toda la etapa y los fásicos, que ocurren solamente en episodios. La desincronización cortical, la atonía de los músculos posturales y la actividad theta (5 a 7 cps) del hipocampo, constituyen los fenómenos tónicos, mientras que los movimientos oculares rápidos, las sacudidas mioclónicas, las irregularidades cardiorrespiratorias y la actividad ponto-geniculo-occipital representan a los eventos fásicos (64,66,67).

La actividad ponto-geniculo-occipital está constituida por un grupo de potenciales que se presentan de manera secuencial en el puente, el núcleo geniculado lateral y la corteza visual y se presenta segundos antes de la aparición del SP, por lo que se le ha propuesto como un indicador de la generación del SP (67).

Los diversos estudios que se tienen sobre el ciclo sueño-vigilia indican que la FR desempeña un papel fundamental en la regulación de este fenómeno (64,67).

1.3.2. La FRP y la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Los datos disponibles sobre la regulación del ciclo sueño-vigilia en los mamíferos indican que la FRP está involucrada principalmente en la generación y el mantenimiento del SP.

Se ha observado que las lesiones electrolíticas de la FRP eliminan el SP (27,68,69), aunque las lesiones con ácido kainico (que dañan principalmente a los somas neuronales) no provocan cambios en el patrón de sueño (70).

Los registros de la actividad eléctrica de las neuronas de la FRP han demostrado una asociación importante entre la tasa de

disparo neuronal y la fase del ciclo sueño-vigilia en la que se encuentra el animal. Se ha observado que durante la ejecución de movimientos específicos en la vigilia y durante el SP las células de la FRP presentan una mayor frecuencia de disparo, mientras que durante el SOL, ésta es mínima (62,71). Recientemente se ha observado que durante el SP hay un incremento en el metabolismo de la glucosa en las neuronas de la FRP, lo cual es indicio de una mayor actividad de estas células en esta fase de sueño (72).

La presentación de los diferentes componentes del SP también se ha asociado a cambios en la excitabilidad de las neuronas de la FRP. Registros intracelulares han demostrado una despolarización de las neuronas premotoras de la FRP involucradas en la inhibición de las motoneuronas espinales responsables de mantener el tono muscular, produciendo de esta manera la atonía característica del SP (73).

Respecto a los eventos fásicos del SP, se ha observado que la estimulación de la porción caudal de la FRP produce movimientos oculares conjugados y que las neuronas de la FRP presentan descargas que preceden o se asocian con los potenciales ponto-geniculo-occipitales, los cuales son eliminados al lesionar la FRP (67,74).

Por otra parte existen datos que indican que un incremento en la transmisión colinérgica de la FRP induce SP, mientras que una disminución llega a suprimirlo. La administración en esta zona de agonistas colinérgicos, tanto muscarínicos como nicotínicos, y de inhibidores de la acetilcolinesterasa (enzima que degrada a la acetilcolina) como la neostigmina inducen SP, en tanto que la

aplicación de antagonistas muscarínicos (escopolamina y atropina) y nicotínicos (galamina) bloquea el efecto inductor de SP producido por los agonistas colinérgicos (75-78).

1.3.3. Papel del GABA en el ciclo sueño-vigilia.

La participación del GABA en la regulación del ciclo sueño-vigilia se ha valorado en varios estudios; sin embargo, a diferencia de la acetilcolina cuyo papel inductor de SP está bien establecido, el papel que tiene el GABA en el sueño no se ha esclarecido todavía.

Los cambios observados en el patrón de sueño después de la administración de fármacos que modifican la transmisión GABAérgica dependen de la dosis del fármaco utilizada, la vía de administración y si ésta es intracerebral, del sitio de inyección.

Un incremento en la transmisión GABAérgica mediado a través de la administración sistémica de benzodiazepinas en diferentes especies induce sueño (principalmente SOL) (79). Este mismo efecto se observa al realizar inyecciones de estos fármacos en el área medial preóptica de la rata, sin embargo, si se inyectan en los núcleos del rafe, tienen el efecto contrario y disminuyen el SOL (80). La inyección bilateral de muscimol (un agonista del receptor GABA_A) en el hipotálamo anterior produce insomnio, pero si es inyectado en la región posterior de esta estructura, induce tanto SOL como SP (81) y revierte el insomnio producido por lesiones del área preóptica (82). La aplicación unilateral de GABA en el núcleo ventroposterolateral del tálamo reduce la vigilia e incrementa el SP (83).

Los datos anteriores muestran que es necesario un mayor número de estudios para establecer el papel de la transmisión GABAérgica en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

1.4.0. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.4.1. Objetivos y planteamiento del estudio.

Como se ha señalado anteriormente, diversos estudios destacan la importancia de la FRP en la regulación de varios procesos fisiológicos de los mamíferos. Sin embargo se desconocen las sustancias que actúan como neurotransmisores en esta región, y a excepción de los datos electrofisiológicos y farmacológicos sobre la participación de la transmisión colinérgica en la regulación del SP, no hay datos sobre el papel que desempeñan otras sustancias en la regulación de ésta o de las otras fases del ciclo sueño-vigilia ni en los demás procesos en los que está involucrada la FRP.

Los objetivos principales de este trabajo fueron conocer, mediante estrategias neuroquímicas, algunas de las sustancias que pueden actuar como neurotransmisores en la FRP de la rata y valorar, a través de un estudio farmacológico y electrofisiológico, la participación de una de estas sustancias en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Las sustancias evaluadas como neurotransmisores fueron la acetilcolina, el GABA, el glutamato y la glicina. De la primera de ellas (como se señala en la sección 1.2.4.) se contaba con datos farmacológicos, electrofisiológicos e inmunohistoquímicos que sugerían su participación como neurotransmisor de la FRP.

En el caso del GABA se tenían observaciones histoquímicas que mostraban la existencia de algunos de los componentes necesarios para que se lleve a cabo la transmisión GABAérgica, como son: la presencia de las enzimas de síntesis y degradación del GABA, así como de los receptores a este aminoácido, y existía un solo dato fisiológico que indicaba una inhibición de la actividad de las neuronas de la FRP después de la aplicación iontoforética del GABA. Sin embargo se carecía de información sobre la repercusión fisiológica de esa inhibición.

Por tal motivo se valoró neuroquímicamente el papel del GABA como neurotransmisor en la FRP así como su participación en el ciclo sueño-vigilia de la rata, que es uno de los procesos fisiológicos en los que interviene de manera importante la FRP.

El interés por estudiar el papel del glutamato y de la glicina como neurotransmisores de la FRP surgió durante el desarrollo del trabajo, ya que la cuantificación de los aminoácidos en esta región (que inicialmente se realizó con el fin de conocer los niveles de GABA) reveló una concentración comparativamente alta de estos aminoácidos, sobre todo de glicina, aminoácido para el que se ha observado una buena correlación entre su concentración y su papel como neurotransmisor (58).

El estudio neuroquímico se basó en la caracterización de eventos presinápticos que son necesarios para que alguna sustancia funcione como neurotransmisor en cualquier región del sistema nervioso, como son: la captura del transmisor en el caso de los aminoácidos o de su precursor inmediato en el caso de la acetilcolina; la liberación del neurotransmisor; la actividad de

las enzimas que participan en su metabolismo y la determinación de su concentración.

El papel del GABA en la regulación del ciclo sueño-vigilia se valoró a través de microinyecciones de un agonista (muscimol) y de un antagonista (bicuculina) de este neurotransmisor en la FRP y el registro electroencefalográfico del ciclo sueño-vigilia.

En la siguiente sección, constituida por los artículos, se detallan los procedimientos experimentales utilizados para cubrir los objetivos de este trabajo, así como los resultados obtenidos en el mismo, con su respectiva discusión.

Release of Acetylcholine and GABA, and Activity of Their Synthesizing Enzymes in the Rat Pontine Reticular Formation

Ignacio Camacho-Arroyo¹, Raúl Alvarado², and Ricardo Tapia^{1,3}

(Accepted February 26, 1991)

The aim of this study was to obtain neurochemical information on the possible role of acetylcholine (ACh) and γ -aminobutyric acid (GABA) as neurotransmitters in the pontine reticular formation (PRF). We studied the uptake of labeled choline and GABA, as well as the release of this amino acid and of ACh, in PRF slices of the rat. In addition, choline acetyltransferase, acetylcholinesterase and glutamate decarboxylase activities were assayed in PRF homogenates. The uptake of GABA was strictly Na⁺-dependent, whereas choline uptake was only partially Na⁺-dependent. The release of both ACh and GABA was stimulated by K⁺-depolarization, but only the former was Ca²⁺-dependent. Choline acetyltransferase activity in the PRF was 74% of that in the striatum, whereas acetylcholinesterase activity was considerably lower. Glutamate decarboxylase activity in the PRF was about half that observed in the striatum. These findings support the possibility that both ACh and GABA may act as neurotransmitters in the rat PRF.

KEY WORDS: Pontine reticular formation; acetylcholine; choline acetyltransferase; γ -aminobutyric acid; glutamate decarboxylase

INTRODUCTION

Several studies indicate that the pontine reticular formation (PRF) plays an important role in a variety of physiological processes, including rapid eye movement (REM) sleep (1-3), vestibular and optokinetic head and eye nystagmus (4,5), orienting eye and head movements (6,7) and motor activity (8,9).

The PRF establishes reciprocal connections with the zona incerta, the fields of Forel, the superior colliculus, the central gray substance, the mesencephalic, pontine

and bulbar reticular formation and the spinal cord (10,11,12). The PRF also receives projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei (13) and sends information to the thalamus, the anterior pretectal nucleus, the pontine and abducens nuclei and the cerebellum (14-16).

Physiological and immunohistochemical studies have suggested the existence of cholinergic transmission in the PRF (13,17,18), whereas neurotransmission mediated by γ -aminobutyric acid (GABA) in this region is documented only by histochemical observations (19,20,21). However, there are no neurochemical data supporting a role of acetylcholine (ACh) or GABA as neurotransmitters in the PRF. The aim of this paper is to report such neurochemical evidence.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials. Adult male Wistar rats (250-270 g) were used in all the experiments. [³H]GABA (sp. act. 8.8 GBq/mmol), [methyl-³H]

¹ Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-606, 04510-México, D. F., México.

² Unidad de Investigaciones Cerebrales, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, S. S. A.

³ To whom to address reprint requests: Ricardo Tapia, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510-México D. F., México, Tel (525) 550-5215 x 4935, Fax (525) 548-0387.

choline chloride (sp. act. 3.2 TBq/mmol) and [^{14}C]-L-glutamic acid (sp. act. 1.7 GBq/mmol) were purchased from NEN-Dupont (Boston, MA). [Acetyl- ^3H]acetylcholinesterase A (344.1 GBq/mmol) was from ICN radiochemicals (Irvine, CA). Yeast choline kinase, ATP, ethyleneglycol-bis-(β -amino-ethyl ether) $\text{N,N}'$ -tetraacetic acid (EGTA), aminooxyacetic acid, eserine sulfate and pyridoxal phosphate were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade.

Isolation of PRF. After decapitation, the brain was quickly removed and the pons was dissected on ice by means of coronal cuts. Using the atlas of Paxinos and Watson (22) as guide, the PRF of each side was punched out with the help of a Pasteur pipet tip (1.2 mm internal diameter). The PRF regions were sliced or homogenized as required (see below). In some experiments, the dissected PRF and the remaining pons were fixed in formaldehyde and stained by the Nissl technique. The histological analysis showed that the region of the pons used in this study corresponds to the nucleus reticularis pontis oralis and pontis caudalis (22).

Uptake Experiments. For uptake experiments, the PRF from six rats was cut into 300 μm -thick slices with a Mcllwain tissue chopper. Six slices were pooled and preincubated for 10 min at 37°C in one ml of an oxygenated Krebs-Tris medium containing (in mM concentrations): NaCl 118, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2, glucose 5.6 and Tris-HCl 25, pH 7.4. In GABA uptake experiments the medium contained 0.1 mM aminooxyacetic acid, and in those with choline 0.1 mM eserine sulfate. In the experiments designed to test the Na^+ -dependence of the uptake, NaCl was replaced by an equimolar concentration of sucrose. After preincubation, [^{14}C]GABA (0.03 MBq, 1.2 μM final concentration) or [^3H]choline (0.19 MBq, 1.9 μM) was added and after 10 min the uptake was stopped by dilution with 4 ml of the medium and immediate filtration under moderate vacuum on 0.65 μm cellulose acetate Millipore filters, which were washed twice with 4 ml of the medium. Since the aim of these experiments was essentially to study the Na^+ -dependence of the uptake, a relatively long incubation period was used. No kinetic experiments were carried out.

The slices were digested with 0.2 ml NaOH (2M) and the radioactivity was counted by liquid scintillation spectrometry, 24 h after the addition of 10 ml of trititolol (23).

Release Experiments. Neurotransmitter release was studied by the superfusion method previously described (24). PRF slices from 6 rats were incubated in the Na^+ containing medium under the conditions described above. After incubation with the labeled compounds, the slices were transferred to superfusion chambers, washed by superfusion at 1.5 ml/min during 8 min, and the speed was then adjusted to 1 ml/min for the collection of one-min fractions. Superfusion medium was the same as that used for uptake. After 5 min of superfusion the medium was quickly substituted by one containing a depolarizing K^+ concentration (47 mM, Na^+ was proportionally reduced to maintain osmolarity) and the superfusion was continued for 8 more minutes. When the Ca^{2+} -dependence of the release was evaluated, superfusion with a medium without Ca^{2+} and containing 0.1 mM EGTA was carried out in parallel with the control. At the end of the superfusion, the tissue was digested with 0.3 ml of tissue solubilizer (NCS, Amersham, IL). The radioactivity in each collected fraction and in the solubilized tissue was counted after the addition of 7 ml of trititolol. Results are expressed as percent of total radioactivity released per minute (total radioactivity = total released + that remaining in the tissue at the end of the superfusion).

The identity of the radioactive GABA released under these experimental conditions has been previously established. More than 80% of the radioactivity released corresponds to this amino acid (24).

Separation of Labeled Choline and Acetylcholine Released. In order to determine the proportion of labeled choline and ACh released after loading with [^3H]choline, in some experiments the pooled fractions corresponding to minutes 3-5 (basal release) and to minutes 6-8 (K^+ -stimulated release) were used to separate labeled choline from labeled ACh. For this purpose, choline was phosphorylated with choline kinase and ACh was subsequently extracted into a toluene scintillation mixture (5 g 2,5-diphenyloxazole and 100 mg 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene in 1 liter of toluene), as previously described (25). Phosphorylation reaction in standard solutions of labeled choline was carried out in parallel and showed that 86-88% of the total choline was phosphorylated. The actual value in each experiment was used to correct the results obtained in the superfusion fractions.

Enzyme Assays. Choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase (AChE) and glutamate decarboxylase (GAD) activities were measured in water homogenates of PRF and striatum. The assays in the latter structure were carried out for comparison.

ChAT activity was measured in homogenates of pooled PRF from two rats or in one striatum, according to the radiometric method of Fonnum (26) with some modifications (27). AChE activity was determined in homogenates of one PRF or one striatum, using the spectrophotometric method of Ellman et al. (28). GAD activity was measured in homogenates of pooled PRF from three rats or in one striatum, by the radiometric method of Albers and Brady (29), slightly modified (27), in the absence and in the presence of 0.5 mM pyridoxal phosphate.

Protein was determined by the method of Lowry et al (30).

RESULTS

Uptake Experiments. [^{14}C]GABA and [^3H]choline uptake by PRF slices is shown in Table 1. In the presence of Na^+ , GABA uptake was 8 times higher than that of choline. In both cases the uptake was Na^+ -dependent, although this dependence was strict in the case of GABA (94%) and only partial in the case of choline (50%).

Release Experiments. [^{14}C]GABA release from PRF slices in response to K^+ -depolarization is shown in Figure 1. The stimulated release of GABA was about 7-fold in the presence of Ca^{2+} . When this cation was omitted only a slight, non significant decrease in this stimulation was observed.

K^+ -depolarization induced a 4-fold stimulation of

Table 1. [^{14}C]GABA and [^3H]choline Uptake by Rat PRF Slices

| | Na^+ | No Na^+ |
|-------------------------|-----------------|------------------|
| [^{14}C]GABA | 51.1 \pm 12.5 | 2.8 \pm 0.8* |
| [^3H]choline | 6.4 \pm 1.1 | 3.2 \pm 0.5** |

The uptake of labeled GABA and choline by PRF slices was determined in the presence (118 mM) and absence of Na^+ . Values are means of 6 independent experiments \pm SEM and are expressed as pmol/mg protein. * $p < .005$; ** $p < .05$, as compared to the corresponding value in the presence of Na^+ (Student's t test).



Cut Here



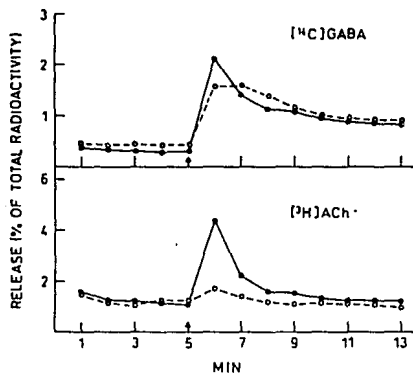


Fig. 1. Basal and stimulated release of labeled GABA and ACh from PRF slices in the presence (filled circles) and absence (open circles) of Ca^{2+} . After loading the slices they were washed and superfused as described under Materials and Methods. At 5 min (arrow) the superfusion medium was substituted by a depolarizing medium containing 47 mM KCl. Although in these experiments labeled ACh was not separated from labeled choline, in other experiments (see text) it was assessed that the only former was released by depolarization. Each point is the mean value of 6 experiments carried out in duplicate. The maximum S.E.M. was 22% of the corresponding mean, but for most points it was smaller than 10%.

Table II. ChAT, AChE, and GAD Activities in PRF and in Striatum Homogenates

| | ChAT | AChE | GAD | |
|----------|------------|-------------|--------------|--------------|
| | | | + PLP | - PLP |
| PRF | 69.7 ± 1.4 | 60.4 ± 4.5 | 108.8 ± 2.5 | 52.3 ± 2.1 |
| Striatum | 94.4 ± 3.8 | 238.4 ± 9.4 | 220.3 ± 19.2 | 108.2 ± 12.1 |

ChAT and GAD activities are expressed as nmol/mg protein/h and AChE activity as nmol/mg protein/min. Mean values of 6 independent experiments ± SEM.

radioactivity release from $[^3H]$ choline-loaded PRF in the presence of Ca^{2+} but, in contrast to GABA, this stimulated release was almost totally Ca^{2+} -dependent (Figure 1). Such dependence suggests that the released radioactive compound was ACh and not choline. This was confirmed in the experiments in which labeled choline and ACh released were separated. In these experiments it was found that the ratio stimulated/basal release was 0.97 ± 0.24 for choline and 2.54 ± 0.18 for ACh (means ± S.E.M. for 4 experiments).

Enzyme Activities. Table II shows the activity of

ChAT, AChE and GAD in PRF and striatal homogenates. Whereas ChAT activity was only 26% lower in the PRF than in the striatum, AChE activity was 4-fold higher in the latter. With regard to GAD activity, it was 2-fold higher in the striatum than in the PRF, and in both structures the addition of PLP resulted in an activation of about 100%.

DISCUSSION

The present results indicate that both ACh and GABA may play a role as neurotransmitters in rat PRF. Since great care was taken during the dissection procedure to ensure that only PRF was removed, we believe that the data obtained reflect indeed the neurochemical properties of PRF, rather than those of surrounding tissue such as the raphe nuclei.

ACh. A variety of histochemical, physiological and pharmacological data indicate the existence of cholinergic neurotransmission in the PRF. This region receives cholinergic inputs from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei (13). Carbachol application into the PRF, both in vivo (31) and in vitro (17) results in modifications of the neuronal discharge rate. Furthermore, it has been shown that the enhancement of cholinergic activity in the PRF by the administration of cholinergic agonists or anticholinesterase agents can induce REM sleep (18,32,33). Our findings give neurochemical support to the knowledge of cholinergic transmission in the PRF, and contribute with new information regarding some of its properties. The observation that the uptake of choline by the PRF is only partially Na^+ -dependent has been previously reported in the granular layer of cerebellum (24). This relatively Na^+ -independent uptake of choline does not represent binding to the tissue but transport into the nerve endings, since ACh newly synthesized from exogenous choline was released from PRF slices in a Ca^{2+} -dependent manner. The latter observation strongly supports the neurotransmitter role of ACh in the PRF.

A cholinergic function in the PRF is also demonstrated by the high ChAT activity found in this structure. In fact, this activity was only 26% (than that in the striatum, which is among the brain regions with highest ChAT activity (34), and higher than that reported in the hippocampus and in the frontal and occipital cortex (27,34,35). AChE activity in the PRF was only about 25% of that in the striatum, although higher than that in the other regions mentioned (27,35,36). However, it is generally accepted that the ACh synthesizing enzyme is



Cut Here



a more reliable marker for cholinergic synapses than its degrading enzyme.

With the use of ChAT antibodies, no immunoreactive cell bodies have been observed in the PRF of the cat (37) and very scarce immunopositive cells have been reported in the rat (38). Therefore, it may be concluded that ChAT is most probably located in the nerve endings, a conclusion supported by the results of choline uptake and ACh release already discussed. These terminals probably correspond to fibers arriving from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei (13). In agreement with this conclusion, the presence of ChAT immunoreactive fibers and varicosities in the PRF, originating in these areas, has been recently described (39).

GABA. In contrast to ACh, scarce information exists about the role of GABA in the PRF. The strict Na^+ -dependence of GABA uptake observed in the PRF is related to a high affinity synaptic transport (40). We also showed that the PRF can synthesize GABA, since relatively high GAD activity was detected. This result agrees with the demonstration of GAD and GABA-like immunoreactive cell bodies present in the PRF (19,20,41), which send their projections to the basilar pontine nuclei (41).

The finding that in the PRF GABA release stimulated by depolarization was Ca^{2+} -independent agrees with previous observations in other cerebral regions, both *in vitro* and *in vivo* (42-44). In fact, this comparatively notable independence of Ca^{2+} is characteristic of GABA release, as compared to acetylcholine or other transmitters (42). The site of origin of GABA release is unknown. Although a release from neuronal somas or from terminals of intrinsic GABAergic interneurons can not be discarded, it seems probable that it occurs from terminals of axons arising from the zona incerta, whose neurons contain GABA and project to the PRF (11,45). GABAergic transmission in the PRF is also supported by the presence of GABA transaminase and GABA_B and GABA_A receptors, which was reported in the PRF by means of histochemical, autoradiographic and *in situ* hybridization methods (21,46,47).

In conclusion, our data suggest that both ACh and GABA may function as neurotransmitters in the PRF of the rat.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by CONACyT (Project P228CCOX-880370). We thank Clorinda Arias for technical advice in the uptake and release experiments.

REFERENCES

- Hobson, J. A., McCarley, R. W., Pivik, R. T., and Freedman, R. 1974. Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. *J. Neurophysiol.* 37:497-511.
- Jouvet, M. 1962. Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch. Ital. Biol.* 100:125-206.
- Friedman, L., and Jones, B. E. 1984. Computer graphics analysis of sleep-wakefulness state changes after pontine lesions. *Brain Res. Bull.* 13:53-68.
- Igusa, Y., Sasaki, S., and Shimazu, H. 1980. Excitatory premotor burst neurons in the cat pontine reticular formation related to the quick phase of vestibular nystagmus. *Brain Res.* 182:451-456.
- Sirkin, D. W., Zedek, Y., and Teitelbaum, P. 1985. Effects of pontine reticular formation lesions on optokinetic head nystagmus in rats. *Exp. Brain Res.* 58:503-509.
- Cohen, B., and Henn, V. 1972. Unit activity in the pontine reticular formation associated with eye movements. *Brain Res.* 46:403-410.
- Sirkin, D. W., Schaller, T., and Teitelbaum, P. 1980. Involvement of the pontine reticular formation in head movements and labyrinthine righting in the rat. *Exp. Neurol.* 69:435-457.
- Siegel, J. M., and McGinty, D. J. 1977. Pontine reticular formation neurons: relationship of discharge to motor activity. *Science* 196:678-680.
- Vertes, R. P. 1979. Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat. *J. Neurophysiol.* 42:214-228.
- Gallager, D. W., and Perl, A. 1978. Afferents to brain stem nuclei (brain stem raphe, nucleus reticularis pontis caudalis and nucleus gigantocellularis) in the rat as demonstrated by microiontophoretically applied horseradish peroxidase. *Brain Res.* 144:257-275.
- Shammah-Lagnado, S. J., Negro, N., Silva, B. A., and Ricardo, J. A. 1987. Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 20:961-989.
- Vertes, R. P., and Martin, G. F. 1988. Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 275:511-541.
- Milani, A., Ito, K., Hallanger, A. E., Wainer, B. H., Kataoka, K., and McCarley, R. W. 1988. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res.* 451:397-402.
- Jones, B. E., and Beaudet, A. 1987. Retrograde labeling of neurons in the brain stem following injections of [^3H]choline into the forebrain of the rat. *Exp. Brain Res.* 65:437-448.
- Büttner-Ennever, J. A., and Henn, V. 1976. An autoradiographic study of the pathways from the pontine reticular formation involved in horizontal eye movements. *Brain Res.* 108:155-164.
- Grantly, R., Baker, R., and Grantly, A. 1980. Morphological and physiological identification of excitatory pontine reticular neurons projecting to the cat abducens nucleus and spinal cord. *Brain Res.* 198:221-228.
- Greene, R. W., Gerber, U., and McCarley, R. W. 1989. Cholinergic activation of medial pontine reticular formation neurons *in vitro*. *Brain Res.* 476:154-159.
- Baghdoyan, H. A., Monaco, A. P., Rodrigo-Angulo, M. L., Assens, F., McCarley, R. W., and Hobson, J. A. 1984. Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231:173-180.
- Border, B. G., and Mihailoff, G. A. 1985. GAD-immunoreactive neural elements in the basilar pontine nuclei and nucleus reticularis tegmenti pontis of the rat. I. Light microscopic studies. *Exp. Brain Res.* 59:600-614.



Cut Here



20. Brodal, P., Mihailoff, G., Border, B., Ottersen, O. P., and Storm-Mathisen, J. 1988. GABA-containing neurons in the pontine nuclei of rat, cat and monkey. An immunocytochemical study. *Neuroscience* 25:27-45.
21. Nagai, T., Maeda, T., Imai, H., McGeer, P. L., and McGeer, E. G. 1985. Distribution of GABA-T-Intensive neurons in rat hindbrain. *J. Comp. Neurol.* 231:260-269.
22. Paxinos, G., and Watson, C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney.
23. Fricke, U. 1975. Tritiosol: a new scintillation cocktail based on triton X-100. *Anal. Biochem.* 63:555-558.
24. Morales, E., and Tapia, R. 1987. Neurotransmitters of the cerebellar glomeruli: uptake and release of labeled γ -aminobutyric acid, glycine, serotonin and choline in a purified glomerulus fraction and in granular layer slices. *Brain Res.* 420:11-21.
25. Tapia, R., Stiges, M., and Morales, E. 1985. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361:373-382.
26. Fonnum, F. 1975. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24:407-409.
27. López-García, J. C., Bermúdez-Rattoni, F., and Tapia, R. 1990. Release of acetylcholine, γ -aminobutyrate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. *Brain Res.* 523:100-104.
28. Ellman, G. L., Courtney, D. K., Andres, V., and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.
29. Albers, R. W., and Brady, R. D. 1959. The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 234:926-928.
30. Lowry, O. H., Roscbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
31. Shitromani, P. J., and McGinty, D. J. 1986. Pontine neuronal response to local cholinergic infusion: relation to REM sleep. *Brain Res.* 386:20-31.
32. Hobson, J. A., Goldberg, M., Vivaldi, E., and Ricw, D. 1983. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjection of the muscarinic agonist bethanechol. *Brain Res.* 275:127-136.
33. Gnadt, J. W., and Pegram, G. V. 1986. Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. *Brain Res.* 384:26-41.
34. Haba, K., Ogawa, N., Kawata, M., and Mori, A. 1988. A method for parallel determination of choline acetyltransferase and muscarinic cholinergic receptors: application in aged-rat brain. *Neurochem. Res.* 13:951-955.
35. Mahadik, S. P., Laev, H., Korenovsky, A., and Karpiak, S. E. 1988. Haloperidol alters rat CNS cholinergic system: enzymatic and morphological analyses. *Biol. Psychiat.* 24:199-217.
36. Appleyard, M. E., Green, A. R., and Smith, A. D. 1986. Acetylcholinesterase activity in regions of the rat brain following a convulsion. *J. Neurochem.* 46:1789-1793.
37. Shitromani, P. J., Armstrong, D. M., Bruce, G., Hersh, L. B., Groves, P. M., and Gillin, J. C. 1987. Relation of pontine choline acetyltransferase immunoreactive neurons with cells which increase discharge during REM sleep. *Brain Res. Bull.* 18:447-455.
38. Tago, H., McGeer, P. L., McGeer, E. G., Akiyama, H., and Hersh, L. B. 1989. Distribution of choline acetyltransferase immunopositive structures in rat brainstem. *Brain Res.* 495:271-297.
39. Jones, B. E. 1990. Immunohistochemical study of choline acetyltransferase-immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295:485-514.
40. Martin, D. L. 1976. Carrier-mediated transport and removal of GABA from synaptic regions. Pages 347-386, in Roberts, E., Chase, T. N., and Tower, D. B. (eds.), *GABA in Nervous System Function*, Raven Press, New York.
41. Border, B. G., Kosinski, R. J., Azizi, S. A., and Mihailoff, G. A. 1986. Certain basilar pontine afferent systems are GABAergic: combined HRP and immunocytochemical studies in the rat. *Brain Res. Bull.* 17:169-179.
42. Arias, C., and Tapia, R. 1986. Differential calcium-dependence of γ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 47:396-404.
43. Cunningham, J. O., and Neal, M. J. 1981. On the mechanism by which veratridine causes a calcium-independent release of γ -aminobutyric acid from brain slices. *Br. J. Pharmacol.* 73:655-667.
44. Drew, K. L., O'Connor, W. T., Kehr, J., and Ungerstedt, U. 1989. Characterization of gamma-aminobutyric acid and dopamine overflow following acute implantation of a microdialysis probe. *Life Sci.* 45:1307-1317.
45. Oertel, W. H., Tappaz, M. L., Berod, A., and Mugnaini, E. 1982. Two-color immunocytochemistry for dopaminergic and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. *Brain Res. Bull.* 9:463-474.
46. Chu, D. C. M., Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. 1990. Distribution and kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 34:341-357.
47. Hironaka, T., Morita, Y., Hagihira, S., Tateno, E., Kita, H., and Tohyama, M. 1990. Localization of GABA_A-receptor α_1 subunit mRNA-containing neurons in the lower brainstem of the rat. *Mol. Brain Res.* 7:335-345.

Microinjections of muscimol and bicuculline into the pontine reticular formation modify the sleep-waking cycle in the rat

Ignacio Camacho-Arroyo^{1,2}, Raúl Alvarado², Joaquín Manjarrez² and Ricardo Tapia¹

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (México) and

²Unidad de Investigaciones Cerebrales, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, S.S.A. (México)

(Received 12 March 1991; Revised version received 25 April 1991; Accepted 25 April 1991)

Key words: Pontine reticular formation; Sleep-waking cycle; Muscimol; Bicuculline; GABAergic transmission

The role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the sleep-waking cycle was evaluated by means of microinjections of muscimol and bicuculline into the rat pontine reticular formation (PRF). Muscimol (20 ng) produced a marked increase in wakefulness (70%), a decrease in slow-wave sleep (SWS) (35%) and a remarkable delay in the onset of both SWS and paradoxical sleep, without modifying the percentage of the latter. Bicuculline (4 ng) shortened SWS latency by about 70%. These results suggest that GABAergic transmission in the PRF is involved in the regulation of sleep-waking cycle in the rat.

Several physiological and lesion studies have shown that the pontine reticular formation (PRF) plays an important role in the regulation of sleep-waking cycle [3, 5]. Other reports indicate that cholinergic transmission in this region is involved in paradoxical sleep (PS) mechanisms [1, 4, 15]. However, little information exists on the function of other neurotransmitters in the PRF and their participation in the sleep-waking cycle.

Recently, we have shown that γ -aminobutyric acid (GABA) can act as a neurotransmitter in the PRF [2] but there are no data on the role of GABAergic transmission in this region. GABA seems to participate in sleep-waking cycle regulation although its precise role is unclear. Changes of sleep pattern after the enhancement of GABAergic transmission by the intracerebral administration of benzodiazepines, muscimol or GABA itself depend on the site of injection. Thus, microinjections of triazolam into the medial preoptic area of rats increase slow wave sleep (SWS), whereas injections into the raphe nucleus decrease it [10]. Muscimol injected bilaterally into the anterior hypothalamus produces insomnia, but its injection in the posterior hypothalamus induces both SWS and PS [8] and reverses the insomnia produced by preoptic area lesions in cats [13]. The unilateral local application of GABA in the ventroposterolateral nucleus of the thalamus decreases wakefulness (W) and increases

the total amount of sleep, due mainly to an increase in PS [7].

In view of the above, the aim of the present work was to study whether blocking or enhancing GABAergic transmission in the PRF, through the microinjection of bicuculline and muscimol, modifies the sleep-waking cycle in the rat.

Adult male Wistar rats (250-270 g) were used. Under ketamine anesthesia (80 mg/kg i.p.) stainless-steel electrodes were implanted in the frontal and parietal cortex for electroencephalographic (EEG) recording and in the orbital cavity for electrooculographic (EOG) recording. Electrodes were also inserted into the neck muscles to record the electromyogram (EMG). Furthermore, a stainless-steel guide cannula (21-gauge) was implanted unilaterally into the PRF (P: 8.0, L: 1.0, V: -8.2) [12].

After surgery the animals were allowed 5 days to recover in their home-cage, with food and water ad libitum, maintained in a 12:12 h light-dark cycle, with lights on from 07.00 to 19.00 h. During the following 5 days they were habituated to the recording situation and on day 11 the sleep study was started. Muscimol and bicuculline methiodide (Sigma) were dissolved in physiological saline, and microinjections were made unilaterally using an injection needle (27-gauge), inserted into the guide cannula, that was connected through a polyethylene tube to a 5 μ l Hamilton syringe. On day 1 of the experiment a baseline sleep recording was performed following a sham injection procedure (insertion of the needle but no injection). On day 2 the animals were ran-

Correspondence: R. Tapia, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510-México, D.F., México. Fax: (5251) 548-0387.

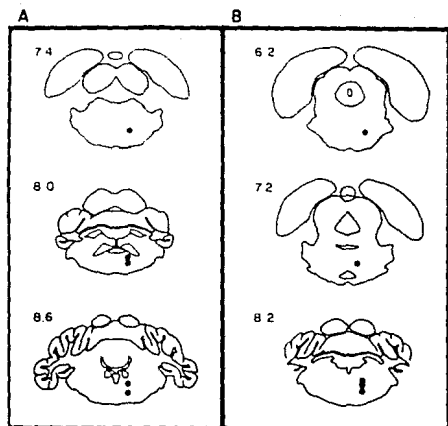


Fig. 1. Injection sites of muscimol (A) and bicuculline (B) in the 5 rats studied in each group. Coordinates indicated are from bregma. Schemes were taken from the atlas of Pellegrino et al. [12].

domly assigned to one of two groups: group 1 received physiological saline (0.2 μ l) or muscimol (20 ng/0.2 μ l) and group 2 received saline or bicuculline (4 ng/0.2 μ l). On day 3 the animals previously injected with saline received muscimol (group 1) or bicuculline (group 2), while the animals which had received muscimol or bicuculline were injected with saline. Immediately after each injection (at 08.00 h approximately) a polygraphic recording was performed for 6 h. The scoring of the sleep-waking cycle was made by visual analysis of the electrical recordings, following established criteria for the W phase (mixed-frequency, low voltage EEG, variable eye movements and high neck EMG), SWS (low-frequency, high voltage EEG, sleep spindles, scarce eye movements and medium muscle tone) and PS (mixed-frequency, low voltage EEG, rapid eye movements and absence of neck EMG). Repeated measures analysis of variance and post-hoc Student's *t*-test were used for statistical evaluation.

At the end of the third recording period, Direct blue (Sigma) (1.2 μ g/0.2 μ l) was injected in order to localize the injection site. When the study was completed animals were injected with a high dose of sodium pentobarbital and transcardially perfused with saline. The injection sites were verified in 80 μ m coronal slices. All the injections were localized in the medial PRF, both in the rostral and in the caudal region (nucleus reticularis pontis oralis and pontis caudalis, respectively, Fig. 1) [12].

Muscimol injected into the PRF produced an immediate increase in EMG activity, as well as masticatory and vibrissae movements, which lasted for a few mi-

TABLE I
EFFECTS OF MUSCIMOL INJECTIONS INTO THE PRF ON THE SLEEP-WAKING CYCLE OF THE RAT

Values are the means \pm S.E.M. of 5 animals during 6 h of recording. Percentage refers to total recorded time. Mean duration of each phase and latency are given in minutes.

| | No injection | Saline (0.2 μ l) | Muscimol (20 ng/0.2 μ l) |
|---------------|----------------|----------------------|------------------------------|
| W | | | |
| Percentage | 28.6 \pm 2.8 | 31.6 \pm 2.9 | 50.9 \pm 4.0** |
| Number | 24.6 \pm 3.9 | 30.8 \pm 4.4 | 21.4 \pm 3.8 |
| Mean duration | 4.7 \pm 0.7 | 3.9 \pm 0.4 | 11.0 \pm 2.9* |
| SWS | | | |
| Percentage | 62.8 \pm 3.7 | 59.4 \pm 3.3 | 39.2 \pm 3.8** |
| Number | 49.1 \pm 4.2 | 63.4 \pm 6.6 | 44.4 \pm 6.4 |
| Mean duration | 4.9 \pm 0.6 | 3.7 \pm 0.7 | 3.6 \pm 0.6 |
| Latency | 12.2 \pm 2.5 | 12.3 \pm 3.1 | 80.6 \pm 14.3** |
| PS | | | |
| Percentage | 8.5 \pm 1.3 | 8.9 \pm 0.9 | 9.8 \pm 2.9 |
| Number | 27.1 \pm 3.4 | 35.2 \pm 4.9 | 25.2 \pm 5.2 |
| Mean duration | 1.1 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 |
| Latency | 37.8 \pm 6.9 | 36.3 \pm 9.7 | 145.4 \pm 27.2** |

* $P < 0.005$; ** $P < 0.001$. Significance of differences between muscimol injections and the other manipulations.

nutes. A turn of the head ipsilateral to the injection site, which started 5 min after the injection and lasted for about 90 min, was observed in 4 of 5 rats. In all the animals muscimol induced a marked increase (70%) in the total time of W, that was more evident during the first hour, in which no sleep signs were observed (Table I). The W enhancement resulted from an increase in the duration of W phases, mainly due to the large duration of the first W phase after muscimol injection, rather than from an effect on the number of W phases. This increase was independent of the effect of muscimol on head position, since not all the animals with W enhancement showed turning of the head and they had SWS phases while their heads were turned. Latency to SWS was increased by muscimol about 7-fold and its total duration was reduced significantly (35%). PS latency was also notably increased (4-fold) but the total PS time was unchanged (Table I).

The injection of bicuculline into the PRF did not induce changes in head position nor in the total duration of W, SWS or PS. A 70% reduction in the latency to SWS was observed, although this decrease did not reach statistical significance ($P = 0.08$). A tendency towards a reduction in PS latency (40%) was also observed after the injection of bicuculline (Table II).

Despite the A-P variation of the injection sites into the PRF (Fig. 1), the changes in sleep pattern induced by the

TABLE II
EFFECTS OF BICUCULLINE INJECTIONS INTO THE PRF ON THE SLEEP-WAKING CYCLE OF THE RAT

Values are the means \pm S.E.M. of 5 animals in 6 h of recording. Percentage refers to total recorded time. Mean duration of each phase and latency are given in minutes.

| | No injection | Saline (0.2 μ l) | Bicuculline (4 ng/0.2 μ l) |
|---------------|-----------------|----------------------|--------------------------------|
| W | | | |
| Percentage | 30.5 \pm 2.2 | 39.7 \pm 7.5 | 38.3 \pm 3.9 |
| Number | 29.0 \pm 2.8 | 39.0 \pm 2.9 | 41.8 \pm 4.4 |
| Mean duration | 3.8 \pm 0.3 | 3.6 \pm 0.7 | 3.6 \pm 0.6 |
| SWS | | | |
| Percentage | 63.1 \pm 2.0 | 55.0 \pm 7.2 | 54.6 \pm 4.3 |
| Number | 42.0 \pm 3.8 | 54.0 \pm 5.1 | 61.4 \pm 4.5 |
| Mean duration | 5.1 \pm 0.6 | 3.7 \pm 0.6 | 3.3 \pm 0.4 |
| Latency | 14.4 \pm 2.9 | 15.5 \pm 2.9 | 4.0 \pm 1.1 |
| PS | | | |
| Percentage | 6.2 \pm 1.6 | 5.3 \pm 0.7 | 6.9 \pm 0.7 |
| Number | 18.4 \pm 2.6 | 19.8 \pm 3.0 | 26.8 \pm 3.0 |
| Mean duration | 1.1 \pm 0.4 | 0.9 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 |
| Latency | 53.9 \pm 11.6 | 50.8 \pm 5.3 | 31.1 \pm 4.7 |

drugs used were similar in all rats, suggesting that pharmacological manipulation of GABAergic transmission in both the nucleus reticularis pontis oralis and the caudalis produces similar effects on the sleep-waking cycle, as has been shown for drugs affecting cholinergic transmission [4].

The results of the present study suggest that GABAergic transmission in the PRF is involved in the mechanisms that maintain wakefulness in the rat, since the injection of the GABA_A agonist muscimol in this region increased W, whereas the antagonist bicuculline facilitated SWS. The increase in W produced by muscimol has already been reported after the injection of this agonist in other brain areas, such as the anterior hypothalamus [8]. Although the sleep promoting effect of bicuculline was relatively small, since only a tendency to a decrease in SWS and PS latencies was observed, it should be noted that our study was performed during daytime, when the baseline sleep period in control rats is very long and therefore a pharmacological enhancement of sleep is difficult to obtain [9]. Moreover, the dose of bicuculline injected was relatively low. In some experiments a higher dose of bicuculline (20 ng/0.2 μ l) was tested but it produced generalized tonic-clonic seizures. Since PS was not affected at all by muscimol nor by bicuculline, the involvement of PRF GABAergic transmission in sleep-waking cycle is apparently restricted to the other phases. The participation of PRF in PS is probably dependent on other transmitters, such as acetylcholine [1, 4, 15].

The origin of afferent GABAergic fibers to the PRF is unknown. It is possible that they arise from the zona

incerta, the laterodorsal tegmental nuclei or the pedunculopontine nuclei, whose neurons contain GABA and project to the PRF [6, 11, 14], but the existence of GABAergic interneurons in the PRF can not be ruled out.

In conclusion, our data indicate that GABAergic transmission in the PRF probably participates in the regulation of the sleep-waking cycle in the rat.

This work was supported in part by CoNACyT (Project P228CCOX-880370).

- 1 Baghdoyan, H.A., Monaco, A.P., Rodrigo-Angulo, M.L., Assens, F., McCarley, R.W. and Hobson, J.A., Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231 (1984) 173-180.
- 2 Camacho-Arroyo, I., Alvarado, R. and Tapia, R., Release of acetylcholine and GABA, and activity of their synthesizing enzymes in the rat pontine reticular formation, *Neurochem. Res.*, in press.
- 3 Friedman, L. and Jones, B.E., Computer graphics analysis of sleep-wakefulness state changes after pontine lesions, *Brain Res. Bull.*, 13 (1984) 53-68.
- 4 Gnadt, J.W. and Pegrum, G.V., Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat, *Brain Res.*, 384 (1986) 26-41.
- 5 Hobson, J.A., McCarley, R.W., Pivik, R.T. and Freedman, R., Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep, *J. Neurophysiol.*, 37 (1974) 497-511.
- 6 Jones, B.E., Relationship of GABAergic to cholinergic neurons within the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 16 (1990) 300.
- 7 Juhász, G., Emri, Z., Kékési, K. and Pungor, K., Local perfusion of the thalamus with GABA increases sleep and induces long-lasting inhibition of somatosensory event-related potentials in cats, *Neurosci. Lett.*, 103 (1989) 229-233.
- 8 Lin, J.S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G. and Jouvet, M., A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats, *Brain Res.*, 479 (1989) 225-240.
- 9 Mendelson, W.B., Martin, J.V., Perlis, M. and Wagner, R., Sleep and benzodiazepine receptor sub-types, *J. Neural Transm.*, 70 (1987) 329-336.
- 10 Mendelson, W.B., Martin, J.V., Perlis, M. and Wagner, R., Enhancement of sleep by microinjection of triazolam into the medial preoptic area, *Neuropsychopharmacology*, 2 (1989) 61-66.
- 11 Oertel, W.H., Tappaz, M.L., Berod, A. and Mugnaini, E., Two-color immunocytochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta, *Brain Res. Bull.*, 9 (1982) 463-474.
- 12 Pellegrino, L.J., Pellegrino, A.S. and Cushman, A.J., *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*, Plenum, New York, 1979, pp. 123.
- 13 Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N. and Jouvet, M., Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat, *Neuroscience*, 32 (1989) 669-683.
- 14 Shammah-Lagnado, S.J., Negrao, N., Silva, B.A. and Ricardo, J.A., Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat, *Neuroscience*, 20 (1987) 961-989.
- 15 Velazquez-Moctezuma, J., Shalauta, M.D., Gillin, J.C. and Shiromani, P.J., Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicit REM sleep, *Neurosci. Lett.*, 115 (1990) 265-268.

LEVELS, UPTAKE AND RELEASE OF GLYCINE AND GLUTAMATE IN THE RAT
PONTINE RETICULAR FORMATION

Ignacio Camacho-Arroyo and Ricardo Tapia

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600,
04510-México, D.F., México

Correspondence should be sent to:

Ricardo Tapia

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado Postal 70-600

04510-México D.F., México

Tel (525) 5505215 x 4935

Fax (525) 5480387

ABSTRACT

In this work we have determined the levels of glycine, glutamate and other amino acids in the rat pontine reticular formation (PRF), as well as some properties of the uptake and release of labeled glycine and glutamate in slices of this region. Glutamate was the most concentrated amino acid in the PRF, although its content was about half that of the striatum. Surprisingly, glycine levels in the PRF were 3.2-fold higher than in the striatum, whereas GABA content was similar in both regions. The uptake of both glycine and glutamate by PRF slices was strictly Na^+ -dependent. Their release was stimulated by K^+ -depolarization, but only the release of glycine was Ca^{2+} -dependent. These findings suggest that glycine is a strong candidate for a neurotransmitter role in the PRF and that glutamate might also play such a role in this region.

KEY WORDS: Pontine reticular formation; glycine; glutamate; neurotransmitter amino acids; uptake and release

INTRODUCTION

Since the publication of the classical paper of Aprison and Werman (1), glycine has been progressively accepted as an inhibitory neurotransmitter in the spinal cord and the brain stem (2), and there is some evidence that it might also be a transmitter in some supraspinal regions such as the cerebral cortex and the cerebellar glomeruli (3,4). In medulla-pons, glycine is as concentrated as in the spinal cord (5), and some findings suggest that it may be a neurotransmitter in the pontine nuclei (6).

In recent studies on the rat pontine reticular formation (PRF), a region involved in diverse physiological processes, including rapid eye movement sleep (7-9), head and eye movements (10-13) and motor activity (14,15), we have shown that γ -aminobutyric acid (GABA) is synthesized, taken up and released by depolarization, and that GABAergic transmission in this area is probably related to the regulation of the sleep-waking cycle (16,17). However, other putative amino acid transmitters have not been studied in this region. Glutamate, an amply distributed excitatory neurotransmitter (18,19), is the most abundant amino acid in medulla-pons (20,21) but, as in the case of glycine, there is no information regarding its levels and possible transmitter role in the PRF. Therefore, in the present work we have measured the levels of glycine, glutamate, GABA and other amino acids in the PRF, as well as the uptake and release of labeled glycine and glutamate in slices of this region.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials. Adult male Wistar rats (250-270 g) were used in all the experiments. [3 H]Glycine (sp. act. 19.1 Ci/mmol) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK) and [1- 14 C]L-glutamic acid (sp. act. 46 mCi/mmol) was from NEN-Dupont (Boston, MA). Ethyleneglycol-bis-(β -amino-ethyl ether)-N,N'-tetra-acetic acid (EGTA), o-phthaldialdehyde, tetrahydrofuran and the amino acids were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade.

Isolation of PRF. After decapitation, the brain was quickly removed and the pons was dissected on ice by means of coronal cuts. Using the atlas of Paxinos and Watson (22) as guide, the PRF of each side was punched out with the help of a Pasteur pipet tip (1.2 mm internal diameter). The PRF regions were sliced or homogenized as required (see below). As previously reported (16) the part of the pons used in this study corresponds to the nucleus reticularis pontis oralis and pontis caudalis.

Uptake experiments. For uptake experiments, the PRF from six rats was cut into 300 μ m-thick slices with a McIlwain tissue chopper. Six slices were pooled and preincubated for 10 min at 37°C in one ml of an oxygenated Krebs-Tris medium containing (in mM concentrations): NaCl 118, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2, glucose 5.6 and Tris-HCl 25, pH 7.4. In the experiments designed to test the Na^+ -dependence of the uptake, NaCl was replaced by an equiosmolar concentration of sucrose. After preincubation, [3 H]glycine (1.0 μ Ci, 10.0 μ M final concentration) or [14 C]glutamate (0.5 μ Ci, 0.5 μ M) was added and

after 10 min the uptake was stopped by dilution with 4 ml of the medium and immediate filtration under moderate vacuum on 0.65 μm cellulose acetate Millipore filters, which were washed twice with 4 ml of the medium. Since the aim of these experiments was essentially to study the Na^+ -dependence of the uptake, a relatively long incubation period was used. No kinetic experiments were carried out.

The slices were digested with 0.2 ml NaOH (1 M) and the radioactivity was counted by liquid scintillation spectrometry, 24 h after the addition of 10 ml of tritosol (23).

Release experiments. Neurotransmitter release was studied by the superfusion method previously described (4). PRF slices from 6 rats were incubated in the Na^+ containing medium under the conditions described above. After incubation with the labeled compounds, the slices were transferred to superfusion chambers, washed by superfusion at 1.5 ml/min during 8 min, and the speed was then adjusted to 1 ml/min for the collection of one-min fractions. Superfusion medium was the same as that used for uptake. After 5 min of superfusion the medium was quickly substituted by one containing a depolarizing K^+ concentration (47 mM, Na^+ was proportionally reduced to maintain osmolarity) and the superfusion was continued for 8 more minutes. When the Ca^{2+} -dependence of the release was evaluated, superfusion with a medium without Ca^{2+} and containing 0.1 mM EGTA was carried out in parallel with the control. At the end of the superfusion, the tissue was digested with 0.3 ml of tissue solubilizer (NCS, Amersham, IL). The radioactivity in each collected fraction and in the solubilized tissue was counted after the addition of 7 ml

of tritosol. Results are expressed as percent of total radioactivity released per minute (total radioactivity = total released + that remaining in the tissue at the end of the superfusion).

Identity of released radioactive glycine. In some experiments the identity of the radioactive glycine released was ascertained by TLC. Pooled fractions corresponding to minutes 3-5 (basal release), 6-8 (peak of stimulated release) and 9-11 were desalted by passing through a Dowex AG 50 column (H⁺ form), eluted with NH₄Cl (2 M), concentrated by evaporation on a hot plate, resuspended in a small volume of 0.1 N HCl, spotted on TLC sheets of silica gel and run with a mixture of 70% ethanol:n-butanol (99:1). Standards of the radioactive glycine were run in parallel. The sheets were cut in 1-cm pieces and radioactivity was counted in each piece after elution with 7 ml of tritosol directly in scintillation vials. In the case of glutamate, it has been previously established that under the experimental conditions used more than 80% of the radioactivity released corresponds to this amino acid (24).

Free amino acid levels. The levels of glycine, glutamate, aspartate, serine, glutamine, threonine, taurine, alanine and GABA were measured in extracts of PRF and striatum. The amino acids were derivatized with o-phthaldialdehyde, separated by HPLC and detected fluorometrically. The determinations in the striatum were carried out with comparative purposes.

Unilateral PRF and striatum were homogenized in 0.2 ml and 0.5 ml of ice-cold water, respectively. An aliquot was taken for

protein determination and a small volume of concentrated perchloric acid (calculated to give a 0.7% final concentration) was immediately added to the homogenates. Protein was sedimented by centrifugation in a Beckman microfuge, and the supernatant was neutralized with KOH and centrifuged again to sediment the precipitated potassium perchlorate.

The amino acids were derivatized with o-phthaldialdehyde (25) and three min later 20 μ l of the mixture were injected into a Beckman Gold System chromatograph. The HPLC procedure was as described by Rajendra (26), which permits a good separation of glycine from threonine. Briefly, the amino acids were separated in a reverse phase ODS column (25 cm x 4 mm internal diameter) and detected fluorometrically in a Beckman fluorometer. The mobile phase was methanol:tetrahydrofuran (97:3)-sodium acetate buffer (pH 7.2, 0.1 M) and was run at 1.5 ml/min in a multistep gradient (65 min, 10% to 90% methanol:tetrahydrofuran). The identification and quantitation of the chromatographic peaks were made by comparison of their retention times with those of standard amino acid mixtures run under identical conditions. When necessary, as in the case of glycine and threonine, internal standards were used to verify the identity of the chromatographic peaks.

Protein was determined by the method of Lowry et al (27).

RESULTS

Uptake experiments. The uptake of labeled glycine and glutamate by PRF slices is shown in Table I. In the presence of Na^+ , glutamate uptake was 18 times higher than that of glycine.

For both amino acids the uptake was strictly Na^+ -dependent, since in the absence of this cation it was reduced by 95-97%.

Release experiments. [^3H]glycine release from PRF slices is shown in Figure 1. The amino acid was well retained by the tissue, since the basal release was <2% per min. Potassium-depolarization resulted in a 2.6-fold peak stimulation of the release in the presence of Ca^{2+} , and when this cation was omitted the stimulation was completely abolished. Glutamate release was also stimulated by K^+ -depolarization, but this stimulation was less notable (1.7-fold peak stimulation) and more variable than in the case of glycine. In addition, it was practically Ca^{2+} -independent (Fig. 1).

The experiments carried out to identify the radioactivity released after loading the tissue with glycine showed that $71\% \pm 2.4$ (mean \pm s.e.m.) of the basal release and $88\% \pm 3.1$ of the stimulated release corresponded to this amino acid ($n = 3$). In these experiments the release of glycine was stimulated 3.3-fold.

Free amino acid levels. As shown in Table II, glutamate was the most concentrated amino acid, both in the PRF and in the striatum, but its levels in the former were nearly 50% lower than in the latter. The content of aspartate, serine, alanine and GABA was similar in both structures. Glutamine, threonine and taurine were more concentrated in the striatum. Glycine was the only amino acid that was considerably more concentrated in the PRF than in the striatum (3.2-fold). Its content in the PRF was slightly higher than that of GABA.

DISCUSSION

The present results indicate that both glycine and glutamate, particularly the former, fulfill some of the neurochemical criteria to be considered as neurotransmitters in the PRF.

In the case of glycine, its concentration in the PRF was more than 3-fold higher than in the striatum. This in general agrees with recent reports in which free amino acids were measured by HPLC, showing that in medulla-pons glycine levels were 2- to 3-fold higher than in the striatum (20,28). As in the pioneer studies on glycine concentration in the CNS (see ref. 2), this finding suggests that this amino acid may be a neurotransmitter in the PRF.

The results of glycine uptake and release strongly support the above possibility. In fact, the uptake was practically abolished when Na^+ was omitted in the medium, and the requirement of this cation is typical of the high affinity transport of neurotransmitter amino acids (29). With respect to release, the labeled amino acid was well retained by PRF slices, which is also a property of amino acid neurotransmitters, not shared by non-transmitter ones such as leucine or α -aminoisobutyric acid (30,31). Furthermore, the release of glycine from PRF slices was stimulated by K^+ -depolarization and this stimulation was strictly dependent on the presence of Ca^{2+} in the medium. This fact is particularly interesting, firstly because it has also been observed in synaptosomes from spinal cord, medulla, cerebral cortex and isolated cerebellar glomeruli (3,4,32), and secondly because the strict Ca^{2+} -dependence of glycine release sharply

contrasts with that of GABA or glutamate, which has been shown to be Ca^{2+} -independent in several CNS preparations (4,33-35). Such Ca^{2+} -dependence is a good indication that the radioactivity released corresponds to glycine and not to non-transmitter metabolites. This was confirmed in the experiments of TLC separation of the compounds released, which showed that glycine accounted for a large proportion (88%) of the radioactivity.

It has been shown that the stimulation of the bulbar reticular formation can inhibit the activity of some neurons in the PRF (36), but the neurotransmitters involved in this process are unknown. In view of the present findings and since neurons in the medullary reticular formation project to the PRF (37), it seems probable that glycine is responsible for such inhibitory action. However, the existence of glycinergic interneurons inside the PRF cannot be discarded.

Differently from glycine, the high concentration of glutamate cannot be considered as an evidence for its transmitter role. However, the findings that this amino acid was taken up by PRF slices in a Na^{+} -dependent manner and that its release was stimulated by K^{+} -depolarization suggest that it may play a neurotransmitter function. Although the stimulated release was practically Ca^{2+} -independent, as mentioned above a partial or total Ca^{2+} -independence of glutamate release in other cerebral regions has been observed (34,35). A neurotransmitter role for this amino acid in the PRF is also supported by a recent report describing the existence of the three main subtypes of excitatory amino acid receptors in this region (38).

Neurons from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei send efferents to the PRF and exhibit glutamate-like immunoreactivity (39,40). PRF also receives cholinergic projections from these nuclei (39), and it has been reported that glutamate and acetylcholine coexist in neurons of both structures (41). Therefore, it is conceivable that PRF receives excitatory input, mediated by glutamate or by acetylcholine, from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei. It has also been demonstrated that electrical stimulation of the PRF induces monosynaptic excitatory postsynaptic potentials in the contralateral PRF (42). This reticular-reticular excitatory pathway might be also mediated by glutamate.

Acknowledgements

This work was supported in part by CoNACyT (Project P228CCOX-880370). The authors thank Patricia Salazar for carrying out the determination of amino acid levels.

REFERENCES

1. Aprison, M. H., and Werman, R. 1965. The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci.* 4:2075-2083.
2. Daly, E. C., and Aprison, M. H. 1983. Glycine. Pages 467-499, in Lajtha, A. (ed.), *Handbook of Neurochemistry*, Plenum Press, New York.
3. Levi, G., Bernardi, G., Cherubini, E., Gallo, V., Marciari, M. G., and Stanzione, P. 1982. Evidence in favor of a neurotransmitter role of glycine in the rat cerebral cortex. *Brain Res.* 236:121-131.
4. Morales, E., and Tapia, R. 1987. Neurotransmitters of the cerebellar glomeruli: uptake and release of labeled γ -aminobutyric acid, glycine, serotonin and choline in a purified glomerulus fraction and in granular layer slices. *Brain Res.* 420:11-21.
5. Daly, E. C., and Aprison, M. H. 1974. Distribution of serine hydroxymethyltransferase and glycine transaminase in several areas of the central nervous system of the rat. *J. Neurochem.* 22:877-885.
6. Aas, J. E., and Brodal, P. 1990. GABA and glycine as putative transmitters in subcortical pathways to the pontine nuclei. A combined immunocytochemical and retrograde tracing study in the cat with some observations in rat. *Neuroscience* 34:149-162.
7. Hobson, J. A., McCarley, R. W., Pivik, R. T., and Freedman, R. 1974. Selective firing by cat pontine brainstem neurons in desynchronized sleep. *J. Neurophysiol.* 37:497-511.
8. Jouvet, M. 1962. *Recherches sur les structures nerveuses et*

- les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. Arch. Ital. Biol. 100:125-206.
9. Friedman, L., and Jones, B. E. 1984. Computer graphics analysis of sleep-wakefulness state changes after pontine lesions. Brain Res. Bull. 13:53-68.
 10. Igusa, Y., Sasaki, S., and Shimazu, H. 1980. Excitatory premotor burst neurons in the cat pontine reticular formation related to the quick phase of vestibular nystagmus. Brain Res. 182:451-456.
 11. Sirkin, D. W., Zedek, Y., and Teitelbaum, P. 1985. Effects of pontine reticular formation lesions on optokinetic head nystagmus in rats. Exp. Brain Res. 58:503-509.
 12. Cohen, B., and Henn, V. 1972. Unit activity in the pontine reticular formation associated with eye movement. Brain Res. 46:403-410.
 13. Sirkin, D. W., Schallert, T., and Teitelbaum, P. 1980. Involvement of the pontine reticular formation in head movements and labyrinthine righting in the rat. Exp. Neurol. 69:435-457.
 14. Siegel, J. M., and McGinty, D. J. 1977. Pontine reticular formation neurons: relationship of discharge to motor activity. Science 196:678-680.
 15. Vertes, R. P. 1979. Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat. J. Neurophysiol. 42:214-228.
 16. Camacho-Arroyo, I., Alvarado, R., and Tapia, R. 1991. Release of acetylcholine and GABA, and activity of their synthesizing

- enzymes in the rat pontine reticular formation. *Neurochem. Res.* (in press).
17. Camacho-Arroyo, I., Alvarado, R., Manjarrez, J., and Tapia, R. 1991. Microinjections of muscimol and bicuculline into the pontine reticular formation modify the sleep-waking cycle in the rat. *Neurosci. Lett.* (in press).
 18. Watkins, J. C., and Evans, R. H. 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21:165-204.
 19. Fonnum, F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42:1-11.
 20. Wetherell, J. R., Fosbraey, P., and French, M. C. 1989. A comparison of the distribution of neurotransmitters in brain regions of the rat and guinea-pig using a chemiluminescent method and HPLC with electrochemical detection. *J. Neurochem.* 53:1519-1526.
 21. Karlsson, A., Fonnum, F., Malthe-Sorensen, D., and Storm-Mathisen, J. 1974. Effect of the convulsive agent 3-mercaptopropionic acid on the levels of GABA, other amino acids and glutamate decarboxylase in different regions of the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 23:3053-3061.
 22. Paxinos, G., and Watson, C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, Sydney.
 23. Fricke, U. 1975. Tritosol: a new scintillation cocktail based on triton X-100. *Anal. Biochem.* 63:555-558.
 24. Sandoval, M. E., Horch, P., and Cotman, C. W. 1978. Evaluation of glutamate as a hippocampal neurotransmitter: glutamate uptake and release from synaptosomes. *Brain Res.* 142:285-299.

25. Lenda, K., and Svenneby, G. 1980. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in synaptosomal extracts. *J. Chromatogr.* 198:516-519.
26. Rajendra, W. 1987. High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *J. Liq. Chromatogr.* 10:941-955.
27. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
28. Langlais, P. J., Mair, R. G., Anderson, C. D., and McEntee, W. J. 1988. Long-lasting changes in regional brain amino acids and monoamines in recovered-pyridoxamine treated rats. *Neurochem. Res.* 13:1199-1206.
29. Erecinska, M. 1987. The neurotransmitter amino acid transport systems. *Biochem. Pharmacol.* 36:3547-3555.
30. López-Colomé, A. M., Tapia, R., Salceda, R., and Pasantes-Morales, H. 1978. K^+ -stimulated release of labeled γ -aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system. *Neuroscience* 3:1069-1074.
31. Tapia, R., and Arias, C. 1982. Selective stimulation of neurotransmitter release from chick retina by kainic and glutamic acids. *J. Neurochem.* 39:1169-1178.
32. Osborne, R. H., and Bradford, H. F. 1973. Patterns of amino acid release from nerve endings isolated from spinal cord and medulla. *J. Neurochem.* 21:407-419.

33. Drew, K. L., O'Connor, W. T., Kehr, J., and Ungerstedt, U. 1989. Characterization of gamma-aminobutyric acid and dopamine overflow following acute implantation of a microdialysis probe. *Life Sci.* 45:1307-1317.
34. Lopez-Garcia, J. C., Bermúdez-Rattoni, F., and Tapia, R. 1990. Release of acetylcholine, γ -aminobutyrate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. *Brain Res.* 523:100-104.
35. Arias, C., Montiel, T., and Tapia, R. 1990. Transmitter release in hippocampal slices from rats with limbic seizures produced by systemic administration of kainic acid. *Neurochem. Res.* 15:641-645.
36. Ito, K., and McCarley, R. W. 1987. Physiological studies of brainstem reticular connectivity. I. Responses of mPRF neurons to stimulation of bulbar reticular formation. *Brain Res.* 409:97-110.
37. Shammah-Lagnado, S. J., Negrao, N., Silva, B. A., and Ricardo, J. A. 1987. Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 20:961-989.
38. Stevens, D. R., McCarley, R. W., and Green, R. W. 1990. Excitatory amino acid mediated responses in the pontine reticular formation of the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 16:728.
39. Mitani, A., Ito, K., Hallanger, A. E., Wainer, B. H., Kataoka, K., and McCarley, R. W. 1988. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res.* 45:397-402.

40. Clements, J. R., and Grant, S. 1990. Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci. Lett.* 120:70-73.
41. Clements, J. R., and Grant, S. 1990. Glutamate and acetylcholine are colocalized in the laterodorsal and pedunculopontine nuclei. *Soc. Neurosci. Abstr.* 16:1189.
42. McCarley, R. W., Ito, K., and Rodrigo-Angulo, M. L. 1987. Physiological studies of brainstem reticular connectivity. II. Responses of mPRF neurons to stimulation of mesencephalic and contralateral pontine reticular formation. *Brain Res.* 409: 111-127.

Table I. [^3H]Glycine and [^{14}C]glutamate uptake by rat PRF slices

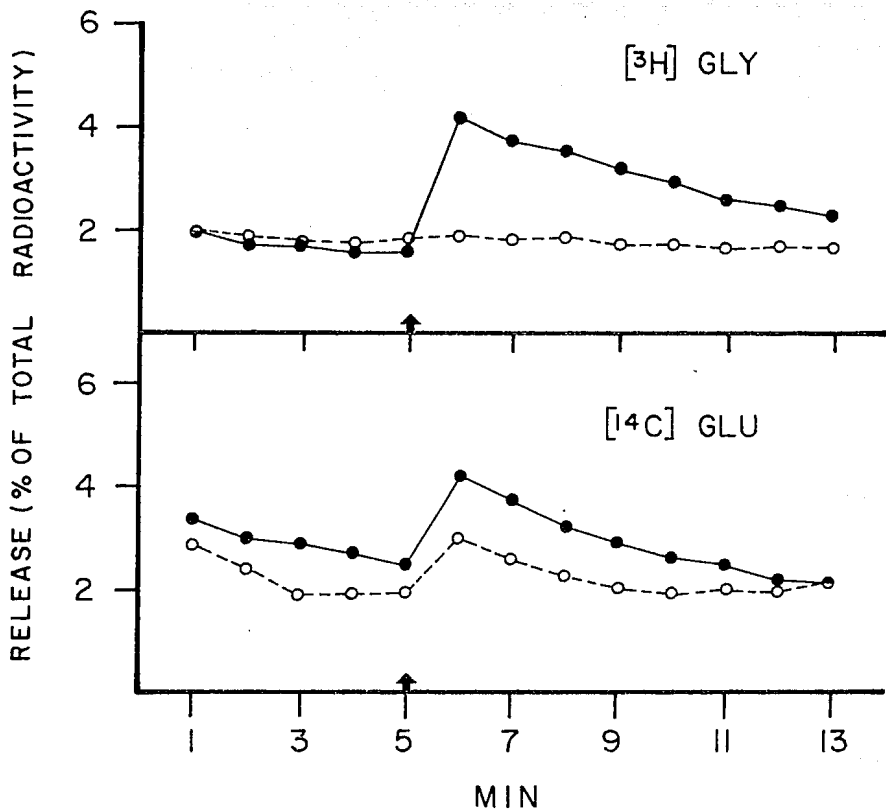
| | Glycine | Glutamate |
|------------|------------------|------------------|
| Na $^+$ | 1.44 \pm 0.14 | 26.00 \pm 4.13 |
| No Na $^+$ | 0.05 \pm 0.01* | 1.35 \pm 0.24* |

Results are expressed as nmol/mg protein. Mean values of 6 independent experiments \pm S.E.M. *p < 0.001, as compared to the corresponding value in the presence of Na $^+$ (Student's t-test).

| | PRF | Striatum |
|-----------|------------|------------|
| Glutamate | 40.3 ± 2.0 | 74.7 ± 5.5 |
| Glycine | 15.0 ± 2.6 | 4.6 ± 1.3 |
| GABA | 13.5 ± 1.0 | 13.6 ± 1.7 |
| Aspartate | 17.5 ± 1.0 | 22.4 ± 1.3 |
| Serine | 10.8 ± 2.0 | 9.3 ± 0.2 |
| Glutamine | 13.5 ± 0.7 | 27.8 ± 4.4 |
| Threonine | 4.2 ± 0.6 | 11.7 ± 7.2 |
| Taurine | 10.0 ± 1.7 | 24.4 ± 3.9 |
| Alanine | 5.3 ± 1.2 | 7.5 ± 2.1 |

Values are nmol/mg protein. Mean values of 5 independent experiments ± S.E.M.

Fig. 1. Basal and stimulated release of labeled glycine and glutamate from PRF slices in the presence (filled circles) and absence (open circles) of Ca^{2+} . After loading the slices they were washed and superfused as described under Experimental Procedure. At 5 min (arrow) the superfusion medium was substituted by a depolarizing medium containing 47 mM KCl. Each point is the mean value of 5 experiments carried out in duplicate. The maximum S.E.M. was 18% of the corresponding mean, but for most points, particularly for glycine release, it was smaller than 10%.



3.1.0. DISCUSION GENERAL.

3.1.1. Datos neuroquímicos y electrofisiológicos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la acetilcolina, el GABA, el glutamato y la glicina pueden actuar como neurotransmisores en la FRP de la rata y que la transmisión GABAérgica en esta región está involucrada en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

En este estudio se lograron caracterizar procesos tales como la captura dependiente de Na^+ , tanto de los aminoácidos como de la colina (precursor de la acetilcolina), la actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo del GABA y de la acetilcolina, la liberación de los neurotransmisores inducida por despolarización, y en el caso de los aminoácidos, su concentración. La cuantificación de estos parámetros es indispensable para considerar a alguna sustancia como neurotransmisor.

Acetilcolina. El papel de la acetilcolina como neurotransmisor de la FRP, se propone con base en los resultados obtenidos tanto en este como en otros estudios (fisiológicos, farmacológicos e inmunohistoquímicos) que en conjunto apoyan dicho papel.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la existencia de un sistema de captura del precursor, una liberación de la acetilcolina inducida por despolarización dependiente de Ca^{2+} y una actividad importante de las enzimas de síntesis y degradación de este neurotransmisor.

Los datos anteriores proporcionan una base neuroquímica a los

antecedentes que se tenían sobre la transmisión colinérgica en la FRP y que demostraban su participación en la regulación de la excitabilidad de las neuronas de esta zona, la presencia de fibras y terminales colinérgicas provenientes de los núcleos tegmental laterodorsal y pedúnculo pontino, así como su papel en la inducción y mantenimiento del SP (40,42,45,46,67).

Esta caracterización neuroquímica permite plantear estudios sobre los cambios que ocurren en la FRP a nivel de la captura, la liberación o la actividad de las enzimas de síntesis y degradación de la acetilcolina, durante las diferentes fases del ciclo sueño-vigilia, o durante estados patológicos como la narcolepsia, en la cual se presentan anomalías claras en el patrón de sueño que se caracterizan principalmente por una aparición de SP durante el día que puede presentarse incluso sin que le anteceda una fase de SQL.

Es posible que durante el SP se observe un incremento en la transmisión colinérgica en la FRP respecto a las otras fases del ciclo sueño-vigilia, que se pueda manifestar, por ejemplo, a través de un aumento en la liberación de la acetilcolina.

La descripción de la liberación de la acetilcolina en la FRP realizada en este estudio permite pensar en experimentos sobre los posibles neurotransmisores que regulan tal proceso y que a este nivel pudieran tener efectos importantes sobre el ciclo sueño-vigilia. La posible inhibición de la actividad neuronal en la FRP producida por la serotonina y la noradrenalina sobre las neuronas de la FRP, que mantendría el estado de SQL y de vigilia en el animal, se podría valorar por medio de su efecto sobre la

liberación de acetilcolina en un sistema de rebanadas de la FRP.

GABA. Los eventos presinápticos de la transmisión GABAérgica evaluados en este estudio permiten sugerir también que el GABA puede participar como neurotransmisor en la FRP de la rata, ya que se demostró la existencia de un sistema de captura dependiente de Na^+ , una actividad importante de la enzima de síntesis del GABA dependiente de su coenzima, una liberación inducida por despolarización y una concentración de este aminoácido similar a la encontrada en los sitios en los que funciona como neurotransmisor.

La liberación de GABA en la FRP fue independiente de Ca^{2+} , lo cual concuerda con experimentos realizados tanto "in vivo" como "in vitro" en otras regiones cerebrales (84-86). A diferencia de la liberación de la acetilcolina, que es estrictamente dependiente de Ca^{2+} , en el caso de la liberación de GABA se han propuesto dos mecanismos de liberación, uno dependiente de Ca^{2+} y otro independiente de éste pero dependiente de Na^+ . En el segundo mecanismo, el incremento en la concentración intracelular de Na^+ producido por una despolarización, provocaría la liberación de GABA a través de una reversión en el mecanismo de recaptura del aminoácido cuya direccionalidad depende del gradiente de Na^+ (84,87).

El papel fisiológico de la transmisión inhibitoria mediada por el GABA en la FRP no se conocía, por tal motivo después de haber realizado el estudio neuroquímico, se trató de conocer dicho papel, a través de microinyecciones de un agonista (muscimol) y de un antagonista (bicuculina) del GABA en la FRP y el registro del ciclo sueño-vigilia.

Estos experimentos demostraron que el GABA puede participar en la regulación de la vigilia pero no en la del SP, ya que el muscimol incrementó la vigilia, mientras que la bicuculina tendió a inducir SOL y ninguno de los dos fármacos tuvo un efecto importante sobre el SP.

Los resultados anteriores añaden más elementos al panorama que se tenía acerca de la regulación del ciclo sueño-vigilia a nivel de la FRP, en la cual se consideraba básicamente la participación de dos componentes: uno integrado por la transmisión aminérgica (serotoninérgica o noradrenergica) proveniente de los núcleos del rafe o del locus coeruleus que estarían inhibiendo a las poblaciones de la FRP y mantendrían un estado de vigilia o de SOL y otro formado por la transmisión colinérgica de la FRP, la cual se incrementaría una vez disminuida la tasa de disparo en las poblaciones aminérgicas e induciría la aparición del SP (67).

En este trabajo se hace evidente que, además de estos elementos, también el GABA puede participar en la regulación del ciclo sueño-vigilia. El incremento en la vigilia producido por las microinyecciones de muscimol sugiere que la actividad neuronal en la FRP es importante no sólo para la aparición y el mantenimiento del SP, sino también para la regulación de las otras fases del ciclo sueño-vigilia.

Para tener una visión más clara del papel de la transmisión GABAérgica en este fenómeno a nivel de la FRP, es necesaria la realización de estudios que permitan correlacionar las diferentes etapas del ciclo sueño-vigilia con la tasa de disparo de las poblaciones GABAérgicas de la FRP o de los sitios de origen de

las proyecciones GABAérgicas que llegan a ella, conocer el efecto de las lesiones de tales sitios sobre el ciclo sueño vigilia y la participación de los receptores GABA_A en dicho proceso.

Se podrían evaluar también las interacciones de los diferentes sistemas de neurotransmisión en la FRP mediante el análisis del papel del GABA en la liberación de la acetilcolina en rebanadas de la FRP y de su efecto sobre la aparición de SP inducida por agonistas colinérgicos en esta zona.

Se observó que la transmisión GABAérgica en la FRP no solamente interviene en la regulación del ciclo sueño-vigilia, sino también en el control de la posición de la cabeza, ya que los animales inyectados con muscimol presentaron una flexión de la cabeza ipsilateral al sitio de inyección que duró aproximadamente 90 minutos. La participación del GABA en este fenómeno deberá ser estudiada más minuciosamente. Otro aspecto por conocer es el sitio de origen de las aferencias GABAérgicas a la FRP, ya que no se cuenta hasta el momento con un estudio detallado al respecto.

El posible origen de las proyecciones GABAérgicas que llegan a la FRP podría conocerse mediante el uso de técnicas combinadas de doble marcaje que permitieran conocer mediante marcaje retrogrado, con el uso de peroxidasa de rábano, los sitios que proyectan a la FRP y con una tinción inmunocitoquímica, usando anticuerpos dirigidos contra la glutamato descarboxilasa, las neuronas GABAérgicas. Las neuronas con doble marca serían las responsables de la información GABAérgica que llega a la FRP.

Glutamato. El papel del glutamato como neurotransmisor en la FRP se evaluó por medio de experimentos de captura, liberación y

determinación de su concentración, sin embargo es necesario realizar experimentos que permitan la caracterización de los diferentes receptores al glutamato en esta región, para poder contar con una visión más completa sobre la transmisión mediada por los aminoácidos excitadores en la FRP.

Uno de los datos neuroquímicos que llama la atención es la independencia de Ca^{2+} en la liberación del glutamato. El mecanismo por el cual se liberaría este aminoácido de una manera independiente de Ca^{2+} sería similar al descrito para el GABA anteriormente, en el cual la reversión en el sistema de recaptura del glutamato dependiente de Na^{+} desempeñaría un papel fundamental en la salida del neurotransmisor (88).

La existencia de la transmisión glutamatérgica en la FRP está apoyada por estudios inmunohistoquímicos y fisiológicos. En los primeros se ha demostrado la presencia de este aminoácido en los somas de las neuronas del núcleo tegmental laterodorsal y del pedúnculo pontino, que son regiones que proyectan a la FRP (13,16), mientras que en los segundos se ha registrado un incremento en la excitabilidad de las neuronas de la FRP inducido por el glutamato, el aspartato y por agonistas (N-metil-D-aspartato, kainato y quisqualato) de los diferentes tipos de receptores a aminoácidos excitadores (56,57).

En las neuronas reticuloespinales de la FRP se ha demostrado que el glutamato es un excitador más potente que el aspartato, mientras que en neuronas que proyectan a otras zonas, el aspartato es más potente (56). Estos datos apoyan la presencia de los diferentes tipos de receptores a aminoácidos excitadores en

la FRP.

Hasta el momento, no se conoce el papel fisiológico del glutamato en la FRP. Es probable que este aminoácido participe en los eventos que llevan a la aparición de SP, a través de una excitación de las neuronas de la FRP. La coexistencia de acetilcolina y glutamato en las neuronas de los núcleos tegmental laterodorsal y pedúnculo pontino hace pensar que estas podrían excitar a las neuronas de la FRP a través de la liberación tanto de acetilcolina como de glutamato y así disparar los procesos característicos del SP.

Para comprobar esta suposición es necesario realizar un estudio en el que se apliquen los diversos agonistas o antagonistas de los receptores a glutamato en la FRP y se registre el ciclo sueño-vigilia. Con estos experimentos, se podrá conocer también cuales son los receptores a aminoácidos excitadores que participan en la regulación del sueño o de los otros procesos en los que está involucrada la FRP.

Glicina. Los datos neuroquímicos sobre la transmisión mediada por glicina en la FRP indican que este aminoácido puede participar como neurotransmisor en esta región. Aunque existen varios trabajos sobre la transmisión glicinérgica en otras zonas del tallo cerebral, solamente hay un estudio sobre ésta en la FRP en el que se valoró el efecto de la aplicación iontoforética de glicina. En tal estudio se muestra una inhibición de las neuronas de la FRP del gato después de dicha aplicación (56).

El conocimiento de los sitios de origen de las aferencias glicinérgicas por medio de estudios inmunohistoquímicos, así como la evaluación del papel fisiológico de la glicina en la FRP a

través de experimentos que incluyan microinyecciones tanto de este aminoácido como de su antagonista estricnina y la valoración de los procesos en los que está involucrada la FRP como el ciclo sueño-vigilia, permitirán contar con un panorama más claro sobre la importancia de la transmisión glicinérgica en la FRP.

Un aspecto interesante por estudiar sobre la transmisión glicinérgica en la FRP es evaluar el papel de la glicina como neurotransmisor inhibitorio a través de la interacción con su receptor y el papel que tiene como modulador positivo de la transmisión excitadora mediada por los receptores sensibles a N-metil-D-aspartato.

En este sentido será importante identificar a los receptores de glicina sensibles a estricnina y a los sitios moduladores presentes en el receptor a N-metil-D-aspartato que son insensibles a este fármaco.

En conclusión, los datos sugieren que la acetilcolina, el GABA, el glutamato y la glicina pueden participar como neurotransmisores en la FRP de la rata. El papel de la transmisión colinérgica en la FRP está relacionado con la aparición y el mantenimiento del SP, el del GABA con la regulación de la vigilia y probablemente con la regulación de los movimientos de cabeza, mientras que el papel tanto del glutamato como de la glicina está por dilucidarse.

Es posible que además de los cuatro neurotransmisores mencionados, otras sustancias como la serotonina, la noradrenalina y algunos péptidos participen en la comunicación neuronal en la FRP.

3.1.2. Perspectivas del estudio.

En este estudio se presentan algunos datos neuroquímicos que sugieren el papel de la acetilcolina, el GABA, el glutamato y la glicina como neurotransmisores de la FRP de la rata. Dada la carencia de estudios neuroquímicos sobre la FRP, este trabajo aporta información relevante para el conocimiento de esta región del tallo cerebral.

La caracterización de algunos de los neurotransmisores de la FRP llevada a cabo en esta tesis permite plantear diversos proyectos de investigación sobre la neurotransmisión en la FRP, en los que se podría estudiar el papel como neurotransmisores de sustancias como la serotonina o la noradrenalina por medio de experimentos similares a los efectuados en este trabajo.

Se pueden realizar experimentos que lleven al conocimiento de las interacciones de los neurotransmisores de la FRP tanto "in vivo" como "in vitro". Los resultados derivados de estos experimentos proporcionarán información valiosa sobre los mecanismos de regulación de la actividad neuronal en la FRP y de los procesos fisiológicos en los que esta región participa de manera importante.

Por otro lado el papel de la transmisión GABAérgica en la FRP se valoró por primera vez en este estudio a través de microinyecciones de un agonista y un antagonista del GABA en la FRP y el registro del ciclo sueño-vigilia, encontrándose que la transmisión GABAérgica participa en la regulación de la vigilia de la rata. Con un enfoque experimental parecido a éste se puede empezar a estudiar el papel de la transmisión glutamatérgica y glicinérgica en la FRP.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo dan una base neuroquímica para la realización de diferentes estudios sobre la FRP y añaden otros componentes al esquema que se tenía sobre la regulación del ciclo sueño-vigilia.

4. REFERENCIAS.

4.1. Literatura citada en la tesis.

1. French, J. D. 1957. The reticular formation. Sci. Am. 196:54-60.
2. López Antúnez, L. 1983. Anatomía Funcional del Sistema Nervioso. Limusa. México. 501-522.
3. Andrezik, J. A. and Beitz, A. J. 1985. Reticular formation, central gray and related tegmental nuclei. In: Paxinos, G. (Ed.). The rat nervous system. Academic Press. New York. 1-24.
4. Vertes, R. P. 1990. Fundamentals of brain stem anatomy: A behavioral perspective. In: Klemm, W. R. and Vertes, R. P. (Eds.). Brainstem mechanisms of behavior. John Wiley and Sons, Inc. New York. 33-103.
5. Scheibel, M. E. and Scheibel, A. B. 1958. Structural substrates for integrative patterns in the brain stem reticular core. In: Jasper, H., Proctor, L. D., Knighton, R. S., Noshay, W. S. and Costello, R. T. (Eds.). Reticular formation of the brain. Little Brown, Co. Boston. 31-55.
6. Brodal, A. 1969. Neurological anatomy in relation to clinical medicine. Oxford University Press. London. 315 pp.
7. Moruzzi, G. and Magoun, H. W. 1949. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1:455-473.
8. Lindsley, D. B., Bowden, J. W. and Magoun, H. W. 1949. Effect upon the EEG of acute injury to the brainstem activating system. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1:475-486.
9. Klemm, W. R. 1990. Historical and introductory perspectives on

- Brainstem-mediated behaviors. In: Klemm, W. R. and Vertes, R. P. (Eds.). Brainstem mechanisms of behavior. John Wiley and Sons, Inc. New York. 3-32.
10. Paxinos, G., and Watson, C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Sydney.
 11. Shammah-Lagnado, S. J., Negrao, N., Silva, B. A., and Ricardo, J. A. 1987. Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat. Neuroscience, 20:961-989.
 12. Vertes, R. P., and Martin, G. F. 1988. Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. J. Comp. Neurol. 275:511-541.
 13. Mitani, A., Ito, K., Hallanger, A. E., Wainer, B. H., Kataoka, K., and McCarley, R. W. 1988. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. Brain Res. 45:397-402.
 14. Ito, K. and McCarley, R. W. 1987. Physiological studies of brainstem reticular connectivity. I. Responses of mPRF neurons to stimulation of bulbar reticular formation. Brain Res. 97-110.
 15. Gallager, D. W., and Pert, A. 1978. Afferents to brain stem nuclei (brain stem raphe, nucleus reticularis pontis caudalis and nucleus gigantocellularis) in the rat as demonstrated by microiontophoretically applied horseradish peroxidase. Brain Res. 144:257-275.
 16. Clements, J. R., and Grant, S. 1990. Glutamate-like

- immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. Neurosci. Lett. 120:70-73.
17. Oertel, W. H., Tappaz, M. L., Berod, A. and Mugrini, E. 1982. Two-color immunocytochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. Brain Res. Bull. 9:463-474.
18. Jones, B. E., and Beaudet, A. 1987. Retrograde labeling of neurons in the brain stem following injections of [³H]choline into the forebrain of the rat. Exp. Brain Res. 65:437-448.
19. Büttner-Ennever, J. A., and Henn, V. 1976. An autoradiographic study of the pathways from the pontine reticular formation involved in horizontal eye movements. Brain Res. 108:155-164.
20. Grantyn, R., Baker, R., and Grantyn, A. 1980. Morphological and physiological identification of excitatory pontine reticular neurons projecting to the cat abducens nucleus and spinal cord. Brain Res. 198:221-228.
21. Jones, B. E. and Zang, I. Z. 1985. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. J. Comp. Neurol. 242:86-92.
22. McCarley, R. W., Ito, K., and Rodrigo-Angulo, M. L. 1987. Physiological studies of brainstem reticular connectivity. II. Responses of mPRF neurons to stimulation of mesencephalic and contralateral pontine reticular formation. Brain Res. 409:111-127.
23. Siegel, J. M., and McGinty, D. J. 1977. Pontine reticular

- formation neurons: relationship of discharge to motor activity. Science, 196:678-680.
24. Siegel, J. M. 1979. Behavioral functions of the reticular formation. Brain Res. Rev. 1:69-105.
25. Cohen, B. 1978. Pontine reticular formation neurons and motor activity. Science, 198:207.
26. Miliareisis, E. and Phillippe, L. 1984. The pontine substrate of circling behavior. Brain Res. 293:143-152.
27. Friedman, L., and Jones, B. E. 1984. Computer graphics analysis of sleep-wakefulness state changes after pontine lesions. Brain Res. Bull. 13:53-68.
28. Sirkin, D. W., Schallert, T., and Teitelbaum, P. 1980. Involvement of the pontine reticular formation in head movements and labyrinthine righting in the rat. Exp. Neurol. 69:435-457.
29. Sirkin, D. W., Zedek, Y., and Teitelbaum, P. 1985. Effects of pontine reticular formation lesions on optokinetic head nystagmus in rats. Exp. Brain Res. 58:503-509.
30. Isa, T., and Sasaki, S. 1988. Effects of lesion of paramedian pontomedullary reticular formation by kainic acid injection on the visually triggered horizontal orienting movements in the cat. Neurosci. Lett. 87:233-239.
31. Suzuki, S. S., Siegel, J. M., and Wu, M. 1989. Role of pontomedullary reticular formation neurons in horizontal head movements: an ibotenic lesion study in the cat. Brain Res. 484:78-93.
32. Levante, A., Cesaro, P., and Albe-Fessard, D. 1983. Electrophysiological and anatomical demonstration of a bulbar

- relayed pathway towards the medial thalamus in the rat. Neurosci. Lett. 38:139-144.
33. Sar, M., Stumpf, W. E., Miller, R. J., Chang, K. J., and Cuatrecasas, S. P. 1978. Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. J. Comp. Neurol. 182:17-38.
34. Kalivas, P.W., Jennes, L., Nemeroff, C. B., and Prange, A. J. 1982. Neurotensin: topographical distribution of brain sites involved in hypothermia and antinociception. J. Comp. Neurol. 210:225-238.
35. Peterson, B. W. and Abzug, C. 1975. Properties of projections from vestibular nuclei to medial reticular formation in the cat. J. Neurophysiol. 38:1421-1435.
36. Peterson, B. W., Filion, M., Felpel, L. P. and Abzug, C. 1975. Responses to medial reticular neurons to stimulation of the vestibular nerve. Exp. Brain Res. 22:335-350.
37. Pompeiano, O., and Barnes, C. D. 1971. Responses of brain stem reticular neurons to muscle vibration in the decerebrate cat. J. Neurophysiol. 34:709-724.
38. Gabriel, M., Gregg, B., Clancy, A., Kittrell, M. and Dailey, W. 1986. Brainstem reticular formation neuronal correlates of stimulus significance and behavior during discriminative avoidance conditioning in rabbits. Behav. Neurosci. 100:171-184.
39. Mueller, G. and Klingberg, F. 1990. Learning and retrieval are impaired after lesions of ventral part of rat's nucleus reticularis pontis oralis. Biomed. Biochim. Acta. 49:51-58.

40. Greene, R. W., Gerber, U., and McCarley, R. W. 1989. Cholinergic activation of medial pontine reticular formation neurons in vitro. Brain Res. 476:154-159.
41. Ito, K. and McCarley, R. W. 1984. Alterations in membrane potential and excitability of cat medial pontine reticular formation neurons during changes in naturally occurring sleep-wake states. Brain Res. 292:169-175.
42. Shiromani, P. J., and McGinty, D. J. 1986. Pontine neuronal response to local cholinergic infusion: relation to REM sleep. Brain Res. 386:20-31.
43. Elazar, Z. and Feldman, Z. 1987. Brainstem experimental seizures produced by microinjections of carbachol. Epilepsia. 28:463-470.
44. Elazar, Z. and Paz, M. 1990. Catalepsy induced by carbachol microinjected into the pontine reticular formation of rats. Neurosci. Lett. 115:226-230.
45. Baghdoyan, H. A., Rodrigo-Angulo, M. L., McCarley, R. W. and Hobson, J. A. 1987. A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. Brain Res. 414:245-261.
46. Jones, B. E. 1990. Immunohistochemical study of choline acetyltransferase-immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat. J. Comp. Neurol. 295:485-514.
47. Shiromani, P. J., Armstrong, D. M. and Gillin, J. C. 1988. Cholinergic neurons from the dorsolateral pons project to the medial pons: A WGA-HRP and choline acetyltransferase immunohistochemical study. Neurosci. Lett. 95:19-23.

48. Shiromani, P. J., Armstrong, D. M., Bruce, G., Hersh, L. B., Groves, P. M. and Gillin, J. C. 1987. Relation of pontine choline acetyltransferase immunoreactive neurons with cells which increase discharge during REM sleep. Brain Res. Bull. 18:447-455.
49. Tago, H., McGeer, P. L., McGeer, E. G., Akiyama, H., and Hersh, L. B. 1989. Distribution of choline acetyltransferase immuno-positive structures in rat brainstem. Brain Res. 495:271-297.
50. Border, B. G., Kosinski, R. J., Azizi, S. A. and Mihailoff, G. A. 1986. Certain basilar pontine afferent systems are GABA-ergic: Combined HRP and immunocytochemical studies in the rat. Brain Res. Bull. 17:169-179.
51. Border, B. G., and Mihailoff, G. A. 1985. GAD-immunoreactive neural elements in the basilar pontine nuclei and nucleus reticularis tegmenti pontis of the rat. 1. Light microscopic studies. Exp. Brain Res. 59:600-614.
52. Brodal, P., Mihailoff, G., Border, B., Ottersen, U. P., and Storm-Mathisen, J. 1988. GABA-containing neurons in the pontine nuclei of rat, cat and monkey. An immunocytochemical study. Neuroscience. 23:27-45.
53. Nagai, T., Maeda, T., Imai, H., McGeer, P. L., and McGeer, E. G. 1985. Distribution of GABA-T-intensive neurons in rat hindbrain. J. Comp. Neurol. 231:260-269.
54. Hironaka, T., Morita, Y., Hagihira, S., Tateno, E., Kita, H., and Tohyama, M. 1990. Localization of GABA_A-receptor α_1 subunit mRNA-containing neurons in the lower brainstem of the

- rat. Mol. Brain Res. 7:335-345.
55. Chu, D. C. M., Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. 1990. Distribution and kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. Neuroscience, 34:341-357.
56. Greene, R. W. and Carpenter, D. O. 1985. Actions of neurotransmitters on pontine medial reticular formation neurons of the cat. J. Neurophysiol. 54:520-531.
57. Stevens, D. R., McCarley, R. W., and Green, R. W. 1990. Excitatory amino acid mediated responses in the pontine reticular formation of the rat. Soc. Neurosci. Abstr. 16:728.
58. Daly, E. C. and Aprison, M. H. 1983. Glycine. In: Lajtha, A. (Ed.). Handbook of Neurochemistry. Plenum Press. New York. 467-499.
59. Daly, E. C. and Aprison, M. H. 1974. Distribution of serine hydroxymethyltransferase and glycine transaminase in several areas of the central nervous system of the rat. J. Neurochem. 22:877-885.
60. Tebécis, A. K. 1973. Transmitters and reticulospinal neurons. Exp. Neurol. 40:297-308.
61. Eiden, L.E., Njilaver, G., and Palkovits, M. 1982. Distribution of vasointestinal polypeptide (VIP) in the rat brainstem nuclei. Brain Res. 231:472-477.
62. Hobson, J.A., Mc Carley, R.W., and Wyzinski, P.W. 1975. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brain stem neuronal groups. Science, 189:55-58.
63. Monnier, M., Bremer, F., Gaillard, J.M., Hediger, H., Horne, J. A., Parmeggiani, P.L., Passovant, P., and Ross, G. F.

1980. Biology of sleep. An interdisciplinary survey. Experientia, 36:1-27.
64. Jouvet, M. 1962. Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. Arch. Ital. Biol. 100:125-206.
65. Aserinsky, E., and Kleitman, N. 1953. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. Science, 118:273-274.
66. Dement, W.C., and Kleitman, N. 1957. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements during sleep to dream activity. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 9:673-690.
67. Hobson, J.A., Lydic, R., and Baghdoyan, H.A. 1986. Evolving concepts of sleep cycle generation. Behav. Brain Sci. 9:371-448.
68. Hobson, J. A. 1965. The effects of chronic brain-stem lesions on cortical and muscular activity during sleep and waking in the cat. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 19:41-62.
69. Jones, B. E. 1979. Elimination of paradoxical sleep by lesions of the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. Neurosci. Lett. 13:285-293.
70. Drucker-Colin, R. and Pedraza, J. G. B. 1983. Kainic acid lesions of gigantocellular tegmental field (FTG) neurons do not abolish REM sleep. Brain Res. 272:387-391.
71. Siegel, J. M., Nienhuis, R., Wheeler, R. L., McGinty, D. J. and Harper, R. M. 1981. Discharge pattern of reticular formation unit pairs in waking and REM sleep. Exp. Neurol.

72. Lydic, R., Baghdoyan, L., Hibbard, L., Bonyak, E. V., De Joseph, M. R. and Hawkins, R. A. 1991. Regional brain glucose metabolism is altered during rapid eye movement sleep in the cat: A preliminary study. J. Comp. Neurol. 304:517-529.
73. Fung, S.S., Boxer, P.A., Morales, F.R., and Chase, M.H. 1982. Hiperpolarizing membrane responses induced in lumbar motoneurons by stimulation of the nucleus reticularis pontis oralis during active sleep. Brain Res. 248:267-273.
74. Cohen, B., and Komatsuzaki, A. 1972. Eye movements induced by stimulation of the pontine reticular formation. Evidence for integration in oculomotor pathways. Exp. Neurol. 36:101-117.
75. Gnadt, J. W., and Pegram, G. V. 1986. Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. Brain Res. 384:26-41.
76. Baghdoyan, H. A., Monaco, A.P., Rodrigo-Angulo, M. L., Assens, F., McCarley, R. W., and Hobson, J. A. 1984. Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 231:173-180.
77. Hobson, J.A., Goldberg, M., Vivaldi, E., and Riew, O. 1983. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjections of the muscarinic agonist betanecol. Brain Res. 279:127-136.
78. Velazquez-Moctezuma, J., Shalauta, M., Gillin, J. C. and Shiromani, P. J. 1991. Cholinergic antagonists and REM sleep generation. Brain Res. 543:175-179.
79. Mendelson, W. B. 1984. The benzodiazepin receptor and sleep. Psychiatr. Develop. 3:161-177.

80. Mendelson, W. B., Martin, J. V., Perlis, M., and Wagner, R. 1989. Enhancement of sleep by microinjection of triazolam into the medial preoptic area. Neuropsychopharmacology, 2:61-66.
81. Lin, J. S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G., and Jouvet, M. 1989. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. Brain Res. 479:225-240.
82. Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N., and Jouvet, M. 1989. Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. Neuroscience, 32:669-683.
83. Juhász, G., Emri, Z., Kékesi, K., and Fungor, K. 1989. Local perfusion of the thalamus with GABA increases sleep and induces long-lasting inhibition of somatosensory event-related potentials in cats. Neurosci. Lett. 103:229-233.
84. Arias, C., and Tapia, R. 1986. Differential calcium-dependence of γ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. J. Neurochem. 47:396-404.
85. Cunningham, J. O., and Neal, M. J. 1981. On the mechanism by which veratridine causes a calcium-independent release of γ -aminobutyric acid from brain slices. Br. J. Pharmacol. 73:655-667.
86. Drew, K. L., O'Connor, W. T., Kehr, J., and Ungerstedt, U. 1989. Characterization of gamma-aminobutyric acid and dopamine overflow following acute implantation of a

microdialysis probe. Life Sci. 45:1307-1317.

87. Turner, T. J., and Goldin, S. M. 1989. Multiple components of synaptosomal [³H]- γ -aminobutyric acid release resolved by a rapid superfusion system. Biochemistry, 28:586-593.

88. Nicholls, D., and Attwell, D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. JPS, 11:462-468.