

03068

1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado.
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

"EFECTOS DE LA PRIVACION DE SUEÑO MOR
SOBRE LOS NIVELES EXTRACELULARES DE
5-HT/5-HIAA EN LA FORMACION RETICULAR
MEDIAL BULBAR DE LA RATA; UN ESTUDIO CON
MICRODIALISIS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

BIOL. CARLOS ANTONIO BLANCO CENTURION

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL J. SALIN PASCUAL

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1

272970



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a:

Al pueblo trabajador que con sus contribuciones al erario, vía el CONACYT o la UNAM, han pagado a mis profesores, el equipo que he requerido para mis experimentos, los libros en los que he estudiado, la beca con la que me he mantenido yo y ahora toda mi familia, los viajes a los congresos, etc,etc. En fin cuanto recurso he necesitado para llegar a donde estoy, ha salido de sus impuestos.

A todos aquellos científicos cuyos hallazgos están formando el entarimado donde se arma la presente tesis. Su trabajo inteligente, creativo y metódico me dio no solo inspiración sino también mucho pero mucho conocimiento.

Amelia, mi amada esposa. Dios o la Fortuna me den mucha vida para seguir siendo feliz a tu lado hasta que nuestro ciclo se cumpla. Te agradezco la enorme fe y paciencia que me has brindado. Asimismo tu aliento forma parte de esta tesis. Sin duda has sido una gran compañera y sin ti mis alcances, no serían como han sido. No creo poder expresar con palabras cuánto te amo, pero toma esta tesis como un signo contundente de mi cariño.

Giselle mi primogénita, mi bendición diaria. Algún día llegarás a culminar un gran esfuerzo académico como yo lo estoy haciendo ahora. No lo dudo ni un segundo, me lo grita tu tierna vitalidad. Quiero que sepas ahora, cuánto me ayudaste en aquellos momentos con tu niñez salpicante, con tu espontánea y revivificante forma de expresar lo mucho que me amabas y me necesitabas. Tanta felicidad me diste sin saberlo. Así pues no podía hacer otra cosa que seguir con brío mi propias metas. Además quiero que sepas, que tu "papito" seguirá luchando para que te sientas genuinamente orgulloso de él.

Carlitos, mi carne y alma más emparentada. Desconozco que derrotero vayas a seguir en tu vida. Pero se que será uno bueno. Quiero que tomes esta tesis como un ejemplo muy cercano de que nunca se debe uno dar por vencido en la vida. No importa lo duro que parezca la conquista. Por uno mismo sobre todo, pero también por los que te aman e incluso por tus enemigos. Te confieso que me costó mucho trabajo concluir esta tesis, las circunstancias no fueron las que yo hubiera querido. Sin embargo pude más que las adversidades. Tu llegada fue una gran inspiración. Hijo mío léela con cuidado. Es importante para mi que te aproximes a mi mundo intelectual. Comparte mis obsesiones y maravíllate e interésate junto conmigo en este órgano endemoniadamente o divinamente complejo así como uno de sus fenómenos más intrigantes, el sueño.

Mi madre, la Dra. Marta Centurión Acosta. Gracias por tu apoyo constante. Estoy cierto que cada una de mis realizaciones, te hacen sentir especialmente orgullosa. Tú bien sabes que a veces para dar dos pasos hacia adelante; se empieza por tener que dar uno en retroceso. Así he tenido que hacer para llegar a concluir mi Maestría. Sin embargo es dichoso contar contigo en las duras y las maduras. Así hemos estado siempre. También sería grato para mí que leas este trabajo y me dieras

tu opinión. En parte gracias a ti hay en mí una obsesión por integrar el mundo biológico con el psíquico. Esta tesis va en ese camino aún muy largo por recorrer.

Mi director y amigo Rafael J. Salín Pascual Ph. D.,M.D. Aparte del aspecto académico, he aprendido de ti varias cosas nada banales para mi proyección como científico independiente. Tienes varias cualidades raras para nuestro ambiente que es importante que te haga patente. Estas cualidades han hecho que mi trabajo dejara de ser de una angustia y soledad agobiantes. Asimismo gracias a ellas, los fracasos no parecieron ni tan demoleedores ni tan personales sino que me dieron la oportunidad de situarlos en una dimensión mas real. Primero que nada te celebro tu trato tan horizontal, nada autoritario que hizo que a veces me preguntara si no lo estaba valorando suficientemente. Asimismo te reconozco la rarísima virtud en un jefe, de saber escuchar y mas aún corregir actitudes que a veces causaron fricciones entre ambos. Además me admira la forma en que manejas el aspecto monetario de tus proyectos. En ningún momento me reclamaste los altos gastos que hice y que desafortunadamente en algunos casos luego resultaron absolutamente improductivos. Así pues nunca vi tacañería de tu parte sino al contrario, me dejaste manejar mis gastos y utilizar algunos de tus recursos de una manera que me hizo sentir la libertad casi plena así como una confianza desconcertante. Finalmente te reconozco tu cualidad de no olvidarte de dar una o dos palabras de aliento o reconocimiento en el cierre de una evaluación. Créeme que son bienvenidas y en nada demeritan la jefatura como otros creo temen. Mediante esta tesis quiero hacerte evidente mi genuino reconocimiento y aprecio.

A mis abuelos Rosalía y Felipe†. Figuras protagónicas de mi niñez y cuyas cualidades trato de emular como su mejor herencia. No obstante ya no están conmigo en presencia o en consciencia, sus recuerdos forman parte del colectivo que soy yo mismo.

A mi padre, el Dr. Fernando Blanco Carbajal. Quisiera sinceramente que este sencillo trabajo te acompañe en tu soledad y te brinde ratos en que pensar. Espero que no sea el último. Padre aunque sea al final del camino, confío en que podamos compartir al menos inquietudes intelectuales que sirvan para enriquecer nuestras vidas.

A mi suegro, el Sr. Hilario Santana. Quiero reconocerle su apoyo hacia mí y hacia mi familia. Aunque la vida nos reunió a través de su maravillosa hija, nuestras afinidad va mas allá. Quiero que vea en esta tesis, mi compromiso de amor con mi familia y tenga la certeza que nunca dejaré de luchar por su bienestar al igual que Ud. obra diariamente.

Agradezco de manera muy especial a mis sinodales por su aguda crítica al presente manuscrito. Con su experiencia me he enriquecido. Los cito en orden alfabético; Dr. Fructuoso Ayala Guerrero, Dr. Jorge Hernández Rodríguez, Dr. Enrique Hong Chong así como a la muy gentil Dra. Luisa Rocha Arrieta.

Mis compañeros y amigos del laboratorio con quienes comparto diariamente el mismo quehacer profesional. Cito por ejemplo a mi buen amigo Fabio García, a Adalberto Durán quién me enseñó algunos de sus trucos técnicos, a Leti, a Rubén, a

Fernando, a Marcela, a LiMei, a los recién llegados como Luz María, Enrique, Oscar Díaz y Oscar Galicia, Manuel, Erik, Cesar, Lolita. A la Dra. Jimenez-Capdville quien vía internet ha estado apoyándome de varias formas. También tengo presente a mis excompañeros de la Maestría como Eduardo, Rosa María, Lupita y Esther.

Quiero agradecer a Margarita Chavarín que tan amablemente me ayudo con la fotografía. A Tere Torres quién nunca tiene una negativa para ayudarte, a Mari, a la Sra. Mondragón y a todo el equipo de apoyo administrativo, igualmente a la dibujante, al fotógrafo y al Ing. Amado.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Drucker-Colín por tolerarme en su laboratorio. Pese a mis peores temores sigo trabajando, y eso lo tengo en cuenta.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
CAPITULO 1. LA DIÁLISIS INTRACEREBRAL.....	8
CAPITULO 2. EL SUEÑO CON MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS.....	11
<i>Generalidades</i>	11
<i>Regulación "hacia arriba" del sueño MOR</i>	12
CAPITULO 3. LA FORMACIÓN RETICULAR MEDIAL BULBAR: EL NÚCLEO RETICULAR GIGANTOCELULAR	16
<i>Aspecto anatómico</i>	16
<i>Aspecto funcional</i>	19
CAPITULO 4. LA NEUROTRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA	26
<i>Generalidades</i>	27
<i>Serotonina y sueño</i>	32
<i>El modelo de regulación del sueño por interacción recíproca</i>	34
ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROBLEMA	36
<i>Privación de sueño y 5-HT</i>	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
PARTE I. MEDICIÓN DE LA LIBERACIÓN DE 5-HT/5-HIAA Y PRIVACIÓN DE SMOR.....	41
<i>Procedimiento quirúrgico</i>	41
<i>Recuperación post-quirúrgica</i>	41
<i>Procedimiento de PSMOR por el método de la plataforma</i>	42
<i>Procedimiento de microdiálisis</i>	42
<i>Ubicación anatómica de la sonda</i>	43
<i>Procedimiento de análisis cromatográfico</i>	43
PARTE II. MEDICIÓN DE LA LIBERACIÓN DE 5-HIAA CON RELACIÓN A LAS FASES DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA	44
PARTE III. REGISTRO PSG DE ANIMALES CANULADOS (SHAM) DURANTE LA ESTANCIA SOBRE AMBOS TIPOS DE PLATAFORMAS	45
RESULTADOS.....	46
EFECTOS SOBRE LAS FASES DE VIGILANCIA DE LA PERMANENCIA SOBRE LAS DISTINTAS PLATAFORMAS.....	46
EFECTOS DE LA PSMOR SOBRE LA LIBERACIÓN DE SEROTONINA ASI COMO SU PRINCIPAL METABOLITO.....	54
LA EXCRESIÓN DE 5-HIAA DURANTE LAS FASE DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA.....	58
DISCUSIÓN	62
EL DESCENSO DE LA TRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA DURANTE LA PRIVACIÓN DE SUEÑO MOR.....	62
EL AUMENTO DEL RECAMBIO COMO CONSECUENCIA DE LA PRIVACIÓN DE SUEÑO MOR.....	70
EL DESCENSO DE LA TRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA DURANTE EL REBOTE DE SUEÑO MOR.....	74
EL FACTOR DEL ESTRÉS CAUSADO POR LA PLATAFORMA DE PRIVACIÓN DE SUEÑO MOR	76
EXPERIMENTOS A FUTURO	79
CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS.....	81

RESUMEN

El sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR) constituye una fase bien diferenciada del fenómeno del dormir. Este tipo de sueño está regulado como muchas otras funciones biológicas de forma homeostática; de manera que si por alguna causa se ve decrementado, más adelante se compensará esta pérdida. Dar alguna pista sobre cómo se lleva a cabo tal regulación, es el principal objetivo del presente estudio. En particular se propuso estudiar fundamentalmente el papel de la liberación serotoninérgica en esta respuesta compensatoria. Lo anterior se hizo en la región medial bulbar que está involucrada en el control muscular durante el sueño MOR. Para tal efecto se microdializó en esta región a ratas de laboratorio durante tres momentos: antes, durante y después de 96 h de privación de sueño MOR. La concentración de la serotonina así como su principal metabolito (5-HIAA) fueron determinados mediante HPLC-ECD. Los resultados mostraron que durante la privación, se reduce muy significativamente la liberación de serotonina (> 1000%) así como también en menor grado la excreción del metabolito (32%). Durante el sueño compensatorio, la liberación sigue importantemente disminuida pero la excreción por el contrario, se vio muy incrementada (73%). Así mismo en otro grupo de ratas sin manipulación del sueño MOR, se estudió esta dinámica durante cada una de las fases del ciclo sueño-vigilia y se observó que la liberación de 5-HIAA es máxima durante la vigilia (100%) menor durante el sueño NMOR (76%) y mínima durante el sueño MOR (48%). Por otro lado se observó que la concentración de ambas indolaminas en los microdializados es fuertemente dependiente de la presencia de calcio en el líquido extracelular. Esta se reduce en 70% para el caso de la serotonina y sólo un 35% para el 5-HIAA.

De modo que los resultados principales de este estudio permiten asociar una importante reducción en la liberación de serotonina en la región medial bulbar, con la compensación homeostática surgida a partir de la pérdida de sueño MOR. Esto en principio apoya la idea de que la transmisión serotoninérgica en este sitio, también pudiera estar inhibiendo tónicamente a aquellas células relacionadas con el control motor durante el sueño MOR. Sin embargo se requiere de mas evidencias al respecto.

ABSTRACT

REM sleep as other physiological functions has a homeostatic regulation; in that way that whatever cause a curtailment on it later it will be replaced. Besides it already knows that Gigantocellular Reticular Nucleus is a main part of REM sleep regulation. On the other hand serotonin has been involved as a natural endogenous permissive substance on REM sleep expression. So it is likely that serotonin changes become a part of the homeostatic process of REM sleep. In that sense the present study sought for serotonin release changes as a consequence of REM sleep deprivation. Using microdialysis coupled with HPLC-ECD it was measured 5-HT and 5-HIAA the extracellular concentration in the gigantocellular reticular nucleus of freely behaving rats during two different moments: a) last privation hours and b) sleep recovery. The main findings were: 5-HT release and 5-HIAA excretion were significantly decreased by REM sleep deprivation. 5-HT decrement was maintained during sleep recovery but it was not so for 5-HIAA excretion. It was concluded that reduction of serotonin release in the gigantocellular reticular nucleus during deprivation and sleep recovery would be seen as a homeostatic response for facilitate REM sleep triggering mechanisms.

INTRODUCCIÓN

La presente introducción esta dividida en cuatro partes. La primera de ellas aborda el aspecto teórico subyacente de la técnica de la microdiálisis mientras que las otra tres divisiones cubren los aspectos principales que están detrás de cada uno de los ejes principales del problema a investigar. Estos ejes son; el sueño de movimientos oculares rápidos así como su regulación, la formación reticular medial bulbar en su relación con la regulación con el sueño MOR y finalmente la neurotransmisión serotoninérgica en el contexto de la regulación del sueño. Es la pretensión de esta introducción dejar claramente planteado la relación conceptual entre estos apartados. Finalmente en el epílogo de la cuarta parte se hace una relación mas o menos detallada de los trabajos que son antecedentes directos de este problema.

CAPITULO 1. LA DIÁLISIS INTRACEREBRAL

Es fundamental para la presente tesis primero dejar establecido el porqué se escogió a la técnica de la microdiálisis de entre otras hoy disponibles, como la herramienta técnica más idónea para obtener la información que reclama el problema. Asimismo se hablará en detalle de sus principios, sus alcances así como sus limitaciones.

La microdiálisis (MD) es una técnica relativamente nueva dentro del campo del estudio del Sistema Nervioso Central (SNC). Sin embargo no por ello es utilizada en forma restringida. Por el contrario se puede hablar de que la década de los 90's, ha visto una explosión en su aplicación¹⁵³. Incluso no se vislumbra que en el futuro próximo deje de crecer el interés en su utilización por parte de la comunidad científica. Una de las razones que explica esto es que hasta antes de la MD, no existía un método sencillo, así como tan poco invasivo para estudiar la dinámica de liberación de los compuestos biológicamente activos solubles del medio extracelular.

La MD además de ser relativamente menos invasiva, tiene una resolución temporal lo suficientemente buena (del orden de pocos minutos si así se desea), que posibilita el estudio de muchas de la conducta. Esto es de interés clave para el estudio de la fisiología de las conductas, entre ellas el sueño. Existen ejemplos en la historia de la investigación de este campo donde la restricción impuesta sobre la conducta espontánea por necesidades técnicas, ha dado lugar a conclusiones inexactas ¹⁷⁰.

No obstante hay que reconocer que esta técnica también tiene sus limitaciones. Por ejemplo la resolución temporal de la MD deja fuera a fenómenos que ocurren en el lapso de segundos. Asimismo la sonda de MD es un instrumento muy tosco para estudiar lo que sucede a nivel unicelular. De hecho por los principios mismos de la diálisis (ver adelante) existe un límite inferior de tamaño al que las sondas ya no se podrán miniaturizar más. Así pues con la MD jamas se podrá llegar a este grado de resolución temporal o espacial.

INTRODUCCIÓN

La presente introducción esta dividida en cuatro partes. La primera de ellas aborda el aspecto teórico subyacente de la técnica de la microdiálisis mientras que las otra tres divisiones cubren los aspectos principales que están detrás de cada uno de los ejes principales del problema a investigar. Estos ejes son; el sueño de movimientos oculares rápidos así como su regulación, la formación reticular medial bulbar en su relación con la regulación con el sueño MOR y finalmente la neurotransmisión serotoninérgica en el contexto de la regulación del sueño. Es la pretensión de esta introducción dejar claramente planteado la relación conceptual entre estos apartados. Finalmente en el epílogo de la cuarta parte se hace una relación mas o menos detallada de los trabajos que son antecedentes directos de este problema.

CAPITULO 1. LA DIÁLISIS INTRACEREBRAL

Es fundamental para la presente tesis primero dejar establecido el porqué se escogió a la técnica de la microdiálisis de entre otras hoy disponibles, como la herramienta técnica más idónea para obtener la información que reclama el problema. Asimismo se hablará en detalle de sus principios, sus alcances así como sus limitaciones.

La microdiálisis (MD) es una técnica relativamente nueva dentro del campo del estudio del Sistema Nervioso Central (SNC). Sin embargo no por ello es utilizada en forma restringida. Por el contrario se puede hablar de que la década de los 90's, ha visto una explosión en su aplicación¹⁵³. Incluso no se vislumbra que en el futuro próximo deje de crecer el interés en su utilización por parte de la comunidad científica. Una de las razones que explica esto es que hasta antes de la MD, no existía un método sencillo, así como tan poco invasivo para estudiar la dinámica de liberación de los compuestos biológicamente activos solubles del medio extracelular.

La MD además de ser relativamente menos invasiva, tiene una resolución temporal lo suficientemente buena (del orden de pocos minutos si así se desea), que posibilita el estudio de muchas de la conducta. Esto es de interés clave para el estudio de la fisiología de las conductas, entre ellas el sueño. Existen ejemplos en la historia de la investigación de este campo donde la restricción impuesta sobre la conducta espontánea por necesidades técnicas, ha dado lugar a conclusiones inexactas ¹⁷⁰.

No obstante hay que reconocer que esta técnica también tiene sus limitaciones. Por ejemplo la resolución temporal de la MD deja fuera a fenómenos que ocurren en el lapso de segundos. Asimismo la sonda de MD es un instrumento muy tosco para estudiar lo que sucede a nivel unicelular. De hecho por los principios mismos de la diálisis (ver adelante) existe un límite inferior de tamaño al que las sondas ya no se podrán miniaturizar más. Así pues con la MD jamas se podrá llegar a este grado de resolución temporal o espacial.

Estas limitaciones se han visto salvadas recientemente en algunos casos con la técnica de voltametría. La voltametría sin embargo no se ha popularizado tanto como la MD, porque hasta ahora sólo se puede aplicar a compuestos fácilmente oxidables como las monoaminas. Incluso en este caso se mide preferentemente a los metabolitos (5-HIAA, DOPAC, HVA) no tanto a los neurotransmisores en sí. Es así que frecuentemente se infiere lo que está sucediendo con la liberación de estos compuestos a partir del nivel de excreción de sus catabolitos²⁷. Esto no necesariamente tiene que ir en paralelo^{212, 31}. Así pues mientras no sea indispensable llegar a nivel unicelular o bien estudiar lo que sucede en el orden de segundos, la MD seguirá siendo una mejor opción. En particular esto se aplica perfectamente al presente problema ya que el fenómeno del sueño se desarrolla en el orden de los minutos así como es regulado por grupos de cientos de neuronas.

Al respecto la MD se aplica a regiones cerebrales de unos cuantos mm² (de hecho se debiera llamar milidiálisis). Esto la hace aplicable a casi cualquier núcleo del cerebro de la rata como lo es, al área de estudio de la presente tesis. Incluso con estas reducidas dimensiones es posible estudiar varias regiones de una vez²⁰⁹.

Asimismo la MD permite además la aplicación y/o recuperación de drogas. Ventaja que la voltametría por si misma no tiene. Sobra decir la importancia del uso de los agentes farmacológicos en el estudio de la fisiología nerviosa. Adicionalmente por la características únicas de la MD, la infusión de drogas puede ser reversible, lo cual es muy ventajoso para evaluar la temporalidad de los efectos. Ahora bien ¿qué es la MD?

En la MD, se introduce una sonda (generalmente concéntrica) cuya parte activa es una membrana semipermeable de unos pocos milímetros de longitud y varios cientos de micras de diámetro. Esta membrana generalmente polimérica permite el libre tránsito de sustancias de bajo peso molecular (<1000 UMA) dejando atrás a moléculas más grandes como las proteínas. Esta exclusión de grandes moléculas tiene varias ventajas entre ellas, facilita la inyección directa de las muestras en el cromatógrafo sin necesidad de purificación previa. Ahora ¿cómo funciona la MD?

La diálisis se basa en el principio de la difusión simple de solutos que siguen un gradiente de concentración¹⁹². Desde el punto de vista termodinámico la difusión es una fuerza que opera para disminuir la entropía de un sistema de fase líquida o gaseosa que se ha salido del equilibrio. Esta mayor entropía se genera en un principio al crear un compartimento donde exista una concentración menor (cerca a cero para la MD) de una determinada sustancia. Sin embargo la esencia de la MD no radica en sí en la creación de un gradiente, sino que además este desequilibrio se mantiene gracias a la continua extracción de las sustancias difusibles mediante un flujo unidireccional (pocos $\mu\text{L}/\text{min.}$). Este flujo sólo se lleva a cabo dentro del compartimento de diálisis. Así el proceso de difusión nunca se detiene porque la entropía nunca se deja llegar a cero, es decir, los dos compartimentos (extracelular y dentro de la sonda de MD) nunca están en equilibrio durante la diálisis. Esto se aprovecha para extraer de forma absolutamente continua solutos de interés.

Sin duda el factor más importante que gobierna la difusión es la magnitud del delta del gradiente. Haciendo más lenta la velocidad de flujo hacemos que la magnitud de este delta decrezca (recuperación absoluta) pero al mismo tiempo damos más

tiempo para la difusión (recuperación relativa) y así obtenemos mas concentración pero menos cantidad. Aumentando la velocidad de flujo se opera al revés.

Además hay otros factores como la temperatura y la superficie de intercambio entre los compartimentos, que también influyen el proceso de difusión, al menos teóricamente. Se sabe que a mayor temperatura, mayor difusión. Sin embargo se puede asumir que este es un factor constante por darse la difusión dentro del cerebro íntegro, donde impera una termoregulación muy precisa. Igualmente a mayor superficie, también mayor recuperación. Es por esta causa que la sonda de MD no puede minuitarizarse infinitamente ya que llegaría un momento en que se recuperaría tan poco que ni el más potente método de detección podría servir. Sin embargo una vez que se determina que tamaño de membrana de diálisis que se va utilizar, este factor se vuelve igualmente una constante.

Por otro lado ya que la difusión nunca se deja que llegue al equilibrio, la recuperación de sustancias es siempre **parcial**. La recuperación total sólo se obtendría a velocidad de flujo cero. A esta velocidad es obvio que ya no habría colecta tampoco. Así pues con la MD jamás se sabrá cuál es el valor real de la concentración de las sustancias de interés en el medio extracelular. Para tratar de solventar algo de este problema intrínseco existen métodos tanto empíricos (ensayo *in vitro*) como matemáticos. Sin embargo estos siempre serán aproximaciones al valor real de la concentración. De hecho es fundamental que se entienda que el objetivo principal de la MD **no es saber cuál es este valor real**, sino mas bien **saber cómo va variando la recuperación de las sustancias en función del tiempo (o cualquier variable derivada de este)**. Así si no se modifica el gradiente de concentración, es decir, no se varía la velocidad de flujo ni tampoco se modifica las variables antes mencionadas a lo largo de la diálisis, se puede asumir perfectamente que cuando se recupera mas o menos de X sustancia, es porque hubo cambios en el mismo sentido en el compartimiento extracelular. Además el hecho de que en la MD sólo se pueda recuperar una pequeña porción (nunca por arriba del 20%) de las sustancias solubles en el medio extracelular, mas que ser una desventaja, es fisiológicamente ventajoso. Esto permite conservar mejor el ambiente prevaleciente.

Ahora bien se puede uno interrogar ¿la recuperación de sustancias obtenidas con MD es siempre constante, en el sentido técnico ? El supuesto anterior sólo se puede mantener invariable mientras no haya cambios en el tiempo de la propiedades de permeabilidad de la membrana, o bien no existan tampoco cambios que modifiquen las propiedades de difusión de las sustancias en el medio extracelular. Infortunadamente difícilmente se puede concebir que el compartimiento extracelular es un sistema inerte que no va a reaccionar ante la presencia de un cuerpo extraño como lo es la sonda de MD. Así pues estas propiedades también van a variar en sentido positivo cuando por ejemplo se obtengan más recuperación inmediatamente después de la ruptura de la integridad de las células debido a la introducción de la sonda. Por el contrario van a variar en sentido negativo conforme el proceso de cicatrización avance^{11,152} (ver más adelante método). De este modo la MD no es una técnica que nos permite obtener información de manera **permanente**. Tiene una ventana de mayor confiabilidad por fuera de la cual no es posible obtener datos que se puedan calificar como representativos de fisiología normal de la liberación sináptica.

Otro factor muy relevante a considerar para obtener datos fisiológicos utilizando la MD, es la conservación la constancia iónica y osmolar del tejido nervioso. Así es necesario cuidar además que el fluido de diálisis tenga una composición iónica lo mas similar al ambiente natural, sobretodo en lo referente a iones clave para el mantenimiento del potencial de membrana como el potasio o para la liberación sináptica como el calcio¹⁹². Esto es así porque la membrana es igualmente permeable a los iones. De modo que cualquier cambio iónico que sea introducido por el fluido de diálisis puede desbalancear el medio extracelular y por tanto las propiedades de excitabilidad y/o secreción de las neuronas.

Por último hay que mencionar que sabiendo que el principio de la difusión simple fuera del equilibrio constituye la base teórica de la MD, se puede fácilmente entender que está es solo un medio de recuperación (y/o infusión) de sustancias de bajo peso molecular al medio extracelular. Es pues sólo un método de **muestreo** como pudiera ser una muestra de sangre o de líquido cefalo-raquídeo. Así se obtiene en los dializados una mezcla de muchas sustancias desconocidas que estaban presentes en el líquido extracelular. Esto implica que posteriormente se requiera de métodos analíticos para separar, identificar y cuantificar a las sustancias obtenidas por MD. Estos métodos de hecho son los que van a determinar que sustancias se van a estudiar y que otras no. Los métodos analíticos más utilizados con muestras de MD son la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) adicionada con sus diferentes tipos de detectores (electroquímico, ultravioleta, fluorométrico) y el radioinmunoensayo (RIA) para el caso de oligopéptidos. Con la ayuda de estos métodos se pueden estudiar prácticamente todos los neurotransmisores, moduladores u hormonas conocidas hasta ahora y por supuesto la MD deja lugar para el aislamiento de nuevas sustancias.

Una vez vistos las principales características de la técnica de MD, se procederá a revisar las características del fenómeno cerebral que se va a estudiar con esta técnica.

CAPITULO 2. EL SUEÑO CON MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS

Generalidades

El sueño con movimientos oculares rápidos (SMOR) fue descrito por vez primera cuando se registraron los músculos orbitales en humanos. En estos se observó que la actividad oculomotora rápida se presenta de forma discontinua dentro de periodos de desincronización de la actividad eléctrica cortical mientras el sujeto duerme³. Asimismo se sabe que otros músculos como los de las extremidades o los faciales, tiene igualmente periodos de actividad fásica durante el SMOR. Sin embargo la mayor parte del tiempo existe una profunda inhibición de la totalidad de la musculatura antigravitatoria conocida como atonía del SMOR. Estas características no sólo se dan en el SMOR del humano sino también en casi todas las otras especies que lo presentan. Por ejemplo el SMOR también fue descrito en el gato⁴³ y en la rata⁸⁷ pocos años después que en el humano. Además en estas dos especies, el registro eléctrico de estructuras límbicas como el hipocampo o la corteza del cíngulo durante el SMOR, indica que existe una actividad tipo teta hipsincrónica^{151,155} (4-8Hz). Este tipo de

Otro factor muy relevante a considerar para obtener datos fisiológicos utilizando la MD, es la conservación la constancia iónica y osmolar del tejido nervioso. Así es necesario cuidar además que el fluido de diálisis tenga una composición iónica lo mas similar al ambiente natural, sobretodo en lo referente a iones clave para el mantenimiento del potencial de membrana como el potasio o para la liberación sináptica como el calcio¹⁹². Esto es así porque la membrana es igualmente permeable a los iones. De modo que cualquier cambio iónico que sea introducido por el fluido de diálisis puede desbalancear el medio extracelular y por tanto las propiedades de excitabilidad y/o secreción de las neuronas.

Por último hay que mencionar que sabiendo que el principio de la difusión simple fuera del equilibrio constituye la base teórica de la MD, se puede fácilmente entender que está es solo un medio de recuperación (y/o infusión) de sustancias de bajo peso molecular al medio extracelular. Es pues sólo un método de **muestreo** como pudiera ser una muestra de sangre o de líquido cefalo-raquídeo. Así se obtiene en los dializados una mezcla de muchas sustancias desconocidas que estaban presentes en el líquido extracelular. Esto implica que posteriormente se requiera de métodos analíticos para separar, identificar y cuantificar a las sustancias obtenidas por MD. Estos métodos de hecho son los que van a determinar que sustancias se van a estudiar y que otras no. Los métodos analíticos más utilizados con muestras de MD son la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) adicionada con sus diferentes tipos de detectores (electroquímico, ultravioleta, fluorométrico) y el radioinmunoensayo (RIA) para el caso de oligopéptidos. Con la ayuda de estos métodos se pueden estudiar prácticamente todos los neurotransmisores, moduladores u hormonas conocidas hasta ahora y por supuesto la MD deja lugar para el aislamiento de nuevas sustancias.

Una vez vistos las principales características de la técnica de MD, se procederá a revisar las características del fenómeno cerebral que se va a estudiar con esta técnica.

CAPITULO 2. EL SUEÑO CON MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS

Generalidades

El sueño con movimientos oculares rápidos (SMOR) fue descrito por vez primera cuando se registraron los músculos orbitales en humanos. En estos se observó que la actividad oculomotora rápida se presenta de forma discontinua dentro de periodos de desincronización de la actividad eléctrica cortical mientras el sujeto duerme³. Asimismo se sabe que otros músculos como los de las extremidades o los faciales, tiene igualmente periodos de actividad fásica durante el SMOR. Sin embargo la mayor parte del tiempo existe una profunda inhibición de la totalidad de la musculatura antigravitatoria conocida como atonía del SMOR. Estas características no sólo se dan en el SMOR del humano sino también en casi todas las otras especies que lo presentan. Por ejemplo el SMOR también fue descrito en el gato⁴³ y en la rata⁸⁷ pocos años después que en el humano. Además en estas dos especies, el registro eléctrico de estructuras límbicas como el hipocampo o la corteza del cíngulo durante el SMOR, indica que existe una actividad tipo teta hipersincrónica^{151,155} (4-8Hz). Este tipo de

actividad eléctrica poblacional también se observa cuando el animal camina o explora, de modo que no es exclusiva del SMOR.

Por otro lado el SMOR no sólo es el momento de mayor inhibición motora de todos los estados de vigilancia, sino también es la fase de mayor umbral al despertar. Esto lo han demostrado tanto con la aplicación de estímulos externos como también por la estimulación de estructuras subcorticales importantísimas para el alertamiento como lo es la formación reticular mesencefálica^{151,155}. Una vez que la fase del SMOR acaba, el umbral de alerta vuelve súbitamente al nivel basal de reactividad. Esto quizá explique el porqué se ha observado que después del SMOR ocurra muy frecuentemente un despertar al menos breve¹⁸⁸. Así parece que el SMOR es el umbral preferencial de salida del sueño.

Otra característica importante del SMOR es la presencia de ondas PGO's (ponto-geniculo-occipitales). Estas se registran en ratas⁸³ pero sobretodo en gatos¹²¹. Las PGO's son heraldos del SMOR pero también concurren básicamente con él de manera que se han involucrado tanto en el inicio como en el mantenimiento de este tipo de sueño.

Asimismo se ha visto que la actividad onírica se asocia frecuentemente a los episodios de SMOR⁴². Incluso Roffwarg y cols (1962) encontraron una relación entre los movimientos oculares rápidos de esta fase y la imágenes de las ensoñaciones, postulando que estos movimientos se deben al seguimiento que hacen los ojos de los durmientes de esta actividad mental. Sin embargo otros autores¹²⁸ no han encontrado tal relación. Bajo estas nuevas circunstancias se propone⁵⁷ en cambio que los MOR's reflejan mas bien un grado alto de nivel de reactividad dentro del sueño y que no están inhibidos durante este como ocurre con la musculatura antigravitatoria, porque su actividad no va a interferir con la continuidad de este tipo de sueño. Aún más también se ha puesto en duda la equivalencia del sueño MOR con la actividad onírica. Así se ha encontrado que la actividad onírica también ocurre durante el sueño NMOR⁶³. Esto ha hecho que el estudio del SMOR pierda algo del encanto psicológico que en principio se le atribuyó. Sin embargo el hecho de que la actividad onírica no ocurra exclusivamente durante el SMOR no descarta que este tipo de actividad cerebral sea de los lugares preferidos para que habiten "los duendes de los sueños". Fenómeno que por supuesto estamos lejos de entender.

Una vez mencionados algunos aspectos generales del SMOR, ahora es pertinente hablar acerca de su regulación homeostática.

Regulación "hacia arriba" del sueño MOR

Fue William Dement⁴¹ en 1960, el primero que se le ocurrió eliminar esta fase del sueño y ver que sucedía después. ¿Porqué quizo hacer esto? Anteriormente este mismo autor había descubierto que durante esta fase del sueño ocurren las ensoñaciones⁴² así como que este tipo de sueño aparece regularmente noche tras noche no obstante el sujeto recuerde o no haber tenido sueños. De manera que se le ocurrió que los ensueños son cuantitativamente mas frecuentes de lo que se había creído por lo cual sería interesante probar ¿qué sucedería si se eliminasen? De esta

forma sin proponérselo descubrió el rebote de sueño MOR o sueño compensatorio. Este sueño compensatorio es la expresión más evidente de la regulación hacia arriba del SMOR.

Dement reporta que la privación selectiva de sueño MOR da lugar a dos fenómenos. El primero es un incremento progresivo en el número de entradas a este tipo de sueño durante la privación y en segundo lugar durante el periodo posterior al que denominó recuperación, ocurre una compensación de la pérdida de este tipo de sueño, el rebote. La primera característica sería la manifestación clara de que el sistema de regulación homeostática detecta la pérdida oponiéndose cada vez con más resistencia a un déficit todavía mayor. La segunda representa por así decirlo el pago de la deuda de sueño anterior mas la que se generó durante ese día. Desde el punto de vista cuantitativo Dement observó que una pérdida entre el 65-75% del tiempo total de SMOR da lugar a un aumento compensatorio del 50% en promedio durante la primera noche. Sin embargo este fenómeno de compensación tiene lugar también en noches posteriores aunque con menor intensidad. Esto indica además que la pérdida de sueño MOR no se puede compensar de forma abrupta sino gradual. Asimismo reporta que estos efectos no se presentan en los controles de sujetos que fueron despertados el mismo número de veces pero durante el sueño NMOR indicando que el rebote de sueño MOR no es un fenómeno asociado al aumento de la vigilia sino que se origina por el déficit intrínseco de SMOR. Además notó otros cambios en los sujetos durante el periodo de privación como ansiedad, irritabilidad, dificultad de concentración y aumento del apetito; que en algunos casos menciona como severos. Todas estas alteraciones desaparecieron cuando se les permitió dormir libremente así mismo no se dieron en el periodo de irrupción del sueño NMOR. De esto concluye que el sueño "con ensueños" es una necesidad biológica para el funcionamiento correcto del cerebro durante el día de manera que no puede ser eliminado sin tener consecuencias. Posteriormente abundó más en estas investigaciones y estableció que la cantidad de sueño MOR que aumenta durante la recuperación es casi proporcional a la cantidad de sueño perdido durante la privación. Digo casi porque nunca se recupera el 100% de lo perdido. Esto implica que el aparato que regula homeostáticamente la cantidad de sueño es capaz de llevar un registro acumulativo del déficit de sueño que servirá para dar pie a una compensación adecuada (modelo de la deuda-pago).

Estas mismas características se han comprobado con la privación selectiva del sueño MOR en la rata y otras especies. Por ejemplo Van Luitelaar y Coenen (1986) privaron a ratas de sueño MOR durante 72 h. Ellos encontraron además que durante la privación se conserva aún el ritmo circádico del sueño MOR en la poca cantidad que aún se observa (0-3% vs 9% basal). Asimismo observaron que la recuperación es más intensa durante las primeras horas de sueño y va decayendo conforme pasan las horas y días posteriores. El nivel basal se alcanza a las 48 h después de finalizada la privación demostrando que no se compensa tampoco en este animal todo el déficit de sueño MOR. Asimismo el mecanismo de compensación implicado mas comúnmente es el incremento en la frecuencia de aparición pero también se vale de producir una mayor duración de los episodios individuales. Estos datos sugieren varias características de la regulación homeostática del sueño MOR. Primero un comportamiento exponencial decreciente en la recuperación. Segundo el hecho de que haya más episodios de sueño MOR en un lapso fijo de tiempo durante la recuperación, indica que los mecanismos de compensación se echaron a andar desde los primeros

momentos en que empezó la privación. Finalmente como no se recupera todo el sueño MOR que se perdió pudiera ser que por un lado haya otras formas de compensar el SMOR o bien que el "setpoint" del sueño MOR no esté fijamente determinado dentro de un intervalo estrecho.

La privación selectiva de sueño MOR es sin embargo una maniobra experimental que no ocurre naturalmente en la vida del individuo. Así pues puede surgir la duda de que si esto es un fenómeno fisiológico o un artefacto. ¿Ocurre rebote de sueño MOR después de que el individuo se ve en la necesidad de no dormir en lo absoluto? En efecto, también se compensa en estas circunstancias. Incluso en la rata⁵², el rebote de sueño MOR ocurre con mas intensidad que el rebote de sueño de ondas lentas. Así se sin duda puede afirmar que naturalmente existe un mecanismo de compensación natural que se echa a andar cuando se crea una deuda de sueño MOR ¿Cómo fucionaría este mecanismo homeostático?

Borbely señala¹⁷ en su modelo del "doble proceso" que durante la vigilia ya sea normal o mas aún en la prolongada, se acumula un factor al que denomina "S" (Sleep). Este llegado a cierto umbral, favorece el inicio del sueño en conjunción con otro factor dependiente del ciclo circádico. Durante el sueño, el factor S es degradado y se posibilita el despertar para reiniciar de nuevo el ciclo. Este factor S sería pues la expresión biológica del déficit acumulado que regularía luego una compensación adecuada mientras se degrada. Porkka-Heiskanen y cols (1997) proponen a la adenosina como el factor que se va a acumular durante la vigilia y que va a desencadenar el sueño posterior. Sin embargo los experimentos^{147,9} han mostrado que la estimulación adenosinérgica mas bien favorece sueño de ondas lentas no el SMOR. Así pues ¿qué factor o factores regularían el componente homeostático del SMOR?. Todavía no se sabe bien. Michelle Jouvet (1984) propone que se trata de un factor peptidérgico de origen hipotalámico que probablemente se sintetice a expensas de la serotonina. Este factor se sintetizaría durante la vigilia y se destruiría durante el sueño MOR normal o compensatorio. Este aspecto se revisará mas adelante al hablar de la serotonina y el sueño.

Autores como Benington y cols (1994) aportan evidencias de que el factor S para el sueño MOR se acumula sólo durante el sueño NMOR y no así en la vigilia. Para probar estos privaron selectivamente a ratas de sueño MOR durante 2 h pero sin aumentar la vigilia. Esto ocurrió durante el periodo natural de reposo de estos roedores. Observaron que aumentaba progresivamente el intento de los animales para dormir en este tipo de sueño a lo largo del periodo de privación selectiva. Además observaron que la potencia de las ondas lentas durante el sueño NMOR va disminuyendo conforme transcurre la privación selectiva. El control en este caso fue la interrupción durante los periodos de SNMOR. Una vez terminada la privación se presentó el rebote compensatorio en las 2 h posteriores. El mayor número de intentos de entrada al sueño MOR durante la privación así como un rebote compensatorio posterior son las dos características primordiales que hablan de que el proceso de regulación homeostática esta operando. Si el factor S se hubiera estado acumulando durante la vigilia previa no se podría explicar porqué aumentan los intentos de entrada del sueño MOR durante esta privación super selectiva y breve. Lo esperado es que mantengan el nivel preprivación ya que no hay casi aumento de vigilia privacional.

Infelizmente las cosas no son tan simples como este experimento sugiere. Así el modelo de acumulación del factor S durante el sueño NMOR no puede explicar los efectos de la privación total de sueño. Si una mayor expresión de sueño MOR esta dada únicamente por la acumulación de un factor facilitador durante el sueño NMOR, entonces después de la privación total de sueño no debiera haber rebote de sueño MOR ya que no hay lógicamente la posibilidad de acumular este factor. En todo caso lo que se debería observar es primero un rebote de sueño NMOR y como consecuencia de este, un rebote de sueño MOR subsidiario. Sin embargo y particularmente en el caso de la rata, el rebote de SNMOR es escasísimo al principio, de manera que no justifica el vigoroso rebote de SMOR que le sucede.

En conclusión no parece correcto afirmar que el factor homeostático del sueño MOR se acumule únicamente durante el sueño NMOR sino que también se origina durante la vigilia. En otras palabras el apetito de sueño MOR se va construyendo en cualquier momento del día o de la noche. Asimismo la saciedad de este apetito facilita la actividad cortical de ondas lentas subsecuente que se identifica con el sueño NMOR en primera instancia pero que también está presente durante la vigilia.

Por otro lado la regulación homeostática del sueño MOR también debe implicar que se module a este estado cuando ocurre en exceso ¿pasa esto efectivamente? Parece que si aunque esta parte no se ha abordado tanto como la privación de sueño. Se conoce la existencia de factores que pueden hacer que el sueño MOR aumente, entre estos el estrés por inmovilización o el aprendizaje. Por ejemplo Rampin y cols. (1991) demostraron que 2 h de restricción de movimientos en la rata durante las primeras horas del periodo oscuro inducen durante las 10 horas subsecuentes un importante rebote de sueño MOR (92%). Sin embargo si se repite esta maniobra durante los siguientes 4 días este efecto se va atenuando gradualmente de modo que al tercero ya no es significativo. Este fenómeno de habituación implica que existen procesos regulatorios que frenan una sobreexpresión continua del SMOR.

Ahora bien una vez revisado en lo general algunos aspectos de la regulación homeostática del sueño MOR, puede uno preguntarse ¿en dónde se lleva a cabo la regulación del sueño MOR?

En breve se puede decir que una de las regiones claves para la generación de este tipo de sueño es el tegmento mesopontino dorsolateral. Principalmente un complejo de núcleos que incluye al núcleo pedúnculo pontino (PPT) así como al núcleo laterodorsal (LDT). Esta conclusión emerge tanto de estudios de lesión,^{59,205,206} estimulación^{39,186} así como de actividad unitaria^{48,85}. No obstante también se puede afirmar que la ejecución del fenómeno global del SMOR va mas allá del tegmento mesopontino dorsolateral, en particular abarca también a la formación reticular medial pontina (mPRF) así como la del bulbo raquídeo. Dado que esta última es la región de estudio de la presente tesis, a continuación se revisará ampliamente los estudios que tratan con la formación reticular medial bulbar poniendo especial énfasis en aquellos aspectos que se relacionan con la regulación del sueño MOR.

CAPITULO 3. LA FORMACIÓN RETICULAR MEDIAL BULBAR: EL NÚCLEO RETICULAR GIGANTOCELULAR

Antes de entrar de lleno en la parte funcional se requiere situar a esta estructura en el contexto anatómico del cerebro.

Aspecto anatómico

La región medial bulbar de la formación reticular (FR) forma parte de una región citoarquitectónicamente mas amplia, la Formación Reticular Medial del tallo cerebral. De hecho la división entre la porción pontina y la bulbar es hasta cierto punto arbitraria. Se toma como división entre ambas una referencia absolutamente extrínseca constituida por una línea imaginaria oblicua que inicia ventralmente en el surco limitante y termina dorsalmente a nivel del polo caudal del núcleo del VI par craneal. Sin embargo entre ambas regiones reticulares existe bastante similitud tanto citoarquitectónicamente (véase por ejemplo la denominación global de FTG de Berman. 1968¹⁴) como en relación a su conectividad¹⁶⁷.

La FR se caracteriza en su parte medial por la presencia irregular de grandes somas neuronales (gigantocélulas o magnocélulas) sobre un fondo de células medianas o pequeñas. El grado de compactación de estos somas no es mucho ya que hay una profuso neuropilo entre ellos (retículo). Mas lateral así como dorsalmente, los somas predominantes son más pequeños (parvocélulas). La reunión de la parte gigantocelular medial con la parvocelular dorsolateral conformarían a la Formación Reticular del Tallo Cerebral. A nivel bulbar, la FR medial está conformada por dos estructuras cuyo límite es algo difuso, el núcleo Paramediano caudalmente y el núcleo Reticular Gigantocelular en sentido rostral. Para la abreviatura anatómica de este último núcleo no hay acuerdo ya que Paxinos y Watson (rata) lo abrevian como Gi pero según Snider y Niemer (gato) o también Olsewsky y Baxter (humano) lo abrevian como NGC. Prefiero utilizar esta última denominación debido a que la mayoría de los trabajos que consulte así la refieren. El NGC es claramente el núcleo principal de la FR medial bulbar ya que ocupa 4/5 partes de su extensión. Por este hecho de aquí en adelante se debe entender que cuando se hable del NGC, casi se hace homología con la FR medial bulbar.

A nivel del puente, la FR medial está compuesta por el núcleo *pontis caudalis* (PnC) y el *pontis oralis* (PnO). Como se había dicho la división entre el NGC y el PnC es difícil de precisar sólo viendo su aspecto citoarquitectónico general. Sin embargo ya a nivel de PnO ya no se observan gigantocélulas de manera que si se nota la diferencia entre NGC y PnO.

La frontera lateral del NGC, la parte parvocelular, la conforma el núcleo Reticular Parvocelular a nivel de bulbo y el primer tercio de la porción pontina así como luego mas rostralmente está la región *subcoerulea*. Ventralmente su límite lo conforman el tracto corticoespinal, la oliva inferior (bulbo) y la oliva superior (puente).

La FR medial es una estructura fundamentalmente bilateral al estar hemidividida por un septo compuesto ventralmente por los **núcleos del rafe bulbares y pontinos** junto con el lemnisco medio así como por el fascículo longitudinal medio dorsalmente. El límite dorsal del NGC a nivel del bulbo está conformado por un conjunto de núcleos entre los que sobresale el prepósito hipogloso y el vestibular medial. A nivel del puente está demarcado por el núcleo del VI par (*abducens*) junto con la rodilla de VII par (facial).

En la rata¹³⁴, el NGC, ha sido subdividido en una porción dorsal (Gi) y una porción ventral. Esta a su vez se subdividió en una *pars* alfa (GiA) y una *pars* ventral (GiV). También en el gato¹⁴ se ha subdividido en una parte dorsal (FTG) y otra ventral (FTM). A la parte ventral en el gato también se le conoce como Núcleo Reticular Magnocelular (NMC) denominación que es más comúnmente utilizada.

Conexiones: Estudios con trazadores.

Más importante que las fronteras del NGC son aquellas estructuras que pueden estar en regiones más distantes del NGC pero que tienen relaciones anatómicas verdaderamente funcionales. Es por ello que se necesita pasar revista a la conectividad del NGC.

El NGC tiene conexiones con buena parte del SNC. Así conecta directamente con regiones del cerebro basal anterior, diencéfalo, mesencéfalo, puente, bulbo y médula espinal. Excepciones son el rinencéfalo, los ganglios basales, el cerebelo y la corteza cerebral.

Para estudiar sus conexiones se han utilizado en general los clásicos trazadores modernos, peroxidasa de rábano-toxina colérica^{61,109}, peroxidasa de rábano combinada con autoradiografía²²³, esta enzima combinada con aglutinina de germen de trigo³³, *Phaseolus vulgaris* combinada con aglutinina^{117,200}, Leucina tritiada²⁰² y microesferas con fluoróforos¹⁶⁶. Con ayuda de estas herramientas se han descrito en detalle las eferencias del NGC. Sus aferencias sin embargo han recibido menos atención.

Sobresimplificando las funciones el NGC lleva información a estructuras que:

- se han involucrado de varias formas en la **regulación del sueño MOR** como son el PPT-LDT, PnO, PnC-*subcoeruleus*, *locus coeruleus* así como a los núcleos del rafe anteriores;
- estructuras que están involucradas directa o indirectamente en el **control motor** como los núcleos motores craneales y espinales, n. *cuneatus*, n. rojo, colículo superior, área prectectal;
- estructuras relacionadas con la **esfera emocional** como el área ventrotemporal, retrorubral, núcleos del rafe mesencefálicos, n. talámicos intralaminares y mediodorsal;
- estructuras vinculadas a la **nocicepción y analgesia** como la parte ventral y ventrolateral de PAG, los núcleos intralaminares;

- estructuras relacionadas al **control autónomo** como la columna intermediolateral, el n. ambiguo, comisural, intercalado, Edinger-Westphal y por supuesto el hipotálamo;
- estructuras relacionadas con el **alertamiento cortical** como el *locus coeruleus*, n. intralaminares, núcleo reticular talámico, zona incierta-campo de Forel entre otros aspectos funcionales.

Aferencias

En la rata⁶¹ se encontró que las aferencias prominentes hacia el NGC vienen desde la sustancia gris de la médula espinal. Recibe conexiones tanto de la parte posterior-sensorial como de la anterior-motora. Así mismo también recibe proyecciones del sistema **rafe bulbar** (rafe magno, pálido y oscuro) así como desde el PnC.

En el gato¹⁰⁹ las principales aferencias hacia el NMC provienen de: 1) la parte lateral del n. de la cama de la estría terminal, el n. de la comisura anterior, el área preóptica, el n. central de la amígdala, el hipotálamo posterior y del campo de Forel; 2) n. de Edinger-Westphal, la formación reticular mesencefálica, la parte ventrolateral de sustancia gris central; 3) los núcleos LC-alfa, periLC-alfa, *subcoeruleus*, PnO así como al ya señalado PnC; 4) también menciona a los núcleos bulbares del rafe y 5) el n. reticular ventral de la médula.

Por otro lado existe una proyección difusa del PPT hacia regiones reticulares mediales bulbares¹⁵⁷. Los autores sugieren que al menos el 20 % de las neuronas colinérgicas del PPT inervan a la FR medial bulbar. También hay una vía no colinérgica que proviene del PPT/LDT hacia esta región.

Debido al interés del presente proyecto es necesario detallar un poco la inervación serotoninérgica. Por lo que respecta al NGC se observó que la densidad de la inervación serotoninérgica va de escasa a nivel dorsal hasta alta en GiV ^{35,60,178}. La inervación sobre la parte lateral parvocelular es también muy considerable. Además se han visto aferencias serotoninérgicas que provienen del rafe dorsal²²⁶. Al respecto se observó que de la parte ventrolateral y ventral de la sustancia gris periacueductal-rafe dorsal se envían axones hacia el NGC. Igualmente Vertes y Kocsis (1994) encontraron que el principal núcleo serotoninérgico proyecta hacia el NGC, en particular la parte rostral del rafe dorsal proyecta fuertemente al GiA.

Así pues existen aferencias de regiones presuntamente inhibitorias del sueño MOR (n. del rafe) pero también provenientes de otras áreas mas bien generadoras de este tipo de sueño (PPT/LDT). Asimismo como pudo apreciarse con varias de las aferencias que llegan al NGC provienen de regiones motoras y somatosensoriales sobretudo aquellas relacionadas con la modalidad nociceptiva. Asimismo se aprecia que muchas estructuras que contiene células cuya actividad se relaciona a la vigilia o el alertamiento conectan con el NGC. Entre ellas están la formación reticular a todo su largo incluido todo el sistema de los núcleos del rafe. Asimismo se puede mencionar

otras estructuras relacionadas con la esfera límbica como el *septum*, o el n. central de la amígdala.

Ahora es momento de referirse a la parte funcional de algunas de estas conexiones.

Aspecto funcional

Estudios electrofisiológicos.

Los estudios con trazadores tienen la importante ventaja de visualizar a nivel unicelular incluso, las conexiones de una región cerebral con todo el resto del SNC de una sola vez. Sin embargo esta aproximación no permite saber características funcionales de esas conexiones. La aproximación electrofisiológica, aunque restringida ya que sólo es posible estudiar una sola conexión a la vez, es ideal para obtener este tipo de información. Así estimulando en un "cabo" y registrando (extra o intracelularmente) en el otro se puede saber si la conexión es excitatoria o inhibitoria, el número de sinápsis entre ellas, si el nivel de excitabilidad varía, probar el tipo de receptor o receptores involucrados, etc.

Utilizando esta metodología en el gato decerebrado se ha descubierto⁷⁷ que la región pontina inhibitoria del tono muscular así como también la región mesencefálica locomotora (PPT- núcleo cuneiforme) tienen una relación funcional excitatoria sobre el NGC bulbar; es decir, el NGC bulbar puede considerarse como una vía común para la generación de la atonía o la locomoción. Esta característica motora bivalente se verá constantemente presente en los siguientes apartados. Sin embargo hay que señalar que esta primera vía parece que tiene preferencia funcional al menos en el gato decerebrado. Esto se infiere de que cuando se estimula a ambas aferencias, la función inhibitoria del tono muscular prevalece.

Mileikovskii BY (1994) estudió también la conexión entre la región pontina inhibitoria con el NGC bulbar. De su estudio se concluye que esta aferencia no sólo es activadora sino igualmente pueda ser inhibitoria para otras tantas células reticulares del bulbo. Sin embargo ambos efectos son congruentes para la función de generación del sueño MOR porque las que se inhiben son fundamentalmente células que responden a la estimulación somatosensorial mientras que las que se activan, tónicamente por cierto, son células reticuloespinales que a su vez inhiben motoneuronas. De manera que la excitación en la FR medial pontina es capaz simultáneamente de inhibir el flujo de la información nerviosa somatosensorial y además inhibir a las motoneuronas imposibilitando el movimiento. El profundo bloqueo sensoriomotriz es una de las características más distintiva del sueño MOR.

Recíprocamente el NGC bulbar tiene una relación fundamentalmente excitatoria con el NGC pontino. Ito y McCarley (1984) registraron EPSPs mono y polisinápticos después de la estimulación eléctrica del NGC bulbar. Además algo muy importante es que observaron que el nivel de excitabilidad de estas neuronas pontinas no es el mismo durante todo el ciclo sueño-vigilia. Es únicamente durante el sueño MOR que la estimulación del NGC bulbar produce EPSPs que dan lugar a secundariamente a espigas. Así pues parece haber un circuito de retroalimentación positiva entre ambas

regiones reticulares que podría servir para mantener la inhibición sensoriomotriz del SMOR. Además hallaron que antes de iniciar el sueño MOR las neuronas reticulares mediales pontinas son bombardeadas por aferencias excitatorias, de origen desconocido, que depolarizan el potencial de membrana lo suficiente para dar lugar al disparo tónico durante todo el sueño MOR. Al terminar el sueño MOR se repolarizan abruptamente, manteniéndose así durante el sueño NMOR y la mayor parte del tiempo de vigilia.

Esta depolarización tónica durante el sueño MOR no es privativa de las neuronas de la mPRF sino también se sabe que ocurre en células del NGC bulbar; sólo que en este caso, la depolarización no inicia tiempo antes del sueño MOR sino que coincide con la aparición de la atonía, se mantiene a lo largo del sueño MOR para terminar igualmente con el rápido incremento en el tono muscular que caracteriza la fase final de este tipo de sueño³⁶. Por esta característica es probable que estas células se traten de reticuloespinales cuya función sea la ejecución directa de la inhibición motora. ¿De donde provendrá esta depolarización tónica durante el sueño MOR? Es factible que venga de la mPRF pero también puede venir del mismo LDT/PPT ya que ambas guardan relación anatómica con el NGC como se acaba de revisar.

Por otro lado gracias a los estudios electrofisiológicos se sabe que en ratas anestesiadas, las neuronas del NGC bulbar pueden activar también a las motoneuronas craneales del núcleo hipogloso²²⁰. Hay indicios que esta conexión es glutamatérgica. No se sabe sin embargo qué suceda en el caso de todas aquellas otras motoneuronas craneales a las que proyecta el NGC como las oculomotoras, las del trigémino o las faciales ni tampoco que ocurre con estas conexiones durante el ciclo sueño-vigilia. De hecho la conexión del NGC con motoneuronas que se ha estudiado más es la bulbo-espinal, específicamente aquella que se establece con motoneuronas lumbares. En el gato intacto, decerebrado o anestesiado se observa^{36,377} que la conexión bilateral del NGC hacia la motoneuronas lumbares es inhibitoria pero también puede ser excitatoria. La conexión excitatoria involucra menor número de sinápsis intermedias que la inhibitoria. Además se sabe que en un animal intacto la magnitud de los EPSPs no se modifican en el transcurso del ciclo sueño-vigilia mientras que la influencia inhibitoria si presenta importantes modificaciones estado-dependientes. Así esta presente durante la vigilia así como en el sueño NMOR, pero su influencia sobre las motoneuronas es menor. Sin embargo durante el sueño MOR, la amplitud de los IPSPs se ve incrementada tanto que puede bloquear la generación de espigas antidrómicas desde el nervio periférico. Además se descubrió¹⁷⁵ que esta potente inhibición motolumbar por parte del NGC durante el sueño MOR, esta mediada por glicina y no por GABA. De este modo se puede vislumbrar que en efecto el NGC es una vía común para la locomoción o bien para la atonía. Sin embargo esta última aparece preferentemente durante el sueño MOR y esta mediada por interneuronas inhibitorias glicinérgicas reforzando por tanto la conductancia al cloro de las motoneuronas lumbares.

También se ha estudiado la conexión retículo-lumbar en relación a la atonía inducida por el carbacol. Así se ha encontrado que durante la atonía generada por el carbacol en la mPRF, en el gato decerebrado o bien anestesiado, se decrecienta significativamente los EPSPs lumbares después de la estimulación del NGC^{138,218}. Además en el caso del gato anestesiado con α -cloralosa, no se observan IPSPs antes de la atonía producida con carbacol sino sólo se generan grandes EPSPs al estimular el

NGC¹⁰⁷. Esto corrobora que es durante el sueño MOR es cuando prevalece o incluso emerge la función motoinhibitoria del NGC y que esta es generada primariamente por una aferencia excitatoria de las células colinoceptivas de la mPRF.

Esta función excitadora o inhibidora del NGC no sólo esta presente en relación a motoneuronas espinales, sino también a neuronas espinotalámicas. Particularmente es notoria en aquellas que transmiten información nociceptiva⁶⁶. Así pues el NGC es una estructura de relevo sensoriomotriz que se comporta bifásicamente según el estado de vigilancia en cuestión.

Con respecto a otras conexiones especialmente con los núcleos del rafe no se sabe nada desde el punto de vista electrofisiológico.

Transecciones

Como se ha mostrado, la estimulación en un lado de la conexión simultáneamente al registro en el otro, ha brindado valiosa información funcional acerca de la misma. Sin embargo también es posible estudiar las conexiones dentro del cerebro cortando el "cable" que las une, estas es la idea subyacente a una transección.

Esta metodología se ha utilizado para estudiar otra vez la conexión pontino-bulbar. Esta ha sido examinada en función de sus efectos sobre los signos conductuales y polisomnográficos característicos del sueño MOR. Así algunos autores^{197,205} afirman que es esencial la integridad de esta conexión para la generación del sueño MOR. En particular se refieren a la conexión pontinotegmental-ventral como la más importante y no tanto la pontinotegmental-dorsal. En estos animales seccionados no fue posible advertir ninguno de los signos del sueño MOR durante todo su periodo de sobrevivencia (17 a 30 días). Incluso tampoco se pudo producir signos de sueño MOR con la inyección de carbacol en la mPRF. Esto indica fuertemente que el circuito de retroalimentación positiva entre la mPRF y la formación reticular medial bulbar es fundamental para el mantenimiento de la globalidad de fenómenos que constituyen el sueño MOR.

Otros autores¹⁷² sin embargo mencionan que para la generación de los signos "rostrales" como la desincronización cortical, el ritmo θ hipocampal, las PGO's registradas en el geniculado lateral así como los MOR's, el puente es por si solo suficiente. Sin embargo para la atonía esta conexión se revela nuevamente como indispensable.

Registros de actividad unitaria.

Otra ventaja que ofrece la aproximación electrofisiológica es el estudio de la actividad unicelular de las neuronas o **actividad unitaria** (AU). Su propósito explícito es buscar las relaciones entre la actividad de la neurona, medida a través del número potenciales de acción registrados extracelularmente y la ocurrencia de conductas específicas u otros factores no tan espontáneos como la estimulación.

De los estudios^{173,201} de AU de neuronas en el NGC bulbar y pontino realizados en gatos y ratas en libre movimiento, se puede deducir que i) existen una mayoría de neuronas que se activan preferencialmente con los movimientos durante la vigilia, mientras que otras pocas lo hacen en relación a posturas; ii) en algunas de estas es clara una relación con algún movimiento específico pero en otras la relación no es obvia de modo que parecen asociarse al movimiento en general; iii) la mayoría de estas unidades **también** despliegan una fuerte activación durante el sueño MOR. Este patrón de actividad se conoce cómo "SMOR-vigilia on" y confirma esta relación bivalente de la motricidad con el estado de vigilancia.

La relación entre actividad en NGC y atonía se ha visto¹⁷¹ confirmada también por el estudio de la AU durante el síndrome catapléxico o atonía muscular en vigilia. Existe una subpoblación de células en la región ventromedial y caudal del NMC que muestra máxima actividad sólo durante los ataques catapléxicos así como durante el sueño MOR. Es probable que la anormal activación de esta subpoblación de neuronas del NGC sean las responsables de producir atonía durante la vigilia.

También se conoce¹³³ que existen unidades en el NGC que participan en el control cardio-respiratorio durante el sueño MOR. Así durante este sueño las unidades motorespiratorias del bulbo incrementan su AU coincidiendo con periodos de máximas descargas de PGO's. Por el contrario cuando la frecuencia de PGO's disminuye, estas unidades bajan su AU y baja también la actividad de motoneuronas frénicas. Esto explicaría porque de la irregularidad cardiorespiratoria durante el sueño MOR. Por otro lado la AU de muchas de las neuronas del NGC se relaciona con los cambios espontáneos o inducidos de presión arterial así como con el ciclo cardíaco³⁴.

En el NGC hay además neuronas nociceptivas de las del tipo de amplio rango dinámico y nociceptivas específicas, cuya actividad esta estrechamente relacionada con el componente motor así como de alertamiento de la respuesta dolorosa, mas que con los aspectos perceptuales del dolor en sí^{24,84,136}. Esto indica que el NGC pudiera ser una región importante de integración supraespinal de la respuesta ante el dolor.

Finalmente se sabe⁵³ que al menos en el conejo, las neuronas caudales del NGC responden a distintos tipos de información vestibular.

En resumen los estudios de AU muestran que en el NGC hay neuronas que al menos participan en el control nervioso motor, cardiorespiratorio y nociceptivo. Sobretudo hay una fuerte relación de la actividad motora con los estados de vigilancia que se caracterizan con una gran actividad cortical (vigilia y sueño MOR)

Inmunoreactividad para FOS durante la inducción colinérgica del sueño MOR.

Con técnicas de registro electrofisiológico se tiene una evidencia muy directa de la actividad de la célula neuronal, sin embargo estas técnicas permiten estudiar sólo una pequeña población celular por experimento. En esta última década se ha puesto de moda la técnica inmunocitoquímica para la detección de la proteína FOS como marcador de actividad neuronal. Esta proteína es codificada por un gene que responde

rápidamente a la estimulación de la célula; de modo que a mayores niveles de inmunoreactividad para FOS se puede deducir que hay más actividad celular. Así con la ayuda de esta técnica se puede evaluar el nivel de activación unicelular en todo el SNC de forma simultánea.

Sin embargo este avance técnico tiene también sus limitaciones. Hay indicios que hacen pensar que no todas las células que se activan muestran mayor marcaje para FOS. Por ejemplo durante el sueño MOR inducido con carbacol no se observa mayor inmunoreactividad para FOS en estructuras tradicionalmente relacionadas a este estado como el hipocampo, el núcleo geniculado lateral o bien las gigantocélulas pontinas^{169,217}. De modo que los resultados obtenidos con este marcador no deben de tomarse como definitivos.

No obstante lo anterior, los resultados obtenidos con FOS parecen nuevamente subrayar la importancia de las células del NGC en el sueño MOR. Así la estimulación colinérgica en la región mPRF además de inducir incrementos muy substanciales de sueño MOR, también inducen aumentos muy significativos en la inmunoreactividad tanto en la parte dorsal como ventral del bulbo incluyendo al núcleo Paramediano. Así pues probablemente las neuronas más pequeñas del NGC sean las que tengan más relación al sueño MOR y no tanto las gigantocélulas.

Estimulación eléctrica.

Debemos entender por estimulación una amplia variedad de medios de intervención sobre factores endógenos celulares que dan como resultado un cambio cualesquiera en su excitabilidad espontánea. Una forma de conseguir esto es modificar el ambiente de cargas extracelulares o intracelulares "inyectando" corriente eléctrica ya sea anódica o catódica; a esta técnica se le conoce como electroestimulación. Esta técnica electrofisiológica permite aproximarnos en forma gruesa a la función de una región cerebral. Es algo burda cuando no se complementa con registro, debido a que no relaciona explícitamente a la estructura a estimular con alguna otra u otras estructura cerebrales. Además no es muy específica al actuar tanto sobre células como sobre fibras que pasen por el lugar; de modo que no es posible discernir los efectos debidos a la estimulación de unas u otras. Sin embargo es útil porque de forma simple da pistas sobre algún papel funcional.

Experimentos de estimulación del NGC mostraron que la activación de esta región inhibe los reflejos espinales en gatos decerebrados demostrando por vez primera la existencia de una región dentro del bulbo que suprime la rigidez de decerebración. Región que se le bautizó como la área inhibitoria bulbar de Magoun y Rhines. Sin embargo esta maniobra aplicada en los gatos íntegros produce conducta de escape²³. Esto indica de nuevo esta bivalencia motora del NGC en relación a los estados de alerta. Mas recientemente se ha mostrado⁹⁷ que esta propiedad bifuncional está relacionada al valor de presión arterial media (MAP) al momento de la estimulación. Si MAP está entre 80 y 140 mmHg, la estimulación produce atonía, si por el contrario esta por debajo de este valor se induce hipertonia.

Además la estimulación del NGC en gatos y ratas ha señalado el papel de esta estructura en la bradicardia, hipotensión arterial y la disminución del volumen y

frecuencia respiratoria. Este control cardiorespiratorio negativo va más allá del NGC y probablemente está mediado por el sistema parasimpático^{33,182}. Así hay que recordar que el NGC proyecta fuertemente hacia la columna intermediolateral que es un importante relevo parasimpático.

En resumen los experimentos de electroestimulación han confirmado las ideas expuestas previamente en otros apartados; es decir, el NGC participa en el control motor bifásico y que este se relaciona según el estado cardiorespiratorio del animal.

Estimulación farmacológica.

Esta técnica esta diseñada para estudiar el papel de los diferentes receptores en relación a una función o conducta. Es posible gracias a la existencia de diferentes compuestos altamente selectivos para un determinado tipo de receptor, posibilitando una estimulación mucho más selectiva que la estimulación eléctrica. Sólo aquellas células que los presenten serán blancos para el fármaco en cuestión. Si además se deja a un lado las vías parenterales o incluso la administración intra cerebro-ventricular optando en su lugar por la microinyección, perfusión o iontoforésis local en el parénquima cerebral se logra un alto grado de especificidad.

Con la ayuda de esta técnica se sabía¹⁸³ que al aplicación de encefalinas a la médula rostroventral induce una potente analgesia, indicando que el NMC incluido los núcleos del rafe bulbares, son una vía de relevo para la generación de la potente analgesia inducida por morfina.

Por otro lado también se conoce^{6,196} que la estimulación de los receptores colinérgicos tanto nicotínicos como muscarínicos en el NGC bulbar de gatos; produce alertamiento, conducta motora estereotipada así como disminución del sueño en general. En la rata no se sabe que efectos tenga sobre el ciclo sueño-vigilia tenga la estimulación colinérgica en el NGC bulbar. Sin embargo se ha probado extensamente en el puente donde no es raro que induzca también vigilia aunque también puede inducir sueño MOR como esta ya muy demostrado para el gato doméstico. Esto señala que el NGC bulbar (y también el pontino) es una estructura cuyas células colinoceptivas no solo están relacionadas descendentemente con la activación motora sino también ascendentemente con la activación cortical.

Por otro lado se conoce^{95,96} la existencia de al menos dos regiones bulbares en donde la estimulación de receptores glutamatérgicos no-NMDA así como muscarínicos produce atonía muscular en gatos intactos o decerebrados. Estas son el NMC y el núcleo Paramediano respectivamente. Además al bloquear estos receptores también se bloquea la atonía que produce el carbacol en la región PnC-*subcoeruleus*; confirmando que el NGC es un relevo fundamental para la generación de la atonía durante el SMOR pero además indicando que la vía de relevo es glutamatérgica así como colinérgica. Por el contrario si en lugar de estimular receptores no-NMDA del NMC (y también del puente) se estimulan los NMDA se produce conducta locomotora. Así pues la característica bivalencia motora tiene su origen también en dos tipos distintos de conductancias y no tanto en dos neurotransmisores diferentes.

La estimulación glutamatérgica del NGC a nivel ponto-bulbar también induce bradicardia, hipotensión y baja en la frecuencia respiratoria de gatos anestesiados¹⁸². Además últimamente se ha visto¹⁰⁴ que la estimulación de los α -adrenoceptores tipo 2 del NGC por un compuesto llamado guanabenz induce también un potente efecto bradicárdico e hipotensor.

Se desconoce que efectos conductuales o polisomnográficos pueda tener la estimulación específica de los receptores serotoninérgicos del NGC.

Lesiones.

La técnica neurofisiológica de la lesión también está diseñada para develar la participación de una región en alguna función o conducta. Sólo que en este caso procede a la inversa de la estimulación ya que lo que se espera observar es que la función o la conducta desaparezca como consecuencia de la destrucción de las células protagonistas. Al igual que sucedió con la estimulación, las técnicas de lesión cerebral se han ido refinando para volverse relativamente selectivas. En un principio se lesionaba con corriente eléctrica (electrolíticas) o con congelación (cricoagulación) pero en estos casos había la desventaja de que se destruía a las células como también a las fibras en tránsito. Posteriormente se han ido mejorando de manera que ya se trabajan lesiones neurotóxicas; estas lesiones sólo destruyen los cuerpos celulares pero no afectan a las fibras en tránsito. Se llevan acabo con poderosos agonistas glutamatérgicos o incluso el mismo glutamato de manera que afectan a aquellas células que tengan receptores para los a.a. excitadores. Últimamente ya es posible además lesionar selectivamente a ciertos tipos de células como las catecolaminérgicas, las serotoninérgicas entre otras estirpes, esto es posible gracias a toxinas selectivas como el 6-OHDA o la 5,7 DHT respectivamente. El NGC ha sido lesionado tanto electrolíticamente como neurotóxicamente. Sin embargo hasta ahora no se ha estudiado los efectos de lesiones específicas de alguna estirpe neuronal.

Los efectos de lesiones electrolíticas^{25,125,224} sugieren nuevamente la participación del NGC en la analgesia inducida por opiáceos y en las respuestas conductuales al dolor moduladas supraespinalmente. Estas lesiones bloquean el efecto analgésico de 5 mg de morfina en PAG, e incrementan la latencia de escape después de la estimulación dolorosa así como la latencia a la vocalización inducida por la estimulación nociceptiva.

Por otro lado la lesión electrolítica o neurotóxica del NGC bulbar además pone en evidencia el importante papel de esta estructura en la regulación motora durante la vigilia así como en el sueño, especialmente en el sueño MOR. Transitoriamente se observa ^{164,225} durante la vigilia hiperextensión de los miembros, déficits en el control de la locomoción así como en el reflejo de lordosis. Esto parece ser más específico del NGC que del NMC. Además se aprecia una reducción a menos de la mitad del tiempo total de sueño MOR, que aparece junto con un incremento muy importante en el EMG así como se aumentan las mioclonías durante este tipo de sueño. También se observó cierto grado de hipertonia durante el sueño NMOR. Alguno de estos cambios son transitorios en grado variable y más contundentes con la lesión electrolítica que con la neurotóxica. En referencia a este tipo de lesión el grado de recuperación de estos

déficits se ha visto⁷⁴ que se correlaciona positivamente con el cociente de sobrevivencia colinérgicas y GABAérgicas pero **negativamente con la sobrevivencia de las células serotoninérgicas**. Esto sugirió por vez primera que las células serotoninérgicas de esta región facilitan el tono motor y que este efecto interfiere importantemente con el mantenimiento del sueño MOR. Por el contrario las células GABAérgicas o colinérgicas favorecen la disminución del tono motor y esto a su vez permiten mantener el sueño MOR.

Finalmente se debe mencionar que no obstante la lesión electrolítica del NGC a nivel pontobulbar no produce efectos sobre la respuesta basal cardiorespiratoria de gatos anestesiados; estos si se presentan al estimular la región hipotalámica locomotora. Se observa¹⁵⁰ hipotensión y baja en la frecuencia cardíaca indicando que el control cardio-respiratorio del NGC no es tónico, sino que tiene relación con demandas motoras particulares que se integrarían a nivel del hipotálamo.

Lo revisado hasta ahora muestra que existe un alto grado de congruencia en los resultados emanados de los diferentes enfoques metodológicos con los que se ha abordado el estudio de la formación reticular medial bulbar. Todos estos datos nos arrojan una clara evidencia de la importancia de esta región para la regulación del sueño MOR sobre todo en relación al componente de inhibición sensoriomotriz. Asimismo me parece que con esta información en mente así como con la generada en el apartado anterior, es momento de introducir a la serotonina en el contexto del problema de la regulación del sueño.

CAPITULO 4. LA NEUROTRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA

Antes de entrar a estudiar la relación entre la serotonina y el sueño, es necesario revisar los aspectos generales de este neurotransmisor. De hecho no siempre se reconoció a la serotonina como un neurotransmisor²⁹. Incluso la serotonina toma su nombre de que fue aislada primeramente del suero no del cerebro. Al inicio de su estudio se reconoció que esta substancia podía contraer poderosamente al músculo liso vascular. Al mismo tiempo otro grupo de investigadores la aislaron de células cromóafines entéricas en donde se encuentra muy concentrada. En el intestino, la "enteroamina" como la nombraron también causa una fuerte contracción del músculo liso. Fue hasta después que se encontró por vez primera en el SNC. Proporcionalmente en el SNC sólo está el 1% de la serotonina total, el resto está en las plaquetas, los mastocitos, así como en las ya mencionadas cromóafines entéricas. Sin embargo según Cooper y cols. (1996) como la 5-HT no puede cruzar la barrera hemato-encefálica, este 1% se debe sintetizar solamente *in situ*.

El nombre químico de la serotonina es 5-hidroxi-triptamina (5-HT). El 5-HT es una indolamina muy parecida a drogas alucinógenas como el LSD, psilocibina y el DMT. De hecho cuando se descubrió que el LSD podía bloquear la fuerte contracción del músculo liso inducida por 5-HT, se pensó en que su efecto alucinógeno podría ser resultado de un bloqueo similar de la 5-HT cerebral. Actualmente se sabe que esto es en parte cierto aunque todavía no se puede explicar bien los efectos alucinógenos del LSD.

déficits se ha visto⁷⁴ que se correlaciona positivamente con el cociente de sobrevivencia colinérgicas y GABAérgicas pero **negativamente con la sobrevivencia de las células serotoninérgicas**. Esto sugirió por vez primera que las células serotoninérgicas de esta región facilitan el tono motor y que este efecto interfiere importantemente con el mantenimiento del sueño MOR. Por el contrario las células GABAérgicas o colinérgicas favorecen la disminución del tono motor y esto a su vez permiten mantener el sueño MOR.

Finalmente se debe mencionar que no obstante la lesión electrolítica del NGC a nivel pontobulbar no produce efectos sobre la respuesta basal cardiorespiratoria de gatos anestesiados; estos si se presentan al estimular la región hipotalámica locomotora. Se observa¹⁵⁰ hipotensión y baja en la frecuencia cardíaca indicando que el control cardio-respiratorio del NGC no es tónico, sino que tiene relación con demandas motoras particulares que se integrarían a nivel del hipotálamo.

Lo revisado hasta ahora muestra que existe un alto grado de congruencia en los resultados emanados de los diferentes enfoques metodológicos con los que se ha abordado el estudio de la formación reticular medial bulbar. Todos estos datos nos arrojan una clara evidencia de la importancia de esta región para la regulación del sueño MOR sobre todo en relación al componente de inhibición sensoriomotriz. Asimismo me parece que con esta información en mente así como con la generada en el apartado anterior, es momento de introducir a la serotonina en el contexto del problema de la regulación del sueño.

CAPITULO 4. LA NEUROTRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA

Antes de entrar a estudiar la relación entre la serotonina y el sueño, es necesario revisar los aspectos generales de este neurotransmisor. De hecho no siempre se reconoció a la serotonina como un neurotransmisor²⁹. Incluso la serotonina toma su nombre de que fue aislada primeramente del suero no del cerebro. Al inicio de su estudio se reconoció que esta substancia podía contraer poderosamente al músculo liso vascular. Al mismo tiempo otro grupo de investigadores la aislaron de células cromóafines entéricas en donde se encuentra muy concentrada. En el intestino, la "enteroamina" como la nombraron también causa una fuerte contracción del músculo liso. Fue hasta después que se encontró por vez primera en el SNC. Proporcionalmente en el SNC sólo está el 1% de la serotonina total, el resto está en las plaquetas, los mastocitos, así como en las ya mencionadas cromóafines entéricas. Sin embargo según Cooper y cols. (1996) como la 5-HT no puede cruzar la barrera hemato-encefálica, este 1% se debe sintetizar solamente *in situ*.

El nombre químico de la serotonina es 5-hidroxi-triptamina (5-HT). El 5-HT es una indolamina muy parecida a drogas alucinógenas como el LSD, psilocibina y el DMT. De hecho cuando se descubrió que el LSD podía bloquear la fuerte contracción del músculo liso inducida por 5-HT, se pensó en que su efecto alucinógeno podría ser resultado de un bloqueo similar de la 5-HT cerebral. Actualmente se sabe que esto es en parte cierto aunque todavía no se puede explicar bien los efectos alucinógenos del LSD.

Generalidades

Síntesis y catabolismo

En el SNC, la 5-HT se sintetiza únicamente a partir del L-triptofano (TRP). Sin embargo esto no significa que aumentando progresivamente la concentración de TRP en plasma se produzca paralelamente una elevación de la 5-HT cerebral. En la rata⁵⁶ una vez que se alcanzan los 25 µg/g de TRP cerebral (50 mg/kg. ip) ya no se observa ningún aumento asociado de la 5-HT cerebral (0.8µg/g). No obstante si aumenta en paralelo la concentración del principal metabolito de la serotonina. Lo anterior indica que aunque bajo las circunstancias de elevada cantidad de precursor se sigue sintetizando más 5-HT, sin embargo existe una limitante en su almacenaje que da lugar a su metabolización inmediata.

El TRP sólo se obtiene por vía de la dieta. Incluso es el aminoácido (a.a.) cuya concentración es menor tanto los alimentos como en el tejido corporal. Por lo tanto la eliminación de este a.a. de la dieta decreta profundamente el nivel de 5-HT cerebral. El TRP presenta una variación diaria en su concentración plasmática y cerebral. Así sus variaciones diurnas son mayores que cualquier otro a.a. pudiendo llegar a 150%. En la rata el cenit se observa alrededor de las 2 a.m. y el nadir a las 10 a.m. Esto claramente coincide con la conducta alimenticia de las horas nocturnas en estos roedores. Sin embargo este ritmo se sostiene aunque no se consuman proteínas durante semanas aunque se pierde con el ayuno prolongado, señalando que la insulina tiene que ver con la generación de este ritmo. Igualmente la 5-HT cerebral también varía circádicamente en ratas y ratones pero su periodo no coincide exactamente con el ritmo del triptofano cerebral. La 5-HT cerebral alcanza su pico máximo alrededor de las 6 a.m. y su valle ocurre a las 6 p.m.⁵⁶. Estas variaciones coinciden con el inicio del periodo de reposo (pico) así como con el tiempo de mayor densidad de sueño MOR (valle). Su oscilación por otro lado tampoco alcanza la magnitud de la del TRP siendo sólo de 15%.

Fernstrom y Wurtman (1973) también hallaron que las concentraciones de TRP plasmático, cerebral así como la 5-HT cerebral aumentan con la cantidad de carbohidratos en la dieta. Este es un fenómeno que depende de la secreción de insulina ya que igualmente aumentan con la inyección de esta hormona. Es curioso que el TRP es el único a.a. que mostró este comportamiento ya que los demás bajan su concentración plasmática al ser incorporados masivamente al músculo esquelético por efecto de la insulina. Por otro lado una dieta rica en proteínas aumenta también la concentración plasmática de TRP pero no así en cerebro ni tampoco afectan la cantidad de 5-HT cerebral. Esto se debe a un fenómeno de competencia entre los a.a. neutros por el acarreador situado en la membrana plasmática. En esta el TRP es el menos favorecido por que como se mencionó su concentración en los alimentos es la más baja. Bajo estas circunstancias si se proporciona una dieta proteica rica que contenga el TRP pero no los a.a. neutros, ahora sí se observa elevación de TRP plasmático, cerebral así como de la 5-HT.

Una vez que el triptofano es incorporado a la neurona, es hidroxilado por la enzima triptofano-hidroxilasa a 5-hidroxi-triptofano (5-HTP), un paso que depende

fuertemente del oxígeno y la tetrahidropteridina. Este es el paso limitante de la síntesis. El siguiente y último paso de la síntesis, es una descarboxilación llevada a cabo por la enzima descarboxilasa de los a.a. aromáticos.

¿Cómo se regula la síntesis de 5-HT ? La 5-HT como producto final parece que no puede inhibir su propia síntesis. Esto se ha demostrado inhibiendo a las MAO's y observando como la 5-HT se va acumulando hasta llegar incluso a triplicar su concentración basal²⁹. Igualmente la acumulación del principal producto catabólico tampoco puede inhibirla, en cambio si favorece su síntesis. Esto se ha observado al bloquear al acarreador de 5-HIAA con probencid. Este tratamiento da lugar a una acumulación continua de este catabolito sugiriendo que igualmente la 5-HT se sigue sintetizando. De hecho también se observa¹⁹⁵ un incremento en el L-TRP cerebral así como un aumento del 5-HTP. Tampoco el 5-HTP puede reducir la actividad de la enzima limitante de la síntesis. Parece ser que por un lado esta regulación puede estar dada por la cantidad presente de triptofano o bien por los cofactores de la triptofano-hidroxilasa. Otra posibilidad muy interesante está dada por una regulación que depende del nivel de actividad neural misma de las células serotoninérgicas (regulación fisiológica). Principalmente se propone²⁹ a la fosforilación dependiente de calcio. Esta fosforilación puede regular la actividad de la triptofano-hidroxilasa haciendo que a mayor demanda de liberación aumente también la actividad de esta enzima y por ende de la síntesis de 5-HT.

Una vez liberada la 5-HT al espacio sináptico, el principal mecanismo de terminación de su actividad biológica es la recaptura. Las terminales serotoninérgicas poseen sitios de recaptura de alta afinidad. Esta recaptura es llevada a cabo por acarreadores situados en la membrana plasmática. Estas proteínas son capaces de translocar a la 5-HT en cualquier dirección dependiendo del gradiente en forma Na⁺ y Cl⁻ dependientes²⁹.

La principal ruta catabólica de la serotonina es la deaminación. Lo anterior es llevado a cabo por la enzima monoaminoxidasa (MAO) sobre las fracción libre del citosol. Existen dos subtipos de esta enzima denominados A y B. El subtipo A muestra una afinidad más específica por la serotonina aunque esto es más válido para el humano que para los roedores. El tipo A se le ha ubicado preferencialmente en células catecolaminérgicas sobre todo en el *locus coeruleus* así como en la glia. Esta última localización indica que también la glia juega un papel importante en la nulificación de la 5-HT del espacio sináptico. El tipo B parece ser exclusivo de las células serotoninérgicas. La MAO es una enzima integral de la membrana externa mitocondrial. Posteriormente la 5-HT deaminada sea puede oxidar a ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) o bien también reducir a 5-hidroxi-triptofol. Esto depende del cociente NAD⁺/NADH. Sin embargo esta bien establecido¹⁹⁰ que cuando se bloquea la actividad de las MAO, la cinética de desaparición de 5-HIAA coincide perfectamente con la tasa de acumulación de 5-HT demostrando que este es el principal producto metabólico y no así el 5-hidroxi-triptofol.

Ubicación en el SNC y Conexiones

La primera localización de la 5-HT en células específicas (somas) dentro del SNC se dio gracias a la técnica de la inducción de fluorescencia por condensación con el formaldehído (FIF). Con esta técnica Dalhström y Fuxe (1964) ubicaron a 9 grupos celulares que se situaban la mayoría sobre la línea media del tallo cerebral desde el bulbo hasta el mesencéfalo. Muchas de estas áreas coinciden con los núcleos del rafe, de este modo varios investigadores manejan el concepto de estos núcleos casi como sinónimos de núcleos serotoninérgicos. Sin embargo esto no debe ser así ya que estas células no se circunscriben al sistema del rafe así como porque hay otras células no 5-HT dentro el rafe. Por esta razón se propuso³⁸ una denominación independiente para ellos (B1-B9). La inmunohistoquímica dirigida directamente contra 5-HT se ha corroborado¹⁷⁸ muchos de los hallazgos con FIF. A continuación se describirán en detalle estos grupos:

B1.- Estos somas se ubican básicamente dentro del rafe pálido, mientras que los otros cuerpos se localizan dentro de la formación reticular adyacente, específicamente dorsal al n. olivar accesorio.

B2.- Estas células se ubican dentro del rafe obscuro.

B3.- La mayoría se localizan dentro del rafe magno y el resto se extiende como una banda dentro del cuerpo trapezoide.

Según Takeuchi Y (1988) estos grupos bulbares son menos conspicuos en los carnívoros y primates que en los roedores.

B4.- Estas células se ubican dentro del n. vestibular medial dorsal al prepósito hipogloso.

B5.- La porción principal se ubica dentro del rafe pontino y otra porción se extiende dorsalmente entre el fascículo longitudinal medio.

B6.- Este grupo es una extensión del B7 y se ubica dentro del n. tegmental dorsal.

B7.- Este es el mayor agregado de células serotoninérgicas y se ubica dentro del rafe dorsal y se subdivide en parte dorsomedial, ventromedial y lateral. Las células de la porción lateral se extienden por fuera del rafe dorsal.

B8.- Este grupo se ubica dentro de los núcleos del rafe central superior (mediano en la rata) y rafe linear. Otros cuerpos celulares de este grupo están por fuera de estos núcleos dentro de la formación reticular mesencefálica.

B9.- Estos somas se ubican dentro y alrededor del lemnisco medio y se extienden hasta el lemnisco lateral.

Adicionalmente con la inmunocitoquímica se ha ubicado¹⁸⁴ a otros grupos de somas 5-HT en otras 4 zonas: a) en el área postrema b) dentro de *locus coeruleus*, el área *suberulea*, y el complejo nuclear parabraquial, c) rodeando al n.

interpeduncular-área ventrosegmental, d) porción dorsomedial del n. interpeduncular. Aparte de lo anterior con tratamientos que elevan artificialmente la serotonina intracelular (IMAO's) o bien otros que la concentran en el soma celular (colchicina) se sabe de células serotoninérgicas en el n. del tracto solitario, sustancia negra, área ventrosegmental, núcleo dorsomedial y lateral hipotalámico.

Únicamente en el ratón se ha hecho un análisis cuantitativo de estas células 5-HT inmunoreactivas. Se calcula¹⁸⁴ que existen alrededor de 26,000 de ellas, el 66.8% se hallan dentro de los n. del rafe repartido de la siguiente forma: el pálido cuenta con el 6.2%, el oscuro con el 2.6%, el magno con el 6.1%, el pontino con el 4.5%, el mediano con el 8.1%, el linear con el 3.8% y el dorsal con el 35.5%. Sin embargo en la formación reticular está la nada despreciable cantidad de 18.9%, dentro y alrededor del lemnisco medio se localiza el 8.5%, en la superficie ventral del bulbo está el 4.0% y en la sustancia gris periacueductal sólo el 0.2%.

Las conexiones eferentes de las células 5-HT son muy amplias abarcando todo lo largo del SNC. Prácticamente no hay una sola subdivisión mayor de este que carezca de inervación serotoninérgica. En lo general según Cooper y cols (1996) los grupos caudales del rafe proyectan preferencialmente hacia el bulbo y la médula espinal (fascículo dorsolateral, ventrolateral y ventral) mientras que los grupos mesencefálicos lo hacen hacia el telencéfalo y también hacia el diencéfalo vía el fascículo medio del cerebro anterior. El rafe magno proyecta preferentemente hacia el asta dorsal (sensorial) mientras que el pálido y oscuro lo hacen hacia las astas ventrales (motoras) o la columna intermediolateral (autonómica)¹¹⁵. Asimismo el rafe dorsal inerva preferentemente el tálamo, el neocórtex, las cortezas cerebral y cerebelar mientras que el rafe mediano inerva más densamente a las estructuras límbicas como el hipocampo y el *septum*.

En particular detallaré lo referente al romboencéfalo, que es donde se regula el sueño MOR. Así en esta región exceptuando al n. motor del músculo extraocular, todos los otros núcleos motores de los nervios craneales están fuertemente inervados por células 5-HT. Asimismo el núcleo sensorial del trigémino está muy inervado sobre todo en las áreas relacionadas a la aferencia nociceptiva. Igualmente hay una fuerte densidad de fibras en la parte dorsolateral de la formación reticular particularmente a nivel del *pontis oralis*. En esta zona que Semba¹⁶⁵ denominó la zona de inducción colinérgica del sueño MOR, se encontraron fibras provenientes sobre todo de las áreas B9, B8, B7 y B6. También se sabe^{157,166} de células 5-HT que envían densas proyecciones hacia el tegmento dorsolateral, entre otros al área PPT/LDT. Las aferencias hacia el NGC ya se mencionaron previamente. La oliva inferior también recibe aferencia serotoninérgica. Por el contrario la corteza cerebelar así como sus núcleos profundos reciben una escasísima aferencia que sólo se ha podido observar con pretratamientos con IMAO's.

Efectos Postsinápticos y Tipos de Receptores

La aplicación microiontoforética de 5-HT a neuronas que presentan actividad espontánea ha servido para estudiar cuál pudiera ser el papel fisiológico de esta amina sobre la actividad espontánea de las células. Bloom y cols. (1973) ha revisado mucho de los estudios al respecto y la conclusión que presenta es que en la mayoría de los casos, la 5-HT inhibe la descarga espontánea. Además estos efectos son por lo general de largo plazo. Por ejemplo la 5-HT inhibe la descarga espontánea de células en la corteza motora, piriforme, o polisensorial, hipocampo, bulbo olfatorio, área septal, amígdala y neocórtex, geniculado lateral y medial, supraquiasmático, supraóptico, n. cuneato así como la de motoneuronas de la médula espinal. En otras palabras, la neurotransmisión serotoninérgica es un elemento de largo alcance para frenar la excitabilidad nerviosa a nivel del cerebro en su totalidad.

Sin embargo la 5-HT también presenta efectos excitatorios. Por ejemplo en la formación reticular medial pontina o bien en el caso del núcleo Paramediano. También se conocen respuestas excitatorias en el hipotálamo, hipocampo y sobre todo se conoce a nivel del núcleo motor facial del bulbo. En estas células producen un lento EPSP así como un incremento en la resistencia membranal.

Esta dualidad probablemente se deba a que existe una gran variedad de tipos de sitios de alta afinidad para 5HT en el SNC. Mediante estudios²⁹ de afinidad con radioligandos se han caracterizado ocho subtipos de receptores. Sin embargo los más estudiados pertenecen a dos grandes familias denominadas como tipo 1 y tipo 2. Se propone que los tipo 1 median acciones inhibitorias incluidas las autoinhibitorias (autoreceptor somatodendrítico 5-HT_{1A}) mientras que los tipo 2 median las excitatorias. Por ejemplo los receptores depolarizantes del núcleo facial son de tipo 2A. Estos también se hallan en la corteza cerebral (lámina IV) y en el hipocampo. En el bulbo raquídeo también están presentes los tipo 2D cuya depolarización ocurre vía apertura de canales a calcio. En ambos casos uno de sus agonistas específicos es el α -metil-5-HT mientras que la ketanserina, los antagoniza específicamente. Los tipo 1 se ubican en los núcleos del rafe (tipo 1A), el hipocampo, la sustancia negra así como los ganglios basales.

Los 5-HT₁ producen sus efectos inhibitorios por la apertura de canales de K⁺ o bien cierre de canales de Ca²⁺ vía proteínas G sensibles a toxina *pertussis*. Los efectos facilitatorios mediados por los 5-HT₂ se deben al cierre de canales de K⁺ vía IP₃. Otros efectos excitatorios están mediados por reducción de corrientes de K⁺ voltaje dependientes vía la PCA. Estos efectos excitatorios se han descrito también para los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇. Estos subtipos se hallan en el hipocampo, en los colículos, tálamo, hipotálamo y amígdala. Finalmente los 5-HT₃ producen sus efectos excitatorios rápido y transitorios vía un canal para cationes. Estos se ubican en la corteza entorinal así como también en el área postrema.

Con técnicas de biología molecular se han clonado hasta 15 distintos tipos de receptores para 5-HT en mamíferos. La inmensa mayoría de ellos pertenecen a la

superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Sólo el tipo 5-HT₃ es un receptor ionotrópico. Dentro de los receptores metabotrópicos, la familia de receptores 5-HT que interactúan con la adenilato ciclasa es heterogénea. Esta compuesta por la subfamilia 5-HT₁ (inhibición de la ADC) y los tipos 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ (activan a la ADC). Por el contrario los que actúan vía la fosfolipasa C solo comprenden a la familia tipo 5-HT₂.

Serotonina y sueño

La cantidad de investigaciones científicas que han abordado este tema es bastante considerable de manera que sale fuera de los propósitos de esta introducción, abordarlos a todos con el suficiente detalle. Vale decir que desde hace 30 años, se empezó a indagar la relación entre esta indolamina y el sueño. Desde ese entonces y hasta la fecha se sigue trabajando en el campo. Incluso se puede afirmar con suficiente certeza que es necesario investigar aun más ya que se desconocen un enorme número de detalles importantes. Bajo estas circunstancias, la información que a continuación se presenta es sólo una breve reseña obtenida a partir de una investigación mucho más amplia.

De los experimentos realizados con el propósito de interferir total o transitoriamente con la transmisión 5-HT emergió la conclusión de que esta indolamina era necesaria para la generación del sueño en general. Poniendo particular énfasis sobre su participación en el sueño de ondas lentas II (sincronización cortical). Es así que los resultados de las lesiones electrolíticas, lesiones neurotóxicas selectivas para células 5-HT así como el bloqueo de su síntesis, han sido bastantes congruentes al respecto; sobre todo cuando se utilizó como animal experimental al gato doméstico. En la rata en cambio hubo varios estudios que reportaron resultados negativos haciendo notar una cierta diferencia interespecífica, aunque en este caso también hubo evidencias a favor del papel hipnógeno de la 5-HT.

Así se observó que los animales con deficiencias de 5-HT no podían conciliar el sueño básicamente porque estaban hiperreactivos así como hiperactivos. Incluso se menciona la presencia de una conducta pseudoalucinógena asociada a este insomnio con presencia de PGO's. De todo esto pareciera que la 5-HT constituye una especie de freno sensoriomotriz durante la vigilia.

No obstante también se evidenció que el cerebro deficiente de 5-HT de estos animales podía readaptarse espontáneamente al cabo del tiempo y volver a generar sueño aún sin la presencia de la serotonina. Esto demostró claramente que la 5-HT no es el único freno durante la vigilia de manera que el cerebro puede echar a andar otros mecanismos análogos independientes de 5-HT. Asimismo con estos estudios se mostró que el estado de insomnio persistente era una consecuencia secundaria y no primaria de la interferencia con la transmisión 5-HT. Lo anterior al menos en el caso del principal agregado serotoninérgico, el núcleo del rafe dorsal. Fue así que lo primero que se observó al inactivar a este núcleo fue sueño, no hipervigilancia. Fue hasta tiempo después que se criocoaguló el rafe dorsal cuando apareció este estado de insomnio con presencia de PGO's señalando que se trata mas bien de un efecto secundario. Esto se evidencia también cuando se aplica 5-HTP o incluso la misma 5-

HT. El prolongado sueño que se produjo no fue inmediato sino que requirió una latencia bastante considerable como para pensarse en un efecto directo.

En lo que si no quedó duda fue que la 5-HT era un poderoso supresor de los potenciales PGO's durante la vigilia y así como que se requiere la presencia de 5-HT para que ocurra la sincronización cortical ya sea en circunstancias de estimulación del área preóptica o bien la deactivación de la formación reticular mesencefálica. Además un caso que merece especial atención en relación al supuesto papel hipnógeno de la 5-HT es la región del área postrema-núcleo del tracto solitario. Es muy posible que la transmisión 5-HT en esta región en efecto promueva la sincronización cortical. Así en este caso existe congruencia entre los resultados obtenidos con diversos enfoques experimentales que señalan la participación de estos núcleos en la generación del sueño así como que la 5-HT juega un papel importante en esta función.

Por otro lado se percibió que este estado de insomnio, no nada mas era producto de la deficiencia de 5-HT. Por el contrario esta deficiencia además crea un importante desbalance en la función normal de otros neurotransmisores relacionados naturalmente a la vigilia. Estos otros neurotransmisores afectados son la noradrenalina, la dopamina y la acetilcolina. De este modo se generaron evidencias acerca de que al frenar la sobreactividad de estos otros moduladores, el sueño podía reaparecer aun sin haber 5-HT. Se cree que estas maniobras debieron de restaurar el balance natural aminérgico de la vigilia y como consiguiente regresó también el sueño. Además vale decir que todas las conductas anormales que se reportan para este estado deben ser también producto de tal desarreglo aminérgico.

Bajo estas circunstancias, la 5-HT parece ser un elemento más de modulación de la vigilia y como tal es también un promotor secundario del sueño de ondas lentas y del sueño MOR. Sin embargo este papel de promotor no es como podría pensarse de deactivador de la vigilia sino mas bien parece jugar un papel de activador. Es así que el aumento de la transmisión 5-HT produce por ejemplo despertar en animales dormidos. También puede generar que el animal focalice intensamente su ambiente contrariamente al estado confuso de la deficiencia 5-HT. Además se observa un aumento del tono motor. Este puede ir desde una conducta motora bien organizada como la locomoción o el escape hasta otras fuera de contexto como el temblor, la rigidez o las sacudidas musculares. Esto se ha observado tanto en gatos, ratas y conejos tanto con estimulación eléctrica, como con reforzadores selectivos de la liberación 5-HT que incluyen a los inhibidores selectivos de la recaptura. Mas aún la relación estrechísima entre la transmisión 5-HT con el componente motor ha sido suficientemente evidenciada con los estudios de actividad unitaria de las células del rafe a todos niveles. Igualmente múltiples estudios de MD en animales en libre movimiento no dejan lugar a dudas de que la liberación fisiológica de 5-HT en muchas áreas del cerebro incluido el mismo rafe dorsal aumenta positivamente con el nivel de alerta del animal particularmente con la actividad motora disminuye con el sueño NMOR y es mínimo durante el SMOR.

Sin embargo su papel de promotor del sueño se ve después de esta activación. Es así que secundariamente la 5-HT induce hipersomnia o rebote de sueño, sobre todo de sueño MOR. Este efecto hipnógeno secundario al aumento de la 5-HT es muy factible que este mediado por el hipotálamo anterior-área preóptica. Este bien puede

deberse a un efecto secundario relacionado con el aumento de temperatura o bien darse en relación a favorecer la síntesis o liberación de péptidos hipnógenos como el ACTH₁₈₋₃₉ y/o el VIP. Es probable que su efecto a este nivel ponga en marcha tiempo después a la vía GABAérgica que se encarga de inhibir a la región del hipotálamo posterior-formación reticular mesencefálica. En particular la primera región inhibe potentemente al sueño MOR de manera que su deactivación es lo que probablemente subyazca al rebote de sueño MOR característico del retorno de sueño en animales con deficiencia de la 5-HT. Sin embargo en cualquier caso no queda mucha duda que la estimulación de la transmisión 5-HT inhibe directa y potentemente al sueño MOR. Sobre todo hay bastante evidencia acerca del papel inhibitorio de los receptores 5-HT_{1A} sobre las células colinérgicas generadoras del sueño MOR.

Lo anterior da pie a que se hable brevemente del modelo de interacción recíproca de regulación del sueño.

El modelo de regulación del sueño por interacción recíproca

Considerando los datos de actividad unitaria en las células del rafe de gatos, se ha elaborado un modelo para explicar el ciclo sueño-vigilia en función de los patrones de actividad de dos tipos de células básicamente. Las células "REM-off" así como las células "REM-on". Las células "REM-on" son aquellas células cuya actividad es máxima durante esta fase del sueño. Se ubican básicamente en el tegmento mesopontino dorsolateral (LDT,PPT, complejo parabraquial) así como en la formación reticular medial pontina o bulbar (mPRF, mBRF). Este modelo se conoce como de interacción recíproca y ha sido elaborado por McCarley y Massaoui (1992). Las células del tegmento dorsolateral serían básicamente las generadoras del sueño MOR. Se propone que algunas de estas células son colinérgicas. Se propone también que las células "REM-on" estarían tónicamente inhibidas durante la vigilia y el sueño NMOR por las células "REM-off". Estas se ubican en todo el sistema rafe, el *locus coeruleus-subceruleus* así como células dentro del complejo parabraquial y son por lo tanto monoaminérgicas. Unas a otras se inhibirían recíprocamente para dar lugar a la alternancia de fases de sueño. Así el tono aminérgico alto produciría una fuerte inhibición sobre el sueño en general y en particular sobre el sueño MOR. A medida que este tono va disminuyendo se propicia el sueño NMOR y cuando este tono es mínimo la inhibición sobre el sueño MOR acaba y este al fin aparece. Conforme transcurre el sueño MOR, los procesos de autoinhibición de las células "REM-on" terminarían por apagarlas y simultáneamente terminaría la inhibición sobre las "REM-off" que posibilitaría que estas vuelvan a ponerse en actividad reforzando mas la inhibición de las "REM-on" y dando lugar a la terminación del sueño MOR, el comienzo de la vigilia o bien al sueño NMOR, reiniciándose el ciclo otra vez.

Ahora bien además de la evidencia de los estudios de actividad unitaria, ¿que otros estudios apoyan este modelo? Se ha visto⁸² que sólo cuando el tono aminérgico es bajo, la estimulación colinérgica da lugar al sueño MOR. Si no es así se favorece a un especie de especie de vigilia en su lugar. Así la inyección del anticolinesterásico eserina (0.1-1 mg/kg. i.v.) en animales (gatos o conejos) normales induce un aumento de la frecuencia así como una disminución del voltaje cortical (desincronización).

Asimismo se observa la aparición del ritmo θ hipocampal. Estos son signos típicos de los estados de alerta asociados a orientación o locomoción. Por otro lado si se pretrata a los animales con reserpina (1-2 mg/kg.) se induce un estado muy similar al sueño MOR, es decir, se observa también desincronización cortical, ritmo θ hipocampal pero además completa atonía muscular así como MOR's. Estos efectos se bloquean con atropina lo que demuestra que se deben a una estimulación sobre los receptores colinérgicos. La reserpina a esta dosis induce un decremento de casi un 90% de las indol o catecolaminas cerebrales después de 4-6 h de la administración. Este momento coincide con la máxima eficacia de la eserina para inducir estados de sueño MOR.

Por otro lado en estudios de rebanadas¹⁰⁸ se ha visto que el 83% de las células presuntamente colinérgicas de bajo umbral que disparan en ráfagas ubicadas en el LDT se hiperpolarizan con la aplicación de 5-HT al medio. Este efecto también se produce con un agonista de los receptores 5-HT_{1A}. Estas células de disparo en ráfagas se ha visto que disparan en fase con las PGO's durante el sueño MOR (REM/PGO-on). Igual efecto se encontró¹⁰² en células presuntamente colinérgicas tanto del LDT como del PPT en el cobayo pero además se vio que la acetilcolina también las hiperpolariza, sugiriendo que la autoinhibición podría en efecto existir. Igualmente se ha visto²¹³ este efecto hiperpolarizante para la noradrenalina.

Sin embargo se puede argumentar que estos son estudios bastantes indirectos ya que es difícil pensar que una rebanada "sueña". Afortunadamente en este año Thakkar y cols. (1998) demostraron que la serotonina mediada por receptores 5-HT_{1A} inhibe selectivamente el disparo a las neuronas "REM-on" pero no así a las "REM-vigilia on". Todavía falta confirmar lo mismo para noradrenalina. Asimismo si se aplica el agonista 5-HT no selectivo 5-metoxi-DMT al área X (*pars compacta* del PPT) se observa⁸⁹ que la liberación de acetilcolina específica del sueño MOR en el geniculado lateral se reduce hasta en un 33%. Lo que sugiere otra vez que esta inhibición es específica sobre células colinérgicas "REM-on". De modo que estos datos dan apoyo al modelo de la interacción recíproca por lo menos en cuanto al componente inhibitorio de los sistemas serotoninérgico y catecolaminérgicos. Claro esta qué falta mucho por saber de cómo efectivamente se regulan las células "REM-off" y "REM-on". En particular qué pasa con estos sistemas reguladores antagonicos durante la compensación del SMOR.

En síntesis se puede afirmar que la vigilia es consecuencia de un tono aminérgico y colinérgico alto mientras que el sueño MOR requiere que las monoaminas estén muy disminuidas pero no así las células colinérgicas.

ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROBLEMA

Privación de sueño y 5-HT

De la revisión de estas investigaciones se desprenden varias conclusiones. Primero todas aquellas que se refieren a la medición de los niveles de 5-HT y/o 5-HIAA se han realizado en homogenados de tejido cerebral. Así pues la información obtenida sólo revela lo que sucedió fundamentalmente en el nivel intracelular. De modo que nada se sabe acerca de las repercusiones sobre la concentración extracelular de estas indolaminas que sin duda es la más relevante desde el punto de vista de la ya clásica transmisión sináptica pero además de la recientemente descrita^{22,227} transmisión volumétrica.

No obstante la anterior deficiencia, se debe señalar que muchos de estos estudios^{30,68,221} han mostrado que la privación de sueño incrementa la concentración de 5-HIAA o al menos el tasa de recambio señalado por el cociente 5-HT/5-HIAA. Esto no sólo se ha visto en tejido cerebral⁵⁴ sino también en el líquido cefaloraquídeo¹⁴⁶ o incluso en muestras de orina⁹⁴. Asimismo se ha encontrado en varias especies como la rata⁵, el hámster⁴, el gato¹⁴⁶ y el humano⁹⁴. Algo muy importante que añadir es que este aumento del metabolito no sólo está presente inmediatamente después de finalizada la privación sino especialmente se ha reportado^{16,189} después de algún tiempo en que el animal ha estado recuperando el sueño perdido. Aunque también es justo señalar que no se ha podido encontrar ninguna correlación entre la duración de la privación de sueño y esta facilitación del recambio 5-HT. Por otro lado todas las modificaciones reportadas en la transmisión 5-HT revierten después de la recuperación de sueño lo que indica que es el factor sueño el principal responsable de estas modificaciones.

Igualmente hay evidencias³⁰ que muestran que cuando existe aumento en la concentración intracelular de 5-HIAA se debe fundamentalmente a que se incrementó el recambio de la 5-HT y no tanto porque la privación halla producido una interferencia en el proceso de exocitosis del metabolito. Incluso también hay un par de trabajos^{139,185} que muestran que este incremento en la degradación de la 5-HT no se relaciona tampoco a un aumento de la actividad de las MAO's. Mas aún estos trabajos han encontrado que la actividad de estas enzimas tiende a disminuir sobre todo después de 96 h de privación de sueño MOR. Esto bien pudiera ser un indicativo de un tipo regulación hacia abajo consecuencia de una mayor disponibilidad del substrato.

Ahora bien es factible pensar que si no existe un aumento de la síntesis, el aumento de la catabolización de 5-HT dará lugar a un decremento de los almacenes intracelulares. Al respecto algunos estudios^{54,189} reportan este descenso. Sin embargo en muchos otros casos^{5,12,16,98,191,221}, no se encontraron modificaciones de los niveles intracelulares de 5-HT como consecuencia de la privación de sueño. Esto permite pensar en la existencia de procesos de compensación que darían lugar por ejemplo al incremento de síntesis de 5-HT o bien indicar que el aumento de la neurosecreción no es lo suficientemente intenso para afectar a los almacenes intracelulares. Al menos hay pruebas¹⁹¹ al respecto del primer proceso. Incluso hay trabajos en donde se observó que estos procesos de facilitación de la síntesis de 5-HT son capaces de hacer

aumentar la concentración intracelular, sobre todo durante la recuperación de sueño. En estos casos además se puede explicar el aumento de la catabolización suponiendo que mucha de esa nueva 5-HT se encuentra en el citoplasma neuronal a disposición de las MAO. Por otro lado lo que parece favorecer la síntesis es la mayor disponibilidad del precursor L-triptofano y no así el aumento de la actividad de la triptofano-hidroxilasa.

Todo lo anterior es congruente con la idea de que la transmisión 5-HT esta involucrada en la modulación de la vigilia y que por tanto al verse forzado este estado debe existir una sobredemanda sobre estas células. Sin embargo ¿hay otro tipo de pruebas adicionales a los estudios bioquímicos que demuestren que hay verdaderamente un aumento de la actividad de células 5-HT producido por la privación de sueño? Al respecto los estudios de actividad unitaria y privación no dan respuestas uniformes. Hay quienes⁶² si apoyan este incremento de actividad, hay quienes no han encontrado^{112,145} modificaciones e incluso los hay quienes¹¹³ sugieren un decremento en la actividad. Hay que señalar que estas disparidades se deban a las diferencias en los enfoques experimentales usados. De modo que vale la pena detallar algo más estos estudios.

Prevot y cols.(1996) no encontraron ninguna modificación en la frecuencia basal de disparo de las células del rafe dorsal de rata después de cuatro días consecutivos donde se privó a estos animales de sueño MOR por 16 h. Sin embargo estos estudios fueron hechos en animales anestesiados lo que deja dudas al respecto de la naturalidad de los resultados.

El único estudio de privación de sueño y actividad de las células presuntamente 5-HT del rafe dorsal de gatos en libre movimiento, muestra que 24 h de privación total de sueño produce un incremento ligero (18%) en la tasa de disparo aunque este sólo se aprecia durante la vigilia activa⁶². Esta observación se consiguió porque la privación se hizo mediante la técnica de la manipulación gentil, es decir, el animal estaba en un ambiente donde podía moverse si así lo quería. Así pues es posible pensar que en ambiente donde el movimiento está restringido como sobre la plataforma, quizá no se presente un incremento similar. Esto subraya de nuevo la importante relación entre la facilitación de la actividad de células del rafe y el movimiento. Por otro lado este incremento desapareció en cuanto el animal se le dejó recuperar su sueño. Asimismo estos autores encontraron que la privación produce un decremento en la potencia del agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, para inhibir la descarga del rafe. De modo que se argumenta que es precisamente esta hiposensibilidad en los autoreceptores somatodendríticos lo que originaría que la tasa de disparo aumente. Esto bien pudiera explicar porqué hasta las 15 h de privación se observa este efecto ya que tomaría un tiempo que la liberación aumentada produjera esta hiposensibilización. Aunque no resulta tan fácil explicar cómo sin haber un aumento de la tasa de disparo, pueda suponerse que ocurra más liberación de neurotransmisor. Es lógico pensar que esta subida en los niveles extracelulares debe ser la causa mas probable que produciría luego una hiposensibilización en estas proteínas.

En otro trabajo hecho en gatos privados de SMOR se registró¹¹³ a neuronas tipo "REM-off" pero del área del *locus coeruleus/subcoeruleus*. En este sentido es muy probable que fueran células noradrenérgicas aunque también pudieran haber sido serotoninérgicas ya que también se han reportado su presencia en este sitio.

Asimismo se conoce muy bien que en estos felinos tanto las células 5-HT como las NA comparten este tipo de patrón de disparo estado dependiente. De forma interesante se registró además a células del tipo "REM-on". En este estudio se encontró contrariamente al anterior, que las células "REM-off" decremantan su tasa de disparo durante la vigilia forzada (20.4 h en promedio) mientras que las "REM-on" la aumentan durante este mismo periodo (41.7 h en promedio). Asimismo ambos tipos de células regresan a su descarga basal durante la recuperación de sueño indicando de nuevo que es el factor sueño el generador de estas alteraciones.

Además es necesario agregar que aunque no hay la certeza de que se trate de células 5-HT consideré importante incluir este trabajo porque sus resultados explican dos fenómenos muy importantes que se presentan durante la privación de sueño. Estos son la somnolencia progresiva que tendría relación con el decremento de las células "REM-off" y otro es el aumento de la presión de entrada a sueño MOR que estaría representado por el incremento del disparo de las células "REM-on". Ambos fenómenos asociados representan la puesta en marcha de la regulación homeostática del sueño. Sin embargo y a riesgo de equivocarme prefiero concluir diciendo que los estudios de actividad unitaria dan pruebas en favor de que la vigilia forzada facilita el aumento de excitabilidad neuronal de las células 5-HT al menos durante el movimiento.

Existe sin embargo otro medio no electrofisiológico para indagar el grado de actividad neuronal. Este es el inmunomarcaje para el factor facilitatorio de transcripción temprana FOS. Utilizando esta herramienta se ha visto^{119,141} que 24 ó 48 h de PSMOR por el método de la plataforma o de la manipulación gentil inducen en efecto un aumento en la inmunoreactividad para las células del rafe dorsal. Estos datos contrastan con los obtenidos por Ledoux y cols. (1996) quienes reportan que no hay diferencias significativas en el número de células entre animales sin privar y aquellos privados de SMOR por 24 h con el método de la plataforma o la manipulación gentil. De este modo no hay acuerdo respecto a si están o no más activas estas células durante la PSMOR.

Ahora bien también es posible arrojar alguna luz al problema de la relación entre actividad de neuronas 5-HT y vigilia forzada observando lo que está sucediendo a nivel de la postsinápsis. En otras palabras viendo si hay cambios de afinidad en los sitios de ligadura para 5-HT ya sea *in vitro* como *in vivo*.

Los estudios^{207,208} de afinidad ligando-receptor han mostrado que la privación de sueño MOR por diferentes tiempos decremantan la afinidad de los sitios específicos de ligadura para 5-HT. Asimismo se ha observado que esta maniobra retrasa 4-6 h el periodo del ritmo circádico de estos sitios. Cambios paralelos ocurren con el tratamiento crónico con el inhibidor selectivo de la recaptura, imipramina lo que hace sospechar que la privación favorece la estimulación de estos sitios al igual que ocurre con los antidepresivos. Igualmente en fecha reciente Hipólido y cols.(1998) mostraron que 96 h de privación de SMOR produjeron un decremento ligero pero significativo de la afinidad de los receptores 5-HT_{1A}. No obstante este efecto sólo se pudo apreciar a nivel de cerebro entero pero no así para ninguna región cerebral particular lo que hace dudar un poco acerca de una mayor liberación.

Los estudios *in vivo*^{124,222} sugieren una hiposensibilización tanto de los receptores 5-HT en general, los 5-HT_{1A} en particular⁶² así como también del translocador membranal de 5-HT¹⁴⁵. Es así que la privación de sueño MOR reduce el efecto facilitatorio del agonista no específico quipazina sobre la inducción de sacudidas de cabeza así como el efecto de alertamiento. En cambio después del rebote de sueño se produce el efecto contrario. De modo que es lógico pensar que la privación produce una hiposensibilización postsináptica que pudiera indicar mayor liberación mientras que el sueño recuperativo produce una hipersensibilización que habla quizá de una menor liberación. La maniobra de privación de sueño también produce una respuesta farmacológica menor ante el reto con el inhibidor de recaptura citalopram. Este se manifiesta en menor liberación de prolactina así como en menor inhibición del disparo de las neuronas del rafe dorsal. No obstante también es justo señalar que la privación de sueño MOR puede producir una facilitación del síndrome serotoninérgico generado por cargas de precursores como L-triptofano o 5-HTP¹⁶³. Esto indicaría por el contrario que durante este estado hay una menor liberación de 5-HT.

Bajo estas circunstancias se puede apreciar fácilmente la importancia que tiene los estudios que midan la concentración extracelular de monoaminas en diferentes áreas cerebrales sobre todo aquellas relacionadas con la modulación de los estados de vigilancia. Estos estudios se deben llevar a cabo durante la privación así como también durante el rebote de sueño. Para obtener esta información, la MD constituye un técnica especialmente adecuada.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Tomando en consideración lo visto hasta ahora se deduce que posiblemente la privación de sueño induzca un aumento en la transmisión 5-HT. Asimismo se ha visto que la 5-HT tiene un doble papel en la regulación del sueño MOR. Directamente como un potente inhibidor pero *a posteriori* también es un eficiente promotor de la sobreexpresión del mismo (rebote). En este sentido también se vio que el sueño MOR está regulado homeostáticamente y bien pudiera ser que la 5-HT juegue un papel en esta respuesta compensatoria. Igualmente se ha planteado aquí que la formación reticular medial bulbar, el NGC, es una región muy importante en la regulación del sueño MOR. De modo que de la reunión de estos ejes conceptuales surge el siguiente problema que constituye el **objetivo principal** de la presente tesis:

- Determinar mediante la técnica de MD la concentración extracelular de serotonina así como de su principal metabolito en una área importante para la regulación del sueño MOR como lo es el núcleo reticular gigantocelular. Se pretende que las anteriores determinaciones se hagan en el contexto de la privación selectiva de sueño MOR para así contribuir al esclarecimiento del papel de la modificación de los estados de vigilia sobre la transmisión serotoninérgica.
- Como objetivos secundarios también se pretende averiguar si también en esta región el nivel de variación en la transmisión serotoninérgica guarda relación con las diferentes estados de vigilia, así como observar además si la concentración extracelular de 5-HT es calcio dependiente como ha sido reportado previamente.

Ahora bien a la luz de los antecedentes ¿qué resultados se espera encontrar ?

Si se parte de la base que la privación de sueño MOR aumenta la transmisión 5-HT y que este aumento favorece a su vez el rebote compensatorio de este tipo de sueño. Entonces es posible que durante la privación se observe una mayor concentración extracelular de 5-HT así como de 5-HIAA. Por el contrario se esperaría que esta liberación disminuya importantemente durante el rebote de sueño de modo que la inhibición serotoninérgica no interfiera con el aparato encargado de la puesta en marcha del inicio y el mantenimiento del sueño MOR. En particular aquella parte ubicada en la formación reticular medial bulbar. Asimismo se espera encontrar que la concentración extracelular de 5-HIAA aumente durante el sueño recuperativo para ir en paralelo a lo que sucede a nivel intracelular.

Por otro lado se espera que la transmisión serotoninérgica se comporte en acuerdo con los reportes de actividad unitaria obtenidos en células del sistema rafe. Es decir sea mayor durante la vigilia, menor durante el sueño de ondas lentas y mínima durante el sueño MOR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parte I. MEDICIÓN DE LA LIBERACIÓN DE 5-HT/5-HIAA Y PRIVACIÓN DE SMOR

Se utilizaron 15 ratas machos de la variedad Wistar cuyo peso estuvo entre 250-300 gr. Se asignaron al azar a los siguientes grupos: control caja (n=4), control plataforma (n=4) y plataforma de privación selectiva de sueño MOR (n=7).

Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron anestesiados profundamente con droperidol (0.25 mg/kg IM) y ketamina (100 mg/kg IP). Posteriormente utilizando un estereotáxico, se le colocó unilateralmente una cánula-guía (Bioanalytical System) dirigida hacia el NGC (AP: -2.0 (λ); LAT: 0.4; VER: -8.0. coordenadas del atlas Watson y Paxinos). La cánula se fijó al cráneo con la ayuda de dos tornillos de anclaje así como con cemento acrílico dental. Finalmente se suturaron y se les aplicó una dosis única de penicilina G benzatínica (1,200,000 U IM).

Es importante señalar la importancia de la implantación previa de este tipo de cánula. Tal implantación permite por un lado que en el mismo día del experimento, la sonda de microdiálisis sea guiada con precisión hacia la región de estudio sin necesidad de reoperar al animal. Además dado que el extremo de la cánula queda justo por arriba de la región donde va a estar situada la parte activa de la sonda de microdiálisis (membrana), no se compromete la integridad de esta área hasta el momento mismo del experimento. De este modo el proceso de gliosis (cicatrización) no arrancará hasta el día del experimento. Si se insertara únicamente la sonda de microdiálisis, la colecta tendría necesariamente que apresurarse para pocos días después de la cirugía. Esto debe ser así porque hay que muestrear antes de que la glia termine por reemplazar a las neuronas de la región de interés¹¹. Estudios anteriores han mostrado que conforme avanza el proceso de gliosis, la cantidad de neurotransmisores que se recuperan durante la microdiálisis va siendo cada vez menor¹⁵². Esto muy probablemente se deba a que las terminales neuronales degeneran a consecuencia del daño producido por la inserción de la sonda. Finalmente este apresuramiento tampoco daría tiempo a que el animal se recupere íntegramente de la lesión quirúrgica.

Recuperación post-quirúrgica

Dado que la inserción de la cánula produjo alteraciones motoras que hacían imposible que los ratas pudieran permanecer bien equilibradas sobre las plataformas (especialmente sobre la pequeña), se hizo necesario aguardar un periodo entre 7 y 12 días antes de que los animales se recuperaran totalmente y pasaran a la fase experimental. Asimismo durante este intervalo se monitoreo diariamente el peso corporal. El final de este periodo fué establecido cuando por un lado desaparecieron

las alteraciones motoras, así como el animal recuperó su peso preoperatorio. Tanto durante este periodo como posteriormente a lo largo del experimento, cada rata se mantuvo aislada.

Procedimiento de PSMOR por el método de la plataforma

Después del periodo de recuperación cada rata fue mantenida por 96 h sobre su respectiva plataforma (los controles permanecieron siempre dentro de su jaula). Las plataformas en sí, consisten de tubos metálicos fijados al piso de un tanque plástico. Estas plataformas se elevan a una altura de 15 cm. Las plataformas de privación de sueño MOR miden 6.5 cm de diámetro (33.2 cm²), mientras que la plataforma control abarcan 15 cm (188.7 cm²). Estas dimensiones mayores, permiten a los animales dormir en ambos tipos de sueño. No obstante para asegurar lo anterior, también se diseñó otro grupo de ratas que sirvieron como controles de sueño durante la estancia sobre los dos tipos de plataformas (ver adelante parte 4). A cada tanque se le añadió 5 cm. de agua de manera que aunque la rata cayese de la plataforma, pudiera luego trepar hasta ella con cierta facilidad ya que aún queda disponible superficie de sustentación.

A todo lo largo de las 96 h, se establecieron dos periodos diarios de 1 h de descanso cada uno (8AM y 8 PM); en estos se sacaron a los animales de los tanques, se pesaron y se les metió a sus jaulas habituales. Durante los mismos se les permitía desplegar cualquier conducta excepto dormir. Asimismo durante toda la permanencia sobre las plataformas, las ratas tuvieron acceso irrestricto a comida y agua. Todas las ratas fueron mantenidas en un patrón 12/12 de luz-obscuridad en un cuarto con temperatura controlada (25° C).

Procedimiento de microdiálisis

Para el caso de los animales mantenidos en las plataformas pequeñas, la microdiálisis se realizó tanto durante las últimas 4 h de privación de sueño MOR, como durante las primeras 4 h de sueño recuperativo. En el caso de los animales de la plataforma control, la microdiálisis se hizo únicamente durante las últimas 4 h de estancia. Para el caso del grupo control de caja, se llevó a efecto después de la recuperación quirúrgica. Cabe aclarar que durante el muestreo de las últimas 4 h de la privación, los animales igualmente permanecieron sobre las plataformas de modo que se preservaron las condiciones experimentales. Asimismo durante la microdiálisis, las ratas permanecieron dentro de un contenedor especial donde podían llevar a efecto cualquier conducta incluido el dormir si era el caso (diálisis en libre movimiento). Este contenedor se encontraba su vez dentro de una caja sonoamortiguada, acondicionada con temperatura controlada (25°C) y vidrio de observación unidireccional.

Al inicio de la microdiálisis, se les insertó via la cánula guía y sin anestesia, una sonda nueva de microdiálisis de 1 mm de longitud de membrana (Bioanalytical system). Esta inserción así como el inicio de la perfusión tuvo lugar cuatro horas antes de la colección en sí. Este periodo se diseñó con el objeto de permitir al tejido

habituar a las condiciones impuestas por la microdiálisis; estas son básicamente la presencia de un cuerpo extraño y sobre todo la extracción continua de compuestos de bajo peso molecular del medio extracelular. Lograda la habituación a los factores antes mencionados, los niveles de recuperación de los compuestos de interés fueron estables de modo que se inició la colecta. La diálisis se llevo a cabo con Líquido Cerebro Espinal artificial (CSFa) a temperatura ambiente. La composición iónica del mismo fue: Na⁺ 148 mM, K⁺ 4.5 mM, Ca⁺⁺ 1.3 mM, Mg⁺⁺ 1.0 mM, Cl⁻ 132.6 mM, HCO₃⁻ 23 mM, H₂PO₄⁻ 1.5 mM (osmolaridad total= 312 mM) y pH 7.4. Se dializó a una velocidad de flujo de 1 µL/min. Fueron colectadas series de muestras de 12 µL (12 min). Algunas de estas fueron mantenidas a -60° C antes de su análisis pero la mayoría se acidificaron (pH 2) inmediatamente con ácido perclórico para ser analizadas en fresco. Esta acidificación previene la oxidación temprana de las monoaminas.

Ubicación anatómica de la sonda

Los análisis *post-mortem* de la ubicación de la huella correspondiente a la membrana de microdiálisis se hicieron de la siguiente forma. Las ratas fueron letalmente anestesiadas con pentobarbital (400 mg/Kg IP), perfundidas intracardiamente con solución salina, para luego fijar el tejido con solución de paraformaldehído al 4 %. Los cerebros fueron entonces removidos y post-fijados durante tres días con soluciones gradiente de sacarosa-paraformaldehído (10, 20, 30 %) a 4°C. Posteriormente el tallo cerebral fue seccionado en el criostato en cortes coronales de 100 µM. Las secciones se deshidrataron para luego teñirse con violeta de cresilo. La ubicación de la huella de la membrana se inspeccionó entonces en estas preparaciones con un microscopio de disección. Estas locaciones fueron individualmente registradas sobre la lámina anatómica correspondiente tomando en cuenta estructuras de referencia.

Procedimiento de análisis cromatográfico.

La mezcla de compuestos del líquido extracelular obtenidos mediante la diálisis fue inyectada directamente en un cromatógrafo de líquidos de alta presión (GILSON). La separación se logró mediante cromatografía de fase reversa siendo la fase estacionaria una columna C-18 tipo "microbore" (100 x 1 mm, 3µM. Bioanalytical system). La fase móvil utilizada fué una solución de base acuosa de ácido monocloroacético 100mM (buffer), octilsulfato de sodio 0.65 mM (par aniónico), EDTA•2Na 1-2 mM (quelante férrico), acetonitrilo 5 % y tetrahidrofuran 1.2 % v:v (bases orgánicas) ajustada a pH= 3.2 con NaOH. La velocidad de flujo de la fase móvil fué de 0.08 ml/min. Una vez separadas, la oxidación de estas indolaminas se hizo a un potencial de 650 mV vs. Ag/AgCl sobre un electrodo de carbón vidriado. La sensibilidad del potenciómetro (LC-3C.BAS) se estableció a 0.5 nA/V para el caso de la lectura de la corriente generada por la oxidación de la serotonina. En el caso del 5-HIAA, se fijó a 5 nA/V. De esta manera, se tuvieron que hacer corridas independientes para la lectura de cada compuesto. La identidad de los picos cromatográficos correspondientes a la serotonina y al 5-HIAA se constató al compararlos contra los generados con estándares de referencia externos (SIGMA) de concentración conocida.

Cuando llegó a existir alguna duda, se procedió a agregar el estándar a una muestra. De esta manera el pico del estándar se sobrelapaba al pico del compuesto análogo. La inyección de los estándares se hizo antes, durante y después de las corridas. Las áreas bajo los picos las calculó automáticamente el programa de análisis del HPLC (Gilson 715).

Finalmente los datos de concentración relativa (fmol/5 μ L) fueron comparados estadísticamente entre los tres grupos por medio de una prueba "t" para dos poblaciones y muestras independientes a un nivel de significancia de $p < 0.05$. (Microcal Origin Ver 4.0)

Parte II. MEDICIÓN DE LA LIBERACIÓN DE 5-HIAA CON RELACIÓN A LAS FASES DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA

Para llevar a cabo esta determinación, cuatro ratas con las mismas características de sexo, raza y peso de las mencionadas en el apartado anterior, fueron implantadas quirúrgicamente tanto con una cánula guía en el NGC, como también con un dispositivo para el registro polisomnográfico (PSG). Brevemente este dispositivo consistió en un arreglo de 6 electrodos de tornillo que se colocaron en igual número de locaciones sobre la píamadre o corteza cerebral (nasal, frontal y parietal bilaterales). Este tipo de electrodos permitieron registrar la actividad eléctrica cortical (ECoG). Otro par de electrodos de alambre se insertaron profunda y bilateralmente dentro del fascículo de los músculos extensores del cuello. Estos electrodos sirvieron para registrar el tono muscular (EMG). Finalmente el conjunto de 8 electrodos se fijaron permanentemente al cráneo con cemento dental.

Al igual que con el grupo anterior, se estableció un periodo de recuperación después de la cirugía. También de forma similar los animales fueron mantenidos en aislamiento, bajo un régimen de fotoperiodo de 12/12, con temperatura controlada así como agua y alimento *ad libitum*. Sin embargo estos animales no sufrieron ninguna manipulación sobre su patrón de sueño así como tampoco no se modificó en forma importante su hábitat usual. Sólo se aprovechó este periodo de restauración para habituarlos (2 días consecutivos durante 4 h continuas) al ambiente del contenedor de diálisis en libre movimiento. Una vez finalizada la recuperación, se procedió a dializar simultáneamente al PSG.

Para generar el PSG, la actividad eléctrica cortical y muscular se amplificaron diferencialmente (μ V/mm), se filtraron según el caso (0.3-35 Hz para el ECoG; 15-70 Hz para el EMG) para finalmente registrarse simultáneamente en tiempo real sobre papel (15 mm/seg) en un oscilógrafo de tinta de ocho canales (GRASS Serie 6). El PSG permitió distinguir al menos tres fases, a saber: vigilia, sueño NMOR y sueño MOR. Los criterios de clasificación PSG que se utilizaron para reconocerlas fueron: i) la actividad cortical de rápida frecuencia y de bajo voltaje (desincronizada) junto con registro de tono muscular alto caracterizó a la vigilia ii) la actividad cortical de baja frecuencia y alto voltaje (sincronizada) junto con tono muscular disminuido se evaluó como sueño NMOR iii) el sueño MOR se asoció con actividad cortical desincronizada o actividad teta mas tono muscular disminuido o incluso atonía. Así mismo durante el

experimento, la observación conductual ayudó a corroborar el correcto reconocimiento de cada una.

El procedimiento de microdiálisis que se utilizó fué muy similar al descrito con anterioridad salvo que en esta ocasión, la velocidad de diálisis fue de 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Esta mayor velocidad permitió que la muestra de 5 μL se reuniera en tan sólo 2 min. Con esta mayor resolución temporal, se pudo colectar con mas facilidad muestras de cada estado de vigilancia. Sobre todo cobro importancia para el caso de sueño MOR cuya duración promedio en la rata es de alrededor de 2 min.

Cabe señalar que para lograr que la muestra de microdiálisis fuera representativa exclusivamente de una determinada fase de vigilancia, se tomó en cuenta el retraso que existe entre la microdiálisis y el PSG. Este retraso se determinó dividiendo el volumen muerto de la tubería entre la velocidad de flujo. Asi conociendo el valor de este retraso (2 min) se colectó únicamente dentro del tiempo de cada fase. Todas las muestras fueron acidificadas e inmediatamente inyectadas en el HPLC para su análisis. El proceso de cromatografía y detección electroquímica que se utilizó fué el ya descrito anteriormente. Igualmente se determinó para cada rata, la posición anatómica de la sonda.

La diálisis conjunta con el PSG se llevó a cabo en todos los animales de 3 a 11 PM. Es durante este periodo que de forma espontánea se presentan con mayor frecuencia episodios de sueño MOR y luego posteriormente el animal se despierta mas permanentemente conforme empieza la noche.

Parte III. REGISTRO PSG DE ANIMALES CANULADOS (SHAM) DURANTE LA ESTANCIA SOBRE AMBOS TIPOS DE PLATAFORMAS

Finalmente a otro grupo de 10 ratas se les implantó el dispositivo antes mencionado para registro PSG junto con una cánula metálica dirigida estereotáxicamente de nuevo al NGC. Estos animales fueron distribuidos en dos grupos; i)plataforma control (N=5) ii) plataforma de privación de sueño MOR (N=5). Las condiciones de implantación, recuperación y estancia sobre las plataformas fueron exactamente las mismas que para la Parte I. Se registró polisomnográficamente durante 4 horas iniciando a las 3 \pm 1 PM durante tres diferentes momentos experimentales: antes, durante y después de la estancia sobre las plataformas. Cabe señalar que a lo largo del registro obtenido durante la estancia en las plataformas, igualmente se mantuvieron las condiciones experimentales prevalecientes. En todos los casos, los registros se hicieron dentro de una caja sonoamortiguada con temperatura controlada (25°C). Los registros obtenidos se calificaron visualmente en vigilia, sueño NMOR y sueño MOR siguiendo los criterios ya mencionados. Para la medición de cada uno de estas fases, se consideró como duración mínima de la época 20 segundos. Asimismo se hicieron los estudios *post-mortem* para verificar la ubicación de la cánula.

Para la comparación estadística de los valores (tiempo total, duración y frecuencia) se utilizó primeramente una ANOVA de una vía y posteriormente una "t" para muestras pareadas a un nivel de confiabilidad de 0.05.

RESULTADOS

Efectos sobre las fases de vigilancia de la permanencia sobre las distintas plataformas

Antes de mostrar los resultados acerca de la liberación de serotonina así como de su principal metabolito, es importante analizar los resultados acerca de los efectos que produjo la estancia sobre las distintas plataformas sobre los parámetros cuantitativos más generales del ciclo sueño-vigilia. Es gracias a conocer en detalle estos efectos que las mediciones bioquímicas cobrarán pleno sentido al ser discutidas.

En primer lugar se debe mencionar que después de 4 días sobre sobre la plataforma de 15.5 cm, no se observó ningún cambio significativo sobre el tiempo total en que estuvieron los animales en cualquiera de los estados de vigilancia. Expresado en porcentaje, los animales siguieron pasando en promedio 26 ± 4 % del tiempo de registro en vigilia (vs 27 ± 4 % antes. NS), 63 ± 3 % en sueño NMOR (vs 60 ± 1 % NS) y sólo un 11 ± 3 % en sueño MOR (vs. 14 ± 3 % NS) (fig. 1). Esto confirma que 188.7 cm^2 es una superficie de sustentación lo suficientemente amplia para que una ratas de hasta 350 gr pueda expresar de manera normal su patrón de sueño-vigilia.

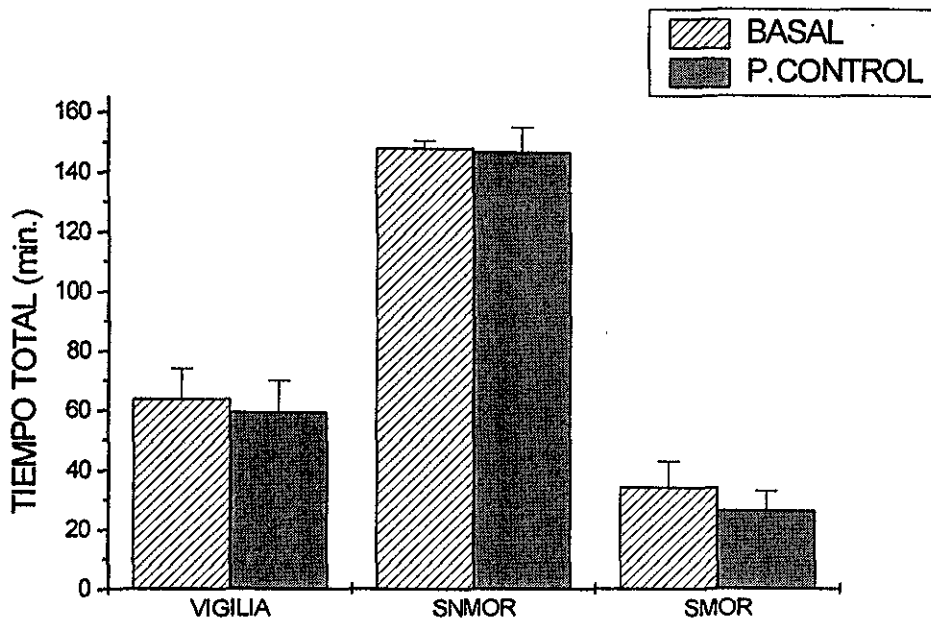


Figura 1. Promedio del tiempo total en cada estado de vigilancia del grupo de ratas de la plataforma control. Este tiempo total fue obtenido por 4 horas de registro de las 5 a las 9 PM en cinco animales. Las barras de dispersión corresponden al error estándar. Estos animales tenían además una cánula unilateral en el NGC.

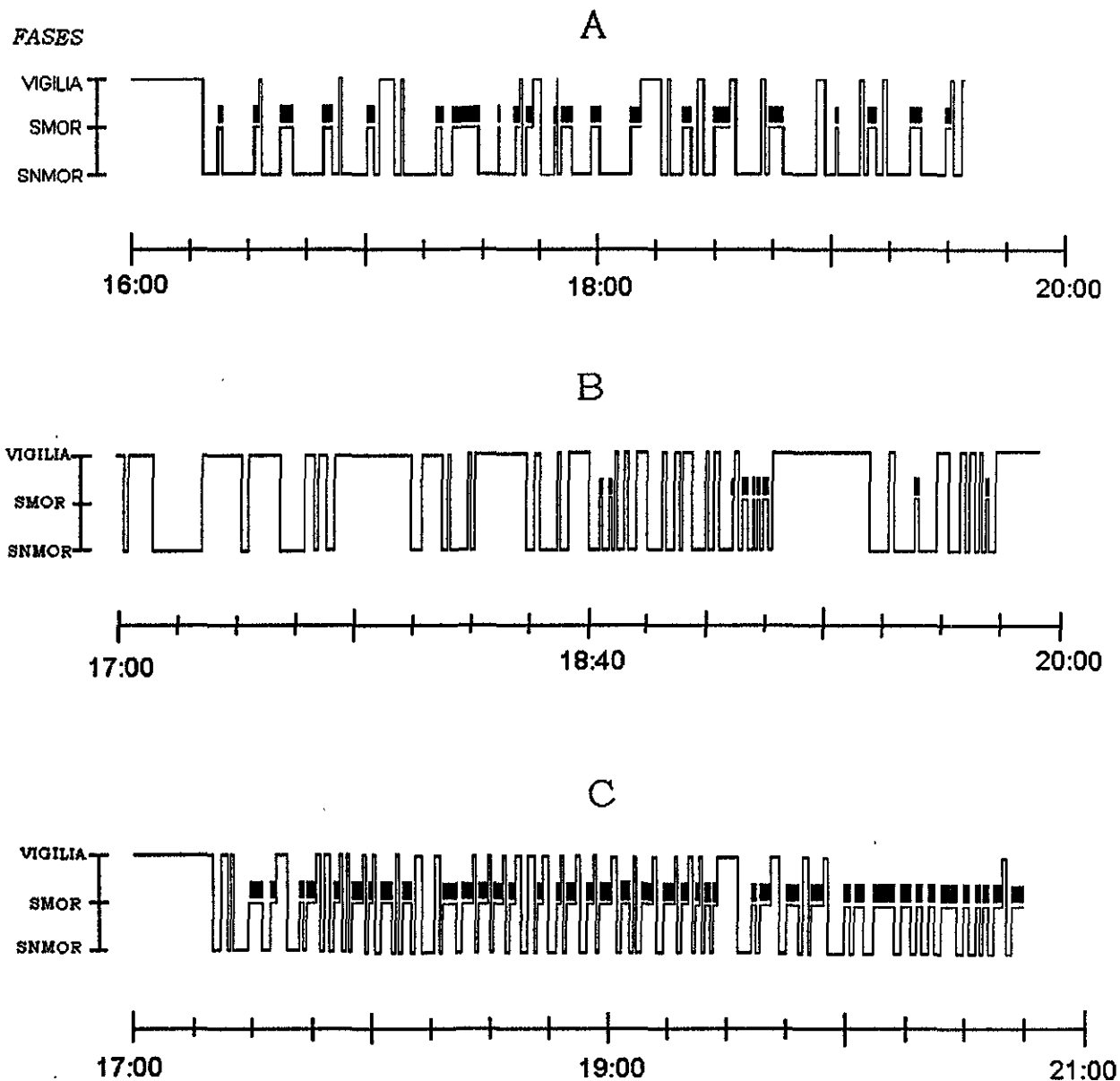
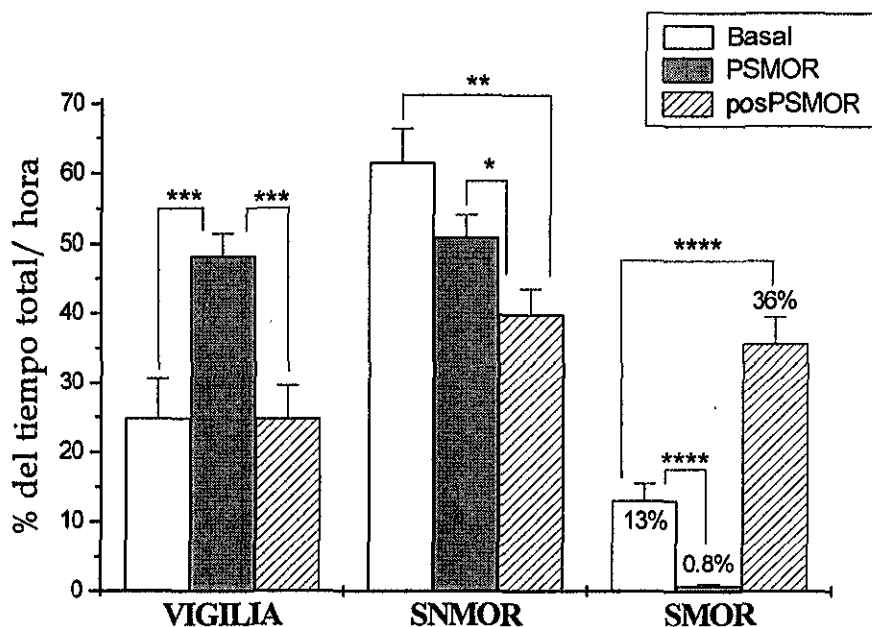


Figura 2. Hipnogramas representativos donde se observa el efecto de la estancia por 96 h sobre la plataforma de privación selectiva de sueño MOR. En el panel A se observa el curso de las fases durante su registro basal. En B se muestra que ocurrió mientras que el animal permanecía sobre la plataforma de 33 cm² mientras que en C aparece el hipnograma del animal inmediatamente después de terminar su periodo de estancia sobre la plataforma. En los ejes de las abscisas está representado la hora del día en que se realizó el registro. Nótese que durante la privación, además de la casi total supresión de SMOR se observa un incremento en los episodios de vigilia. Mientras que durante el sueño recuperativo, la frecuencia de episodios de SMOR aumenta muy ostensiblemente.

Por el contrario las condiciones impuestas por una superficie de tan sólo 33.2 cm², es decir 82 % menor, afectaron profundamente la expresión normal del ciclo sueño-vigilia tanto durante las mismas como después de la estancia finalizó (fig.2, 3, 4 y 5).

Por ejemplo durante el periodo sobre la plataforma, el porcentaje del tiempo dedicado a la vigilia se incrementó casi al doble ($25 \pm 6\%$ antes vs. $48 \pm 3\%$ durante) (fig.3). Esto se debió fundamentalmente a que la constante estimulación vestibular, las obligaba a despertarse para así reajustar su postura. Así ratas de ese volumen corporal, se vieron imposibilitadas de recostarse horizontalmente para descansar sobre alguno de sus costados. En esta postura se encorvaron en sentido vertical para tratar de adecuar su superficie de sustentación al tamaño de la plataforma. Sin embargo su principal sustentación durante esta postura no fué el piso sino que dependieron todavía en lo fundamental del mantenimiento de tono en sus músculos antigravitatorios. Cuando este tono se perdió a medida que avanzaba el sueño NMOR o incluso cuando desapareció totalmente durante el sueño MOR, su propio peso las hizo caer irremediamente. Esta caída casi siempre se detuvo rápidamente, reasumiendo la postura antes mencionada. Esto no sólo fue observado innumerables veces durante el registro, sino que rara vez se encontraron a los animales mojados al momento de iniciar los dos periodos de descanso diarios; lo que indicó que por lo menos también durante el tiempo previo a esta maniobra, las ratas seguían manteniendo el equilibrio precario sobre estas plataformas estrechas.

Ya que la corrección postural no podía realizarse de forma casi automática como normalemente ocurre, es decir, sin tener que romper la continuidad del sueño, las ratas tuvieron que desarrollar un grado de alertamiento que no sólo desincronizaba su actividad cortical a cada momento sino que las más de las veces, demandaba la apertura de los ojos para situarse en el espacio para luego darse una conducta de reposicionamiento. En esta, los animales volvían a plantarse sobre la plataforma, giraban en torno a ella y finalmente se posicionaban al encontrar de nuevo buena sustentación. Se observó que a medida que el desbalance era mayor, mas elaborada era esta conducta, permaneciendo por tanto tiempo despiertas. Esto era particularmente ostensible cuando la rata se mojaba ya que primero ocupaba tiempo en acicalarse para luego buscar postura.



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Figura 3. Porcentaje del tiempo total por hora de cada estado de vigilancia antes, durante y después de permanecer por 96 h sobre una superficie de 33.2 cm². Las barras de dispersión son los errores estándar. Se puede notar que durante la privación (PSMOR) la vigilia aumenta muy significativamente mientras que el SMOR se reduce casi a cero. Durante el sueño recuperativo (posPSMOR), el SNMOR se reduce para dejar su lugar al rebote de SMOR mientras que la vigilia retorna a la basal.

Es muy factible que el "tipo" de vigilia que aumentó haya sido específicamente como la que se acaba de describir y no otra caracterizada por conductas más elaboradas. Esto se sustenta al considerar que el aumento del tiempo total se dió concomitantemente con una tendencia a reducir la duración promedio de estos episodios. Así se decrementó el promedio de duración de los episodios de vigilia de 222 ± 60 seg. a 157 ± 16 (Fig 4). Suena lógico proponer que conductas más elaboradas requieran más tiempo para efectuarse y no al revés. Sin embargo algo que lo sugirió con más fuerza fue el aumento enormemente significativo en la frecuencia de los despertares. Esta frecuencia se fue al doble de lo normal. Usualmente la ratas a esas horas, despiertan en promedio 5 ± 0.5 veces por hora contra las 12 ± 1 ($p < 0.00001$) que lo hicieron durante la estancia sobre la plataforma (fig.5). Dado que los registros se hicieron dentro de la cámara sonoamortiguada además de que ya estaban habituadas al ambiente del tanque, no se me ocurre otra razón por la cual tuvieron que despertarse literalmente a cada 5 minutos. En resumen se puede decir que las ratas bajo estas condiciones estuvieron cuantitativamente más despiertas pero no así cualitativamente. Claro está que como las anteriores mediciones (y observaciones) fueron hechas sólo cuando las ratas estuvieron en el registro polisomnográfico (4h por la tarde), no se puede saber qué ocurrió con la vigilia durante la noche. Lo anterior cobra relevancia porque es en este periodo, que de forma fisiológica están cuantitativa y cualitativamente más despiertas¹⁹⁴.

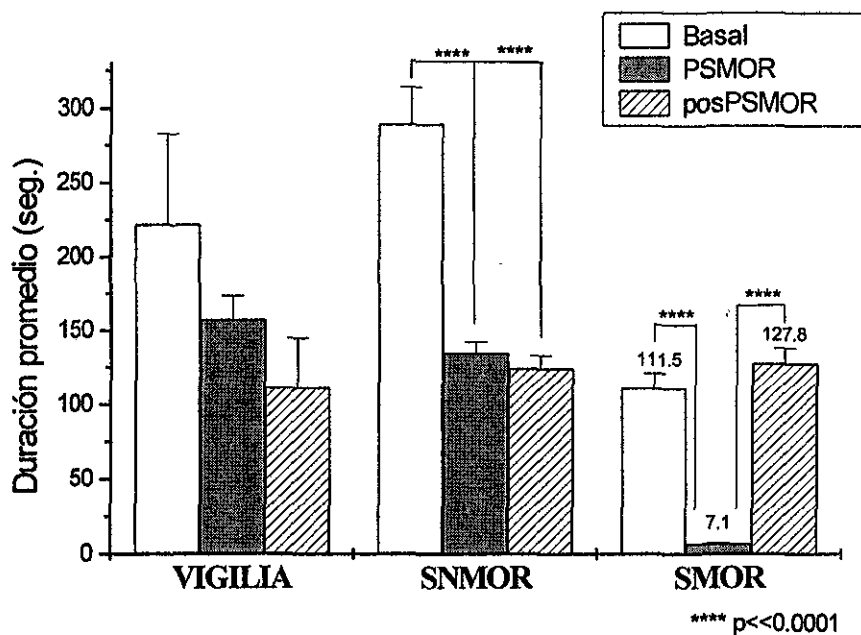
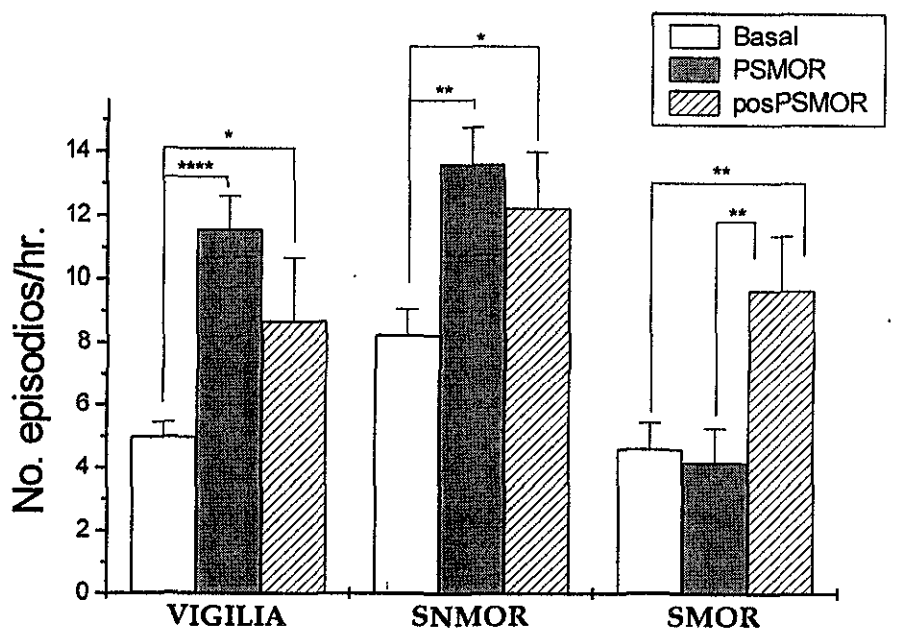


Figura 4. Duración promedio de los episodios de cada fase durante las tres condiciones experimentales. Las barras de dispersión representan de nuevo el error estándar. Nótese como durante la privación señalada como PSMOR, ocurre una reducción en todos los casos. Este fraccionamiento se mantiene para la vigilia y el sueño NMOR durante el sueño recuperativo (posPSMOR) mientras que para el SMOR, se retorna al valor basal.

Estas caídas reiteradas no sólo impusieron una sobredemanda sobre este tipo muy simple de vigilia sino también produjeron cambios en la expresión normal del sueño. Así se redujo a más de la mitad la duración promedio del sueño NMOR (fig.4). Durante los registros en las jaulas, el SNMOR se prolongó en promedio 290 ± 25 seg, mientras que sobre la plataforma pequeña sólo duró 124 ± 9 seg ($p < 0.0001$). Esto sin duda también motivado por la estimulación vestibular durante las caídas. No obstante, el aparato homeostático del sueño pudo compensar esta pérdida en duración al favorecer la entrada rápida al sueño después de los episodios de desbalance. Las ratas se durmieron con una frecuencia casi dos veces mayor que de costumbre (14 ± 1 vs. 8 ± 1 veces/h) (fig.5). Esta facilitación de la somnolencia produjo que el tiempo total de SNMOR no fuera significativamente diferente respecto a la condición basal (fig.2).



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.00001$

Figura 5. Frecuencia de aparición por hora de cada fase. Las barras de dispersión son igualmente los errores estándar. Nótese como durante la privación aumentan los despertares pero igualmente aumenta la somnolencia; entendida ésta última como el número de entradas al sueño. Mientras que durante el estado posprivacional, en todos los casos aumenta significativamente el número de entradas a todos los estados de vigilia.

Como era de esperarse, la superficie de apoyo tan reducida impidió que la rata pudiera expresar el SMOR casi en lo absoluto (fig.2 y 3). Este se redujo en un 96 % (13 ± 2 vs. $0.8 \pm 0.2\%$). Además el desbalance postural produjo que los episodios de SMOR solo se mantuviera en promedio por 7 ± 4 seg contra los 111 ± 76 seg. registrados cuando no había impedimentos para que se relajaran adecuadamente ($p < 0.0001$)(fig.4). Algo muy interesante es que no se pudo observar un fenómeno compensatorio de aumento de frecuencia. Las ratas siguieron entrando en promedio a SMOR con la misma frecuencia a como lo hacían dentro de sus jaulas (fig.5). Sin embargo creo este promedio es una descripción inexacta de lo que sucedió. Ya que de ser así se concluiría que la presión de entrada a SMOR no existe o lo que es lo mismo, sólo se da cuando hay condiciones para la expresión plena del SMOR en el rebote. Si se observa con más cuidado la figura 2 se puede apreciar que los intentos de entrar a sueño MOR no se dieron de manera regular a lo largo del registro como sucedió durante la línea base (panel A). Por el contrario estos parecen agruparse en cúmulos durante la segunda mitad del registro. Durante este momento su frecuencia de aparición es muy similar a lo que va a prevalecer durante el rebote (panel C). De modo que aunque en promedio no hay diferencias, a la luz del hipnograma no hay duda de que la presión aumentada de SMOR ahí está. Asimismo sólo se contabilizó las entradas a sueño MOR en el caso de que los animales pudieron lógicamente mantener una postura que les permitiera tener algunos segundos esta etapa de sueño. De este

modo no se puede saber en cuántos casos muchos de los episodios de caídas durante el sueño corresponderían a entradas a sueño MOR pero que la estimulación vestibular era de tal grado que no les permitió expresar literalmente ni un segundo de sueño MOR.

En resumen las condiciones impuestas por la estancia prolongada sobre una reducida superficie de sustentación junto con un foso de agua circundante, producen una estimulación vestibular repetida que a su vez genera una sobredemanda sobre la vigilia en donde funcionan los mecanismos que van a mantener la postura. Asimismo es muy factible pensar que esta sobredemanda causa como respuesta una somnolencia mayor así como una mayor presión de entrada a SMOR. Esto último al estar impedido casi totalmente la expresión normal del SMOR. Sin embargo ambos procesos guardaron siempre una posición subsidiaria con respecto a la sobredemanda de vigilia (al menos durante el periodo estudiado). Así bien se podría decir en términos sencillos que las ratas ante las condiciones impuestas, optaron por dormir mal pero sin huesos rotos.

Ahora bien una vez que se les permitió dormir nuevamente en el ambiente sin restricciones de sustentación, el panorama del patrón sueño-vigilia se recompuso de nuevo. La vigilia paradójicamente regresó exactamente a su valor basal en porcentaje de tiempo por hora (25 ± 5 %)(fig.3). Uno podría esperar que después de la enorme sobredemanda, el mecanismo de homeostásis la redujera ostensiblemente por debajo de la basal. Estos cambios efectivamente se dieron pero no se pudieron detectar en un valor "grueso" como lo es el tiempo total, sino que aparecieron a un nivel de análisis más fino. No obstante se debe consignar el hecho intrigante de que la compensación de sueño no se puede dar a expensas de reducir la vigilia total por debajo del valor basal. Por el contrario se da modificando la estabilidad de la vigilia pero sobretudo al sueño mismo (ver adelante). Así la duración promedio de los episodios de vigilia se redujeron aún mas que durante la PSMOR (fig. 4). No se puede detectar diferencia significativa con respecto a el valor basal porque durante este la dispersión fué enorme. Sin embargo la gráfica muestra una tendencia clara a la reducción. Ahora bien, aunque se redujo el promedio de duración en contraposición también aumentó la frecuencia (fig.5). Este aumento no fué sin embargo tan importante como para la privación ($p < 0.05$). Incrementó un 80% comparado con el 140% en el caso de la PSMOR (9 ± 1.5 vs 5 ± 0.5 epi/h). Sin embargo una análisis de distribución de frecuencias vs. duración, indicó claramente que lo que aumentó bastante fueron sólo episodios que duraron menos de 50 seg, sobre todo aquellos de menos de 25 seg. Igualmente en el comparativo de los hipnogramas se observa que los episodios aumentados de vigilia son de breve duración y más importante son precedidos frecuentemente por episodios de sueño MOR o bien que cortan la continuidad del SNMOR. Así pues esta vigilia que se mantiene en el valor basal es sin embargo estructuralmente distinta a la vigilia basal. Esta menos consolidada y parece ser una consecuencia derivada del aumento de sueño MOR. Es como si fuera la inercia del patrón anterior (ver panel B, segunda parte). Es también conductualmente muy simple, muy al estilo de la privación ya que durante la observación conductual se vió que los animales ejecutaban preferentemente cambios de postura o a lo más, de sitio de reposo (quizá por eso fueron de menos de 50 seg.)

Con respecto al SNMOR, la situación es algo curiosa. Su tiempo total siguió reduciéndose (fig.3). Ahora sí muy significativamente con respecto al basal pero también con respecto a la privación (40 ± 4 vs $61 \pm 5\%$). Esto se debió fundamentalmente a que se conservó el valor promedio reducido de la duración de los episodios (fig.4). Es decir permaneció con el patrón del periodo anterior indicando también una especie de inercia en la arquitectura del sueño. Igualmente la frecuencia se mantuvo significativamente alta con respecto a la basal ($p < 0.05$) pero sin cambio respecto a la condición anterior (fig.5). Sin embargo conjuntando ambos cambios ahora sí se redujó el tiempo total. Así pues este tipo de sueño no regresó a su patrón basal porque por un lado siguió presionando a la vigilia con somnolencia incrementada (mayor frecuencia) y además ahora fué abreviado tanto por el surgimiento del rebote de sueño MOR como por el residuo de la vigilia (menor duración). Incluso durante este momento, ya se creó una deuda de sueño NMOR pero paradójicamente no debido a una sobredemanda de vigilia, sino causada preferentemente por la sobreexpresión del sueño MOR. Es factible suponer que más adelante cuando el rebote de sueño MOR termine, el SNMOR se normalice al consolidarse en su duración. Sin embargo esta etapa ya no fué estudiada.

Finalmente se encontró que conforme a lo esperado, el sistema de regulación homeostática llevó al SMOR a una condición de sobreexpresión. En porcentaje llegó a ocupar el 36% del tiempo total de registro. Esto es, se incrementó un 176%. De hecho no hubo diferencia significativa al compararlo con el tiempo total del SNMOR. Ambos tipos de sueño estaban contribuyendo casi equitativamente al 75% del tiempo total de sueño, que es el valor normal para estos animales durante estas horas. Esta sobreexpresión se dió fundamentalmente al aumentar a más del doble la frecuencia de aparición (4 ± 1 a 10 ± 2 veces por hora) mas no así la duración promedio. Esta tuvo un valor algo mayor pero definitivamente no significativamente mayor con respecto a la basal (128 ± 11 seg vs. 111 ± 10 seg.NS). En este sentido llegaron a observar episodios de SMOR de tipo narcoléptico, es decir, que siguieron a la vigilia. Otro cambio que se observó fué un incremento en la intensidad de las mioclonias del SMOR.

En síntesis el rebote de SMOR se dió en una parte debido al espacio dejado por la vigilia. Esta etapa se redujo fuertemente por la somnolencia incrementada pero la más importante ocurrió al acotar, él mismo al SNMOR. Para llevar a cabo esto se valió del incremento en la reactividad del mecanismo de disparo mas que del aumento en su estabilidad.

Finalmente hay que señalar que estos animales también estaban canulados en el NGC. No obstante por los resultados obtenidos en el grupo de la plataforma de 188 cm^2 , es claro que los efectos que se obtuvieron en el grupo de la plataforma de 33 cm^2 no puede atribuirse a la cánula sino fundamentalmente a la plataforma. Asimismo los estudios *post mortem* indicaron que efectivamente la cánula se insertó dentro de las fronteras del NGC (fig 6).

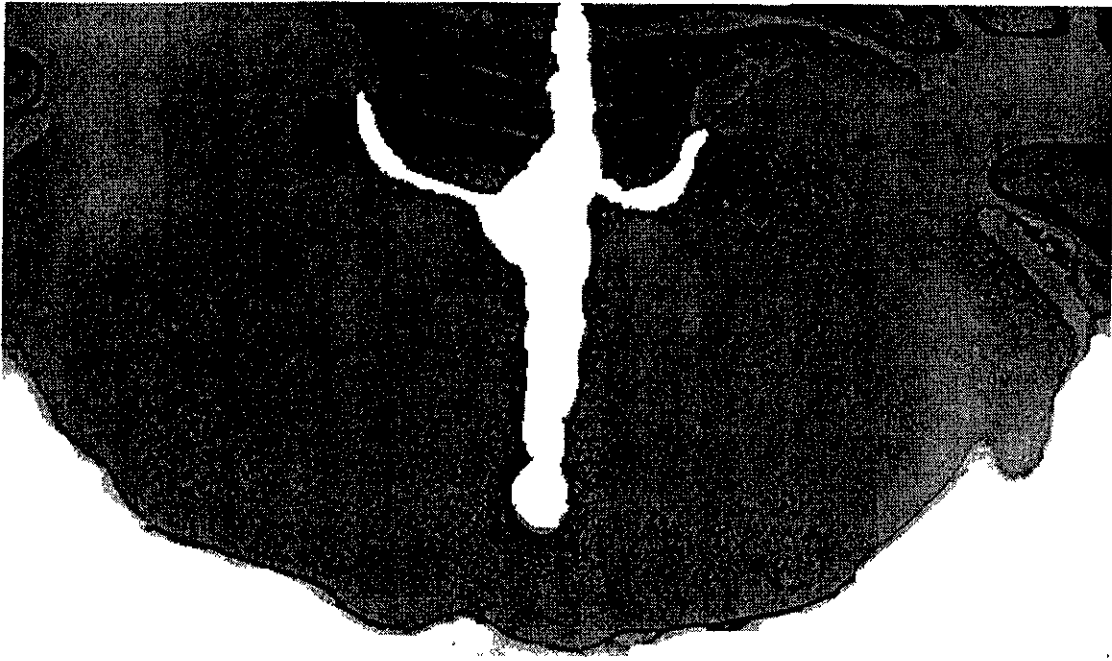


Figura 6. Fotomicrografía representativa del tracto de la cánula metálica. En esta se puede observar como la cánula dejó un hueco en la región correspondiente al NGC. Obsérvense algunas gigantocélulas en la parte contralateral. Asimismo aparece la rodilla del nervio facial que indica que el corte está a una anteroposterioridad de 11.0 tomando como referencia bregma. Esto lo sitúa a nivel de la unión pontobulbar.

Efectos de la PSMOR sobre la liberación de serotonina así como su principal metabolito

Primeramente es importante mencionar que los estudios *postmortem* realizados a los cerebros de estos animales mostraron que la parte activa de las sondas de microdiálisis se ubicaron en todos los casos dentro de las fronteras del núcleo reticular gigantocelular (fig.7). Además en algunos casos también se procedió a llevar a cabo una prueba funcional de la posición de la sonda en el NGC. Esta consistió en que después de la recolección de muestras, se infundió mediante el líquido de diálisis, carbacol durante 30 minutos. Al respecto se señala que el carbacol tuvo un efecto de alertamiento casi inmediato sobre la actividad eléctrica cortical (fig.8). Los animales cambiaron su patrón sincronizado a un patrón de vigilia. Asimismo mostraron signos conductuales correspondientes a este estado. El efecto de alertamiento se mantuvo en tanto se siguió perfundiendo el agonista colinérgico de manera que las ratas no pudieron volverse a dormir ni siquiera brevemente. Sin embargo este alertamiento desapareció poco después que se dializó con CSF sin carbacol. Los animales en este caso reasumieron su patrón de sueño-vigilia previo a la infusión del carbacol. Estos resultados demuestran que las sondas se ubicaron dentro del NGC ya que el efecto alertador es el mismo que se ha reportado en el gato en el caso de microinyecciones con este agonista colinérgico⁶.

Por otro lado se menciona que en todos los casos el pico cromatográfico de la serotonina salió minutos después de su principal metabolito como está previamente reportado (fig.9). Asimismo la liberación basal de serotonina en el NGC estuvo en el orden de 21 ± 11 fmol/5uL (Tabla 1). Esto representa una concentración de 4.2 NMOL. Por lo que respecta a los niveles basales de 5-HIAA estos fueron 16 veces superiores a los medidos para su precursor, es decir 68.2 NMOL. Esta enorme predominancia de la excreción sobre la liberación del neurotransmisor se mantuvo para todas las situaciones experimentales. Incluso para los casos de la PSMOR o del sueño recuperativo, la diferencia en la excreción fué de dos ordenes de magnitud mayor que la liberación (770 veces para PSMOR y 588 para la recuperación). Esto definitivamente no se trata de un artefacto, ya que los ensayos *in vitro* mostraron que ambas indolaminas son casi igualmente permeables a través de la membrana de diálisis (14% para 5-HT y 16% para 5-HIAA). De modo que se trata mas bien de un hecho fisiológico muy interesante.

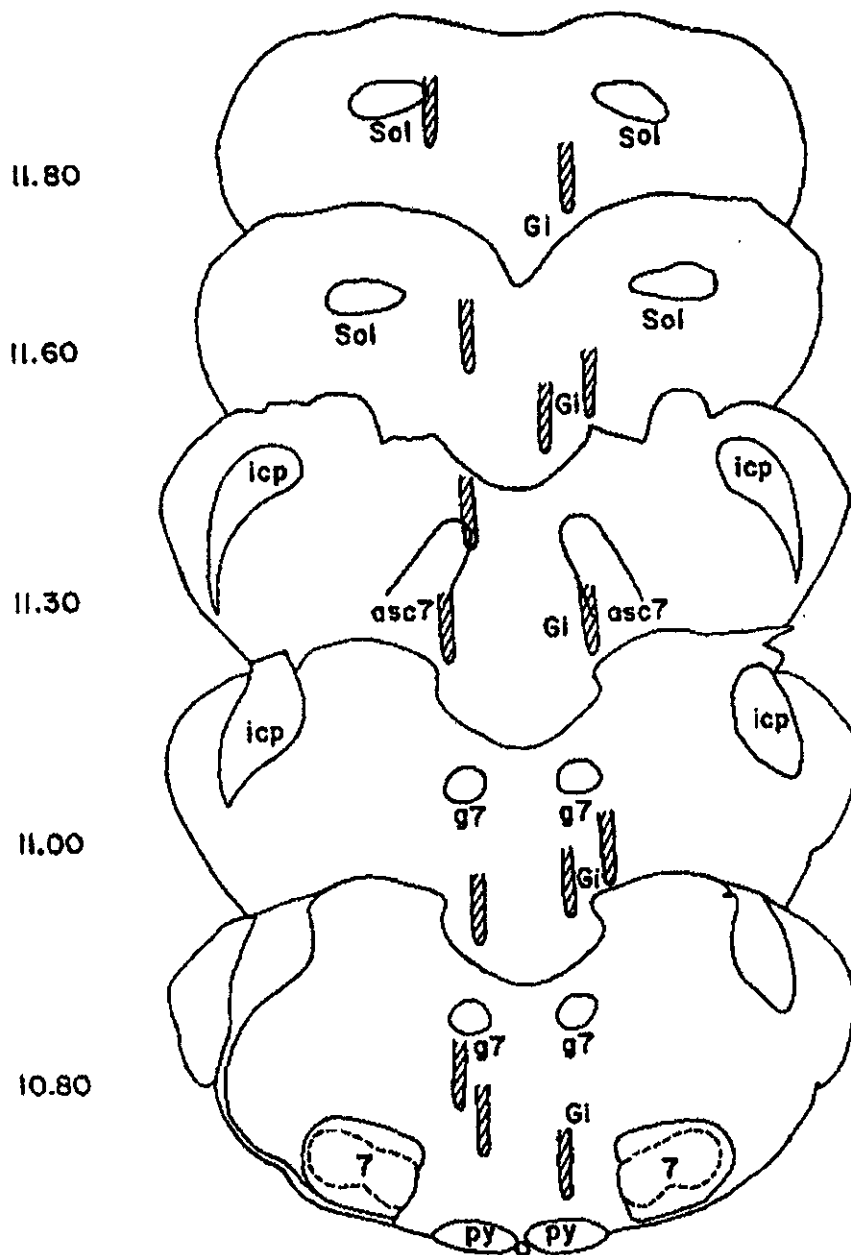


Figura 7. Ubicación anatómica de los tractos de las partes activas de las sondas de microdiálisis utilizadas en esta tesis. Los esquemas representan cortes de tallo cerebral desde la parte media del bulbo raquídeo (esquema superior) hasta a nivel de la unión bulbo-pontina (esquema inferior). El cerebelo fue omitido por motivo de espacio, no obstante se utilizó también como referente anatómico para la ubicación de las sondas. Asimismo muchas estructuras de referencia no aparecen delineadas en los esquemas por motivos de simplificación de la información. Los números de referencia del lado izquierdo son las coordenadas antero-posteriores a partir de bregma tomadas del atlas de Watson & Paxinos (1992). Sol=Núcleo del tracto solitario, Gi=Núcleo reticular giganteocelular, icp=pedúnculo cerebeloso inferior, g7=rodilla del nervio facial, 7=núcleo del nervio facial, py=tracto corticoespinal, asc7= raíz ascendente del séptimo nervio.

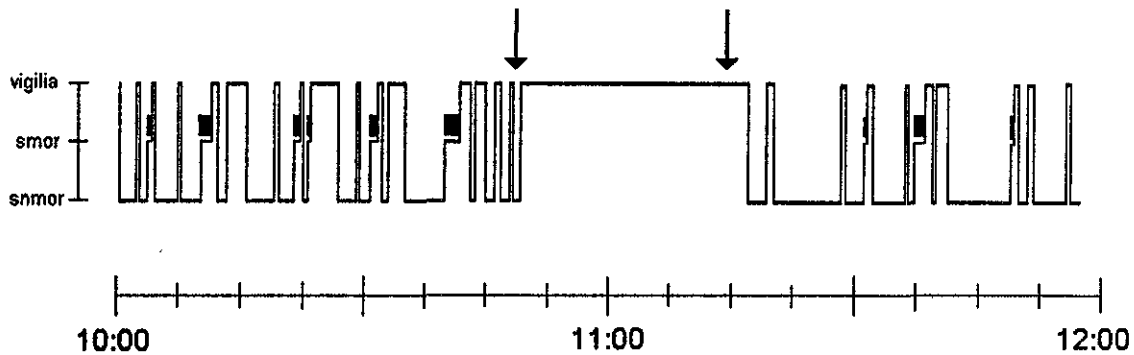


Figura 8. Hipnograma donde se muestra el efecto de la perfusión mediante la sonda de diálisis, de carbacol 50 mM en el NGC de la rata. El inicio y terminación de la infusión se señalan con flechas. El eje horizontal señala la hora del registro.

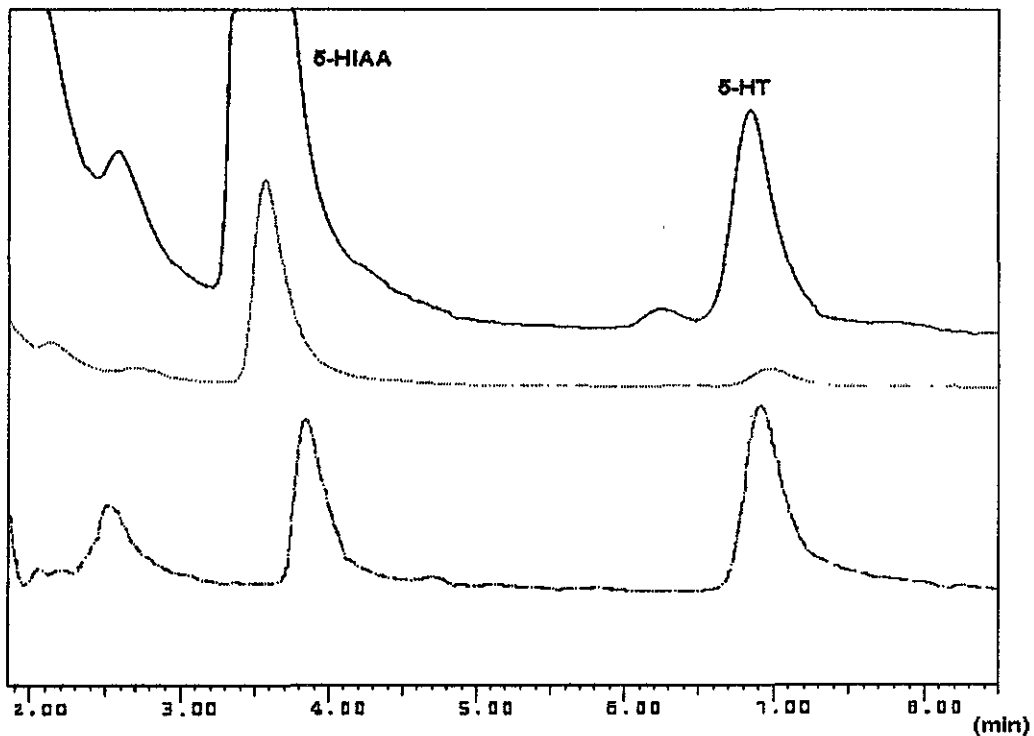


Fig 9. Comparativo entre cromatogramas de muestras y estándares de referencia externos. Los dos primeros cromatogramas representan dos diferentes muestras experimentales. El superior fué una corrida de una muestra basal mientras que el de enmedio fué de una rata durante la PSMOR. El cromatograma inferior fué una inyección que contenía una mezcla de estándares de serotonina así como 5-HIAA (25 fmol/cu). Notese cómo coinciden los tiempos de aparición entre las muestras y estos estándares. Asimismo cómo la PSMOR disminuye la altura de ambos picos. El eje horizontal representa el tiempo de retención.

Ahora bien como lo detalla la tabla 1, se encontró que durante las últimas horas de la estancia crónica sobre la plataforma pequeña, las concentraciones de serotonina pero también del 5-HIAA estuvieron disminuidas respecto a las de la línea base. Para el caso de la serotonina, la disminución fue verdaderamente importante (>1000%) mientras que para el metabolito fué de sólo un 32%. Esto demuestra que los mecanismos responsables por un lado de la síntesis-liberación y por otro de la degradación-excreción no fueron igualmente afectados por la PSMOR. Los primeros fueron severamente reducidos ($p < 0.0001$) mientras que los segundos en menor magnitud ($p < 0.05$).

	SEROTONINA		5-HIAA	
BASAL	21.26 ± 2.21 (23)		340.8 ± 29.7 (38)	
PSMOR	0.23 ± 0.02 (24)	$p < 0.0001$	230.6 ± 18.6 (14)	$p < 0.05$
RECUPERACION	1.07 ± 0.41 (20)	$p < 0.0001$	588.2 ± 63.3 (51)	$p < 0.01$
P. CONTROL	20.32 ± 3.12 (18)	NS	345.3 ± 32.1 (29)	NS

Tabla 1. Concentraciones de serotonina y 5-HIAA en microdializados del NGC en tres diferentes condiciones experimentales. Los datos son promedios ± erros estándar (N) y estan expresados en concentración relativa como fmol/ 5µL. Todos los valores de probabilidad fueron comparados con respecto al valor basal por medio de una prueba "T" para muestras independientes.

Igualmente la tabla nos muestra que durante las primeras horas del rebote de sueño MOR, la liberación de serotonina aumentó un poco respecto a la condición previa pero de ningún modo se asemeja al valor basal. Así la liberación de serotonina siguió disminuida en un porcentaje bastante alto (96%). Este valor tan bajo indica que prácticamente no se estaba liberando serotonina en el NGC durante el rebote de sueño MOR.

Por el contrario, se encontró que la excreción de 5-HIAA estaba aumentada no sólo respecto a la PSMOR, sino también comparado con el valor basal. La excreción aumentó un 72% por arriba de la línea base. Otra vez se observó que la liberación de serotonina es hasta cierto punto independiente de la excreción de su principal producto degradativo.

La excreción de 5-HIAA durante las fase del ciclo sueño-vigilia

En animales sin manipulación de sueño se observó que la concentraciones promedio del principal metabolito de la serotonina son mayores durante la vigilia, menores durante el SNMOR y alcanzan su nivel más bajo durante el sueño MOR (Tabla 2). Considerando a la vigilia como el 100%, durante el SNMOR la excreción se reduce al 76% mientras que en el sueño MOR baja mas aún hasta alcanzar el 48% de su valor. Sin embargo desde el punto de vista estadístico no hay diferencia suficiente entre la vigilia y el SNMOR ($p = 0.062$). Es muy probable que con una N mayor esta diferencia se vuelva significativa. Sin embargo por lo que respecta al sueño MOR, hay diferencias significativas tanto con la vigilia como así también con el SNMOR. Por tanto no hay duda que durante el sueño MOR, la excreción de 5-HIAA es mínima.

FASE	Media	Error std.	N	
VIGILIA	90.4	7.6	18	
SNMOR	69.2	7.9	19	NS
SMOR	43.5	5.4	11	*vs SNMOR **vs VIG

Tabla 2. Concentración de 5-HIAA en dializados del NGC en cada fase del ciclo sueño-vigilia. El flujo de diálisis fue de 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ por lo que esta concentración es menor a lo mostrado en experimentos anteriores. * $p=0.030$, ** $p=1.7 \times 10^{-4}$.

Es importante señalar que se reportan los datos solo de 5-HIAA ya que al aumentar la velocidad de diálisis y con esto obtener muestras puras correspondientes a cada uno de los estados de vigilancia (sobretudo esto vale para el SMOR), ya no se pudo obtener buena recuperación de serotonina. Esto se debió a que como ya se explicó en la introducción, la recuperación de una sustancia decrece logarítmicamente en función de la velocidad de diálisis. Este hecho necesariamente condicionó que me preguntará que tan representativo es la concentración de 5-HIAA de la liberación de serotonina en animales sin manipulación de sueño.

Ahora bien los datos conjuntos de la dinámica de liberación/excreción obtenidos sin ninguna manipulación de sueño a menor velocidad de perfusión (1 $\mu\text{L}/\text{min}$) muestran que la asociación entre ambos procesos es muy estrecha en animales sin manipulación de sueño. Como muestra la figura 10, en el 91% de los casos las variaciones fisiológicas de la concentración de serotonina y 5-HIAA cursan en estrecho paralelismo. Es decir más liberación, más excreción y viceversa.

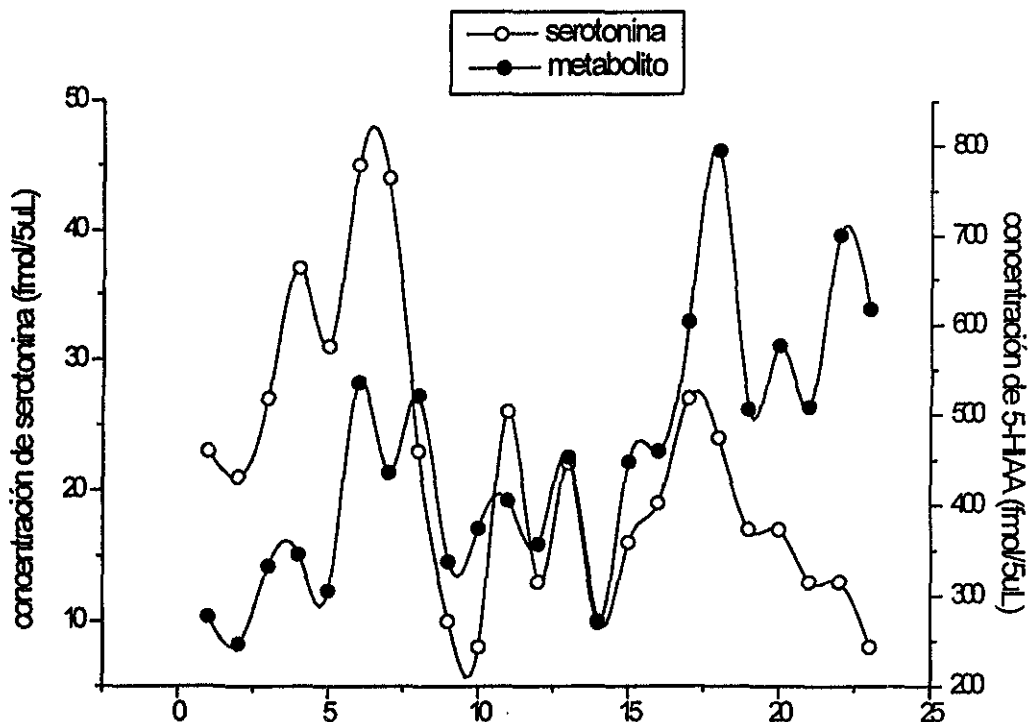


Figura 10. Dinámica de las variaciones de la concentración de serotonina y 5-HIAA en animales sin manipulación de las fases de vigilancia. Esta composición proviene de agrupar 4 animales. Cada par de puntos (5-HT/5-HIAA) fueron obtenidos de la misma muestra pero analizados en corridas cromatográficas separadas. Esto por la diferencia en magnitud de las corrientes de oxidación respectivamente generadas por cada compuesto. Nótese como las variaciones fisiológicas de la serotonina son seguidas por la de 5-HIAA.

Aún mas la perfusión de líquido de diálisis libre de calcio tuvo efectos profundos tanto sobre las concentraciones de serotonina como las de 5-HIAA en los dializados del NGC (fig. 11). La liberación de serotonina decreció un 70 % de su valor basal, desde la primera muestra y así se mantuvo en tanto no hubo calcio en el líquido de diálisis ($p=3.18 \times 10^{-5}$). Sin embargo este cambio desapareció en cuanto se restableció el catión. Esto demuestra que la serotonina encontrada en los dializados es calcio dependiente. Asimismo la falta de calcio en el CSF también fué capaz de reducir la excreción del principal metabolito de la serotonina. Sin embargo en este caso el efecto no fue tan profundo aunque si fue estadísticamente significativo ($p=0.005$). Las concentraciones de 5-HIAA se redujeron en promedio un 35% del valor basal. Igualmente a como sucedió con la 5-HT, estas regresaron a sus valores previos en cuanto se adicionó el calcio.

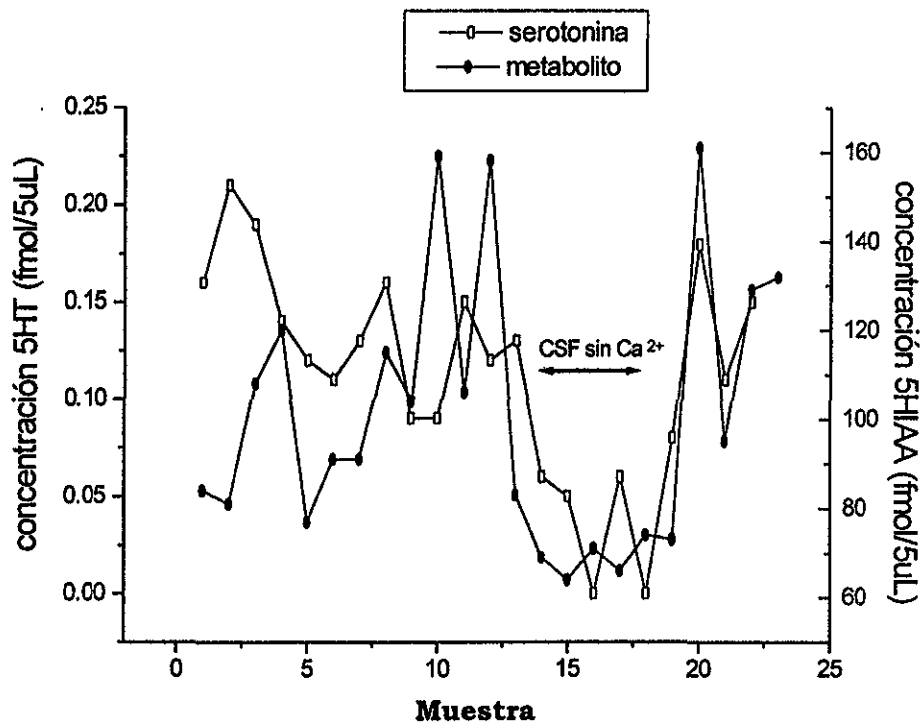


Figura 11. Efectos de la substracción transitoria del calcio del líquido de diálisis sobre las concentraciones de serotonina y 5-HIAA. En el eje horizontal se representa el número de muestra. El periodo durante el cual se cambio el líquido de diálisis a un CSF sin calcio esta acotado por la raya con flechas. Obsérvese cómo en cuanto se quita el calcio, las concentraciones se vienen abajo.

Estos últimos dos resultados, es decir el estrecho paralelismo entre el nivel de excreción de 5-HIAA y la liberación de 5-HT junto con el descenso simultáneo de ambos compuestos inducidos por la diálisis sin calcio, son pruebas de que la concentración extracelular de 5-HIAA es un buen reflejo del grado de liberación de 5-HT en animales sin manipulación de sueño. De este modo hay mas certeza en afirmar que la liberación de 5-HT a nivel del NGC debe ser muy probablemente también mínima durante el SMOR como se consyató para el caso del 5-HIAA.

DISCUSIÓN

Los principales resultados obtenidos son los siguientes:

1. La liberación de 5-HT se encontró significativamente reducida con respecto a la basal tanto durante las últimas horas de la PSMOR como durante el rebote de sueño.
2. En el caso de la excreción de 5-HIAA también se redujo significativamente durante la privación pero en cambio durante el rebote mostró el efecto opuesto.

Según mi hipótesis la baja en la liberación durante el rebote así como la subida en la concentración del metabolito eran ya esperadas. Es así que la baja en la liberación durante el sueño recuperativo permitiría que el rebote tenga lugar tomando en cuenta que: a) la 5-HT inhibe fuertemente al sueño MOR 2) el NGC es una estructura importante para la regulación de este tipo de sueño. Por lo que respecta al aumento en la concentración extracelular de 5-HIAA va de acuerdo a lo reportado en los antecedentes aunque sin embargo es incongruente con otro de los hallazgos aquí presentados. Es decir no concuerda con el estrecho paralelismo encontrado entre la concentración extracelular de 5-HT y 5-HIAA obtenida en animales sin manipulación de sueño. Paralelismo que por cierto previamente han encontrado otros autores^{105,212} aunque otros no^{31,93,123}. Por otro lado no esperaba encontrar una baja en la liberación de 5-HT y 5-HIAA en las últimas 4 h de la privación de SMOR. En su lugar había sospechado la existencia de una mayor liberación de este monoamina durante la PSMOR basado en los estudios de actividad unitaria⁶², bioquímicos⁵ así como los retos farmacológicos¹²⁴ con agonistas 5-HT en animales privados. Incluso esta idea de mayor liberación de 5-HT es congruente con el papel antidepresivo que se ha observado después de la privación de sueño. Como se sabe muchos de los antidepresivos clínicamente utilizados funcionan a base de reforzar la transmisión 5-HT, ya sea inhibiendo su recaptura o bien bloqueando su degradación¹⁵⁹.

A continuación voy a intentar explicar cada una de estas congruencias e incongruencias. En primera instancia hay que comentar que infortunadamente no me es posible apoyarme en otro trabajo como réplica de estos datos. Hasta donde se, la presente investigación es la primera que ha estudiado la concentración extracelular de 5-HT con relación a la privación de sueño MOR. No obstante basándome en los mismos antecedentes directos de este trabajo así como en otros trabajos cuya relación con este no es tan obvia, intentaré darle sentido en primer lugar a la disminución de la concentración de 5-HT durante las últimas horas de la PSMOR.

EL DESCENSO DE LA TRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA DURANTE LA PRIVACIÓN DE SUEÑO MOR

Primeramente debo mencionar que no todos los trabajos que estudiaron el nivel de actividad unitaria de células dentro del rafe, mostraron incrementos de este factor después de la privación¹⁴⁵. Sin embargo estos no los consideré muy relevantes por haber estado hechos en animales bajo anestesia. Es mas Mallick BN y cols. (1983)

señalaron que las células "REM-off" del área del *locus coeruleus-subcoeruleus*, decrementan su tasa de disparo a lo largo de la PSMOR. En este sentido hay que considerar que tanto las células 5-HT del rafe dorsal como las noradrenérgicas del *locus coeruleus*, comparten el mismo patrón de disparo tipo "REM-off". Mas importante aún se conoce^{8,67,88} que no todas las células dentro de los núcleos del rafe son serotoninérgicas. De modo que no es descabellado suponer que las células que incrementaron su actividad con motivo de la privación, pudieron no ser precisamente las tipo 5-HT "REM-off". Se debe entender que es este tipo particular de células, las que verdaderamente importan tanto para la liberación 5-HT estado-dependiente como también para la inhibición del sueño MOR. ¿Si no eran 5-HT "REM-off" que pudieron ser? Yo creo que pudieron ser interneuronas inhibitorias GABAérgicas.

Al respecto es pertinente traer a discusión los datos obtenidos en los estudios de inmunomarcaje para la proteína FOS realizados con relación a privación^{119,141} o inducción de SMOR con carbacol^{169,217}. En efecto según estos reportes se ha encontrado mayor marcaje dentro del rafe después de la PSMOR. Lo mismo se vio con la aplicación de carbacol a la formación reticular medial pontina, que por cierto también induce un rebote importantísimo de sueño MOR como lo hace la PSMOR. Esta señal de activación es creo yo a todas luces inconsistente con la hipótesis que propone a la 5-HT como inhibidor tónico de el sueño MOR. Si no ¿cómo es posible que células 5-HT estén mas activas en momentos en que la presión para iniciar el SMOR es muy grande? Yamuy y cols. (1995) se hicieron esta misma pregunta y demostraron que estas células del sistema rafe FOS reactivas no son serotoninérgicas. De tal modo tanto antes como después de la inyección de carbacol, existe el mismo número de células 5-HT-FOS reactivas pero en cambio esta maniobra aumenta enormemente el número de aquellas reactivas a FOS pero que no son 5HT. Al respecto estos autores especulan que estas células pudieran ser interneuronas GABAérgicas que se activan precisamente con la finalidad de inhibir a las 5-HT y de este modo permitir la generación del rebote de sueño MOR. Además existe buena evidencia que indica que la transmisión GABAérgica, no sólo a nivel del rafe dorsal^{103,130} sino también a nivel del hipotálamo posterior^{86,160}, constituye un efectivo medio facilitador para la generación del sueño MOR. En conclusión aunque no se puede descartar que durante las primeras 24 h de PSMOR en efecto la actividad 5-HT esté aumentada también es probable que posteriormente esta actividad sea apagada por interneuronas inhibitorias GABAérgicas.

Adicionalmente también es posible construir una buena explicación para esta baja serotoninérgica hallada en el NGC durante la PSMOR, utilizando los resultados de estudios que han reportado una serie de alteraciones en la conducta de las ratas motivadas por la PSMOR. Entre estas modificaciones se encuentran la hiperfagia, la hiperagresividad, la hiperalgesia así como la hiperactividad. En cada una de estas conductas, la 5-HT participa además como un importante modulador en el sentido negativo, es decir, es un inhibidor.

A continuación se intentará demostrar como una baja muy importante en la liberación de esta indolamina puede estar detrás de cada una de estas modificaciones conductuales. Es mas quizá la alteración 5-HT sea el elemento que pueda vincular todos estos efectos de manera fisiológica. Por supuesto no pretendo explicar todas estas alteraciones postprivacionales basándome exclusivamente en el decremento de la 5-HT. Estoy bien consciente de que de existir este, también acarrearía un

desbalance con otros neurotransmisores como la noradrenalina, la dopamina o la acetilcolina entre otros como se ha comprobado en los experimentos con p-CPA e insomnio. De modo que no dudo que el cabal entendimiento de estos efectos tiene necesariamente que contemplar el análisis sobre estos otros neurotransmisores. Sin embargo como el tema de esta tesis es fundamentalmente la transmisión 5-HT se debe considerar la necesidad de ceñirse únicamente a esta variable. Así pues comencemos revisando los efectos de la PSMOR en relación a saciedad alimenticia y 5-HT.

Leibowitz y Alexander (1998) proponen que la 5-HT a nivel del hipotálamo medial regula tanto el tamaño como la tasa de alimentación; sobre todo aquella saciedad que involucra la ingestión de carbohidratos. Sin embargo ¿qué pruebas hay de esto? Hay varias por ejemplo la fenfluramina que selectivamente facilita la liberación así como simultáneamente bloquea la recaptura de 5-HT, es una droga que se utiliza ampliamente en clínica como potente anoréxico. Contrariamente la p-CPA²⁰ así como también las lesiones 5-HT selectivas¹⁶² causan tanto hiperfagia como obesidad en ratas. De particular importancia en este efecto facilitador de la saciedad llevado a cabo por la 5-HT, son los núcleos hipotalámicos como el paraventricular, el ventromedial así como también el supraquiasmático. La aplicación de 5-HT o agonistas 5-HT_{1A} a estos sitios produce un potente y selectivo efecto anoréxico¹⁰¹. Adicionalmente hay que comentar que la actividad unitaria¹⁹⁸ así como la concentración extracelular de 5-HT¹⁴⁹ aumentan como resultado de la conducta alimenticia. Ahora ¿cómo se relaciona esto a la PSMOR?

Se ha observado⁵¹ que cuando una rata se le saca de su hábitat usual en la jaula y se le pone ya sea sobre las plataformas control o de PSMOR, deja de comer en un intervalo que va desde 1 hasta 4 días. Este dato describe perfectamente lo que observé en el presente estudio. Es así que en las primeras 48 h, el agua del tanque contenía bolos fecales pero no así residuos de alimentos. Esto me indicó que las ratas dejaron de comer en lo absoluto durante este periodo. Asimismo durante esta etapa inicial fue cuando disminuyó importantemente el peso corporal. Si consideramos lo visto en el párrafo anterior, es lógico deducir que durante esta etapa inicial, la liberación de 5-HT debió de estar muy aumentada especialmente a nivel del hipotálamo medio.

No obstante las cosas cambian radicalmente después de esta primera etapa. De este modo se observa⁵¹ que las ratas comen hasta 30 % mas tanto durante su periodo nocturno normal de alimentación pero sobre todo lo hacen durante el día. En particular comen raciones mayores y de manera mas frecuente. Estos datos muestran que la PSMOR interfiere importantemente tanto con el ciclo circádico normal de consumo de alimentos pero además con los mecanismos normales de saciedad que ponen fin a cada ración independiente. En el mismo sentido noté que conforme transcurrieron los siguientes dos días de la PSMOR, el peso corporal se recuperó en cierto grado. Esto coincidió perfectamente con la presencia de una gran cantidad de residuos alimenticios hallados en el agua del tanque de privación. De este modo se puede argumentar que a diferencia de las etapas iniciales de la PSMOR, durante la etapa "posterior" de la privación, la liberación de 5-HT pudiera estar disminuida a tal grado que los animales tienen severas interferencias en sus mecanismos hipotalámicos de la saciedad de manera que comen mucho mas y mas frecuentemente. Dado que las mediciones de 5-HT que realicé fueron llevadas a cabo

durante la 4 últimas horas de la PSMOR por 4 días y no al inicio de esta así como también por su recuperación de peso, pienso que mis ratas pudieron haber estado cursando ya por la etapa "hiperfágica". Además se me ocurre que esta disminución en los mecanismos de la saciedad alimenticia es parte de la respuesta de los animales ante el incremento en el gasto energético que ya se ha reportado^{13,140} durante la PSMOR. De esta manera si los mecanismos de saciedad de la ingesta de alimentos sumamente energéticos como los carbohidratos están muy disminuidos, esta hiperfagia resultaría muy adecuada para dar la batalla a un creciente gasto de calorías durante la privación. Incluso también se puede considerar que esta hiperfagia es una especie de rebote alimenticio que se da después de la anorexia inicial.

Otro de los aspectos conductuales que se ven profundamente alterados por la PSMOR se refiere al "tono emotivo". Mas específicamente se altera profundamente la agresividad inter e intraespecífica. Hicks y Moore (1979) reportan que 2 y 4 días de PSMOR por el método de la plataforma, reducen los comportamientos relacionados a la sensación de temor en las ratas. Ellos infirieron esta conclusión a partir de medir parámetros como la frecuencia de defecación, excreción urinaria así como la conducta de paralización motora ("freezing") en un ambiente desconocido. Este mismo grupo encontró⁷² además que la PSMOR incrementa en forma tiempo-dependiente, el número de ataques así como la conducta muricida de ratas que previamente no la habían mostrado. Mas adelante también vieron¹³⁷ que esta agresividad no sólo se da en machos sino también en las hembras que naturalmente son menos proclives a expresarla. Otros investigadores^{21,127} también han reportado tales incrementos en la agresividad medidos con otros paradigmas experimentales como la agresión inducida por descargas eléctricas. Si consideramos de forma simplista que el tono emotivo es un continuo entre dos polos que son el miedo y la agresión, se puede decir que varios días de privación de SMOR hacen que el tono predominante se dirija hacia el lado de la agresión aún en animales genéticamente poco predispuestos para manifestarla.

Igualmente en el presente estudio también fue notorio que los animales se mostraran muy agresivos ante la manipulación conforme iba transcurriendo el periodo de privación. Así no fue raro que al final de los 4 días, las ratas intentaran morderte como respuesta ante la manipulación a la que ya previamente se habían habituado semanas atrás. Ahora bien ¿qué relación tiene la conducta agresiva con la transmisión 5-HT?

Existen varios trabajos que señalan que la baja importante en la transmisión 5-HT sobre todo a nivel del cerebro anterior, induce un comportamiento hiperagresivo en las ratas. Por ejemplo la p-CPA genera conducta muricida en ratas de ambos sexos que nunca antes la habían manifestado. Esto sólo ocurre cuando la 5-HT cerebral se encontró^{120,135,193} muy disminuida. Lo mismo ocurrió con la lesión electrolítica¹⁴² o neurotóxica¹⁹⁹ del rafe mesencefálico. Asimismo estos comportamientos desaparecieron cuando se les administró el precursor 5-HTP. Esta reversión sugiere fuertemente que la agresividad se relaciona fundamentalmente al bajo nivel de 5-HT y no al de otras monoaminas. En congruencia con estos datos, hay que comentar además que la inyección sistémica de agonistas 5-HT1A, 5-HT1B y 5-HT2 reducen significativamente el comportamiento agresivo, el de interacción social así como la susceptibilidad emotiva evaluada por conductas como la defecación o el "freezing"¹³¹. De este modo la 5-HT se revela no solo como un potente inhibidor de la conducta alimenticia sino también como un supresor de conductas relacionadas con la

interacción "dominante" hacia el medio que incluye a otros organismos y que se puede manifestar en interacción social destructiva y no destructiva, pero que abarca también la dimensión de la relación con un ambiente desconocido al cual el animal se enfrenta. Mas aún ambos efectos pueden armonizar muy bien en el contexto de la baja transmisión 5-HT. Así se ha visto que por lo menos en relación a la agresión dirigida hacia la obtención de alimento, se incrementa a medida que los animales han sido privados de alimento por mas tiempo¹. De este modo al menos la conducta muricida de las ratas con PSMOR bien pudiera ser calificada como un comportamiento "predatorio" consecuencia de una falla en la sensación de saciedad alimenticia producida por la baja en la transmisión 5-HT.

En síntesis estos últimos trabajos también nos llevan a la conclusión de que la agresividad aumentada reportada después de la PSMOR puede ser una manifestación mas de la baja importante en la transmisión serotoninérgica. Asimismo ya que este aumento va en función del tiempo de privación, es decir a mayor deuda de SMOR mas agresión, me hace pensar que probablemente durante las primeras horas de privación, el nivel de agresividad sea mínimo o incluso si pensamos en mayor transmisión 5-HT, pudiera ser incluso menor a la basal. Así pues resulta interesante investigar el nivel de agresividad durante la experiencia inicial de la plataforma de PSMOR y compararlo con momentos posteriores de esta maniobra experimental.

Ahora bien aunque los anteriores argumentos parecen ciertamente apoyar una baja en la liberación de 5-HT, se puede arguir que tanto la regulación de la saciedad alimenticia así como el incremento de la agresividad e interacción ambiental, aunque moduladas por la 5-HT, esta modulación se lleva a cabo básicamente a nivel de estructuras cerebrales como pudieran ser el hipotálamo, amígdala o el hipocampo. Así pues en ningún caso se garantiza que de igual modo ocurra a nivel del NGC.

Hay varios argumentos para desmentir esta afirmación. Primero, existe una proyección serotoninérgica entre la área de la sustancia gris periacueductal, incluido al rafe dorsal, hacia la formación reticular medial bulbar. Igualmente el rafe dorsal proyecta ascendentemente a las estructuras cerebrales que se involucran en la agresión y la conducta alimenticia. De manera que no es probable que ambas direcciones de proyección serotoninérgica se comporten diferencialmente. Otros argumentos versarian sobre los estudios de respuesta al dolor así como el control motor durante la PSMOR. En ambos casos el NGC participa importantemente como ya se mostró en la introducción. De esta manera a continuación voy a revisar la relación de estas funciones con la serotonina así como su alteración durante la privación poniendo especial énfasis en el área del NGC.

Primero revisemos como modifica la PSMOR la respuesta ante estímulos nociceptivos. Aunque hay pocos estudios al respecto, se sabe que en la rata esta maniobra experimental genera hiperalgesia^{70,71}. Así 96 h de PSMOR reducen el umbral al dolor significativamente. Este efecto algésico no sólo se presentó inmediatamente después de la privación sino que además manifestó una inercia aún después de 96 h de sueño recuperativo. Mas aún es muy probable que la hiperagresividad manifestada por los animales privados, se relacione estrechamente con una sensibilidad alta con relación a los estímulos somáticos. Es bien sabido la relación entre estímulos que se asocian con dolor y respuestas agresivas⁷⁸. De hecho en los roedores se utilizan los choques eléctricos nociceptivos como un medio experimental altamente efectivo de

inducción de conducta agresiva que por cierto también se incrementa después de la PSMOR¹²⁷. De modo que bien pudiera ser que un umbral muy bajo al dolor facilite que los contactos sociales (o la manipulación) desencadenen ataques que en circunstancias normales no ocurrirían. Es más cuando mencioné acerca de la hiperagresividad que observé después de la privación, deliberadamente omití que la respuesta agresiva era la más de las veces una consecuencia de un estímulo táctil que era seguido de vocalizaciones. Las vocalizaciones son otra respuesta ante los estímulos dolorosos. En síntesis es probable que la agresividad aumentada sea una respuesta ante dos circunstancias difíciles por las que el animal está siendo obligado a transitar; una es la hiperalgesia ante los estímulos somatosensoriales y la otra es una deficiencia en los mecanismos de saciedad alimenticia que generan un estado de hambre constante. Ambos estados desembocarían en la facilitación de conducta agresiva.

Ahora bien ¿qué relación existe entre respuesta nociceptiva y 5-HT? En la extensa revisión de Le Bars (1988) se señala que a veces se ha visto que las drogas que producen disminuciones serotoninérgicas como p-CPA o PCA (paracloroamfetamina) o bien las dietas libres de L-TRP producen importantes disminuciones del umbral nociceptivo en roedores así como disminución de la analgesia generada con morfina. Igualmente las lesiones del rafe magno o del rafe mediano también pueden producir efectos similares al igual que las inyecciones ICV o intratecales de 5,6 ó 5,7-DHT. En estos casos la hiperalgesia es transitoria y se asocia con disminuciones de la 5-HT cerebral. Por el contrario la administración de 5-HTP o L-TRP incrementan el umbral de respuesta dolorosa. Lo mismo se observa en la fase aguda de administración de PCA, con fenfluramina o incluso con agonistas no selectivos 5-HT como la 5-metoxi-DMT. De particular importancia en la antinocicepción está la estimulación eléctrica del rafe magno así como de la sustancia gris periacueductal que incluye también al rafe dorsal (ambas aferencias del NGC).

Es así que todo esto hace pensar que posiblemente la 5-HT juegue un papel en la inhibición de la respuesta ante estímulos nociceptivos y por ende si la liberación se ve reducida por la PSMOR, lo esperado es que los animales se manifiesten hiperalgésicos. Mas aún como se puede prever que durante el rebote de sueño MOR esta liberación siga importantemente disminuida (para no interferir con la generación colinérgica del SMOR), los animales deben seguir manifestando una respuesta incrementada ante la estimulación nociceptiva. Al respecto si se considera que en el NGC hay células nociceptivas que probablemente modulen un reflejo supraespinal de respuesta dolorosa, es factible también suponer que la baja en la transmisión 5-HT en este sitio va a facilitar la conducta de evitación ante el dolor. Hipótesis que por supuesto todavía no se prueba. Lo más que se sabe¹¹¹ es que la aplicación de 5-HT, inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT o bien fenfluramina al rafe magno incrementan el umbral nociceptivo. Al respecto se propone que esta 5-HT viaje descendientemente desde la sustancia gris periacueductal. De cualquier modo también la línea de argumentación que relaciona la hiperalgesia, PSMOR y 5-HT nos conduce a una interpretación de decremento en el nivel de liberación de esta monoamina posiblemente a nivel del NGC.

Pasando a otro punto, la PSMOR modifica también el grado y el tipo de conducta motora en los roedores. Así por ejemplo se ha observado^{49,50} que durante las primeras 24 h de la PSMOR ocurre un importantísimo aumento en la actividad motora no asociada a búsqueda de alimento. Esto sobre todo durante la fase iluminada. Conforme transcurren los días de experimento, la hiperactividad nocturna retorna a valores basales pero no así sucede con la diurna (aunque es cierto que tiende a disminuir un poco). Otros autores han reportado^{69,126} que la PSMOR aumenta la actividad locomotora pero no de manera indiferenciada sino selectiva. De este modo los animales resultan ser más activos en la exploración del ambiente después de 2 o 4 días de PSMOR ¿Podría esta hiperactividad estar también relacionada con alguna modificación en la transmisión 5-HT?

Parece que sí. Existen algunos reportes que indican que la baja en la transmisión 5-HT se relaciona con hiperactividad en particular aquella asociada con conductas exploratorias. Steigrad y cols. (1978) al igual que Borbely y cols. (1981) encontraron que la administración de p-CPA resulta en un incremento transitorio de la actividad durante el periodo iluminado. Además encontraron una buena correlación de esta hiperactividad con un reducido nivel de 5-HT cerebral. Este efecto circádico fue también demostrado²⁰⁴ con lesiones 5-HT hechas con 5,7-DHT. Sobre todo se halló que la hiperactividad diurna se correlaciona con un bajo nivel de 5-HT a nivel septo-hipocampal. Al respecto se conoce^{64,88} que la transmisión 5-HT del rafe mediano hacia el *septum* o el hipocampo es capaz de bloquear el ritmo teta que se genera fundamentalmente en estas regiones. Por el contrario su disminución favorece la expresión de esta actividad eléctrica^{116,203}. Ahora bien como se recordara, este ritmo aparece espontáneamente durante la vigilia en dos momentos; a) cuando la rata camina o bien cuando está explorando su alrededor. Bajo estas circunstancias se puede plantear que la transmisión 5-HT básicamente proveniente del rafe mediano es un componente inhibitor importante de este ritmo así como las actividades que se expresan conjuntamente con él. Como apoyo de esto se sabe⁹⁰ que la lesión específica de este núcleo genera un importante aumento de actividad motora. Bajo estas circunstancias, si la PSMOR afecta negativamente la liberación de 5-HT de este núcleo serotoninérgico, el ritmo teta así como las conductas motoras asociadas con este se verán en consecuencia facilitadas. Esto podría ayudar a comprender porque la PSMOR produce un incremento en la actividad locomotora y en particular la asociada con la exploración.

Sin embargo lo anterior nos lleva a la conclusión de que al haber menos serotonina, al menos a nivel septo-hipocampal, se favorece la locomoción y la exploración. Pero se puede uno preguntarse ¿cómo es posible armonizar este hecho con la inhibición motora del SMOR que se presenta conjuntamente con una baja en la liberación de esta indolamina? La respuesta más directa que se me ocurre es que no hay hiperactividad sencillamente porque la eferencia motora está fuertemente inhibida no porque no deba existir. Esto se corrobora con los experimentos de lesión que producen sueño MOR sin atonía. En estos se llega a observar a los animales caminando activamente, atacando o explorando.

Ahora bien ¿qué relación guardaría las modificaciones motoras consecuencia de la privación con relación a la transmisión 5-HT a nivel del NGC? Casi no hay estudios al respecto. Lo único que se sabe⁷⁴ es que cuando se lesiona neurotóxicamente a las células de esta región se observan trastornos motores como la hiperextensión de

miembros o bien trastornos locomotores. Por cierto esos mismas afectaciones las observé después de haber implantado la cánula guía en el NGC. Mas importante aún es que el grado de recuperación de estos trastornos de la motilidad se correlaciona negativamente con la cantidad de células 5-HT sobrevivientes. Asimismo el tono incrementado del EMG durante el sueño y en particular durante el SMOR se ve favorecido por un cociente mayor de células 5-HT aún vivas con respecto a las colinérgicas o GABAérgicas. De este modo lo que se desprende sería que la 5-HT esta funcionando como facilitador del tono motor a nivel del NGC mientras que la acetilcolina y el GABA serian inhibidores de la atonía mediada por esta estructura durante el sueño. Mas importante aún si se considera que el NGC es clave para la generación de la atonía del SMOR se entenderá que si la 5-HT inhibe a las reticuloespinales, entonces debe estar fuertemente inhibida su liberación para no interferir con el desarrollo de esta inhibición motora. En congruencia con esta idea en la presente tesis se aprecia que el principal metabolito de la 5-HT, el 5-HIAA, se excreta mas durante la vigilia y menos durante los estados menos activos desde el punto de vista motor, sobre todo esto es significativamente menor para el caso del sueño MOR. Dado que también se observó que en circunstancias basales hay un fuerte paralelismo entre la concentración extracelular de 5-HT y 5-HIAA, entonces es muy factible pensar que así también estará ocurriendo con la concentración de 5-HT. Esto bien pudiera ser porque como se acaba de plantear la 5-HT funcionaría como un facilitador del tono motor. Bajo este papel resultaría contraproducente que hubiera actividad 5-HT durante el sueño MOR ya que rompería su continuidad al incrementarse el tono muscular.

Al respecto resulta pedtrnente señalar aquí que a nivel de la formación reticular medial pontina (N. Pontis Oralis) del gato, la aplicación de 5-HT induce un incremento del tono muscular. Asimismo esta maniobra revierte la atonía muscular generada por la estimulación colinérgica llevada a cabo con carbacol. Mas aún se sabe la 5-HT logra este efecto de facilitación motora, al inhibir de alguna forma la descarga de las reticuloespinales del NGC que previamente indujo el carbacol. Dado que no solo hay terminales serotoninérgicas a nivel del Pontis Oralis¹⁶⁵ sino también del NGC^{200,226}, es posible que aquí también pudiera facilitar el tono motor inhibiendo directamente a estas reticuloespinales encargadas de inhibir el tono muscular durante el SMOR.

En síntesis la hiperfagia, la hiperagresividad, la hiperalgesia, así como la hiperactividad producida por la PSMOR bien pudiera ser varias caras del mismo fenómeno, es decir, una baja en la liberación de 5-HT a nivel del cerebro entero. Sin embargo también es posible que estos efectos sean una respuesta secundaria a un periodo inicial de mayor liberación de 5-HT. Durante esta etapa inicial pudiera manifestares en cambio los polos opuestos como la anorexia así como un mayor "tono" emotivo.

EL AUMENTO DEL RECAMBIO COMO CONSECUENCIA DE LA PRIVACIÓN DE SUEÑO MOR

Pasando a otro punto, los estudios bioquímicos que midieron la concentración tisular de 5-HT y 5-HIAA con relación a la PSMOR encontraron frecuentemente un incremento en el cociente entre ambas aminas (5-HT/5-HIAA). Lo mismo encontré yo aunque sólo en términos relativos. Una interpretación del aumento de este cociente (por lo pronto quedémonos sólo a nivel tisular) es que si hay mayor cantidad de metabolito es porque previamente se liberó mas 5-HT, se recapturó y finalmente se catabolizó en igual proporción. Como se puede ver con esta interpretación se equipara el aumento del recambio con el aumento de liberación durante la PSMOR. Sin embargo esta no es la única explicación posible; también se puede suponer que la PSMOR puso en marcha los mecanismos homeostáticos existentes en las células 5-HT de manera que esa mayor cantidad de 5-HIAA no provendría de la serotonina previamente recapturada, sino de un exceso que no se pudo descargar sinápticamente. Con esta interpretación alternativa el aumento de 5-HIAA intracelular no se originaría de una mayor liberación de neurotransmisor sino mas bien se presentaría en condiciones baja en la liberación como es el caso de lo encontrado aquí al final de la PSMOR. En otras palabras esta interpretación implica que se metabolice mas 5-HT porque no se puede descargar. Ahora bien ¿qué pruebas hay de tal mecanismo de recambio intracelular? Hay varias y estas se pueden dividir en:

- a) los estudios bioquímicos llevados a cabo después de las cargas de precursor^{40,56,168,176} que demuestran que una vez llegado a un límite en el almacenaje intracelular de 5-HT, esta se empieza a deaminar continuamente.
- b) aquellos que midieron la excreción de 5-HIAA aún inhibiendo selectivamente la recaptura^{31,106,114,156}
- c) en el hecho de la enorme desproporción existente entre la liberación de 5-HT y la excreción de su principal metabolito y finalmente
- d) en los resultados observados durante el "síndrome serotoninérgico" producido por reserpina conjuntamente con inhibidores de la MAO²¹⁴

De todo esto deduzco que:

1. No toda la 5-HIAA proviene de la recaptura de 5-HT, sino que existe una buena porción que es metabolizada aún en condiciones de bloqueo de la recaptura. Es decir existe un gran recambio entre 5-HT y 5-HIAA pero este se puede dar tanto a nivel intracelular como extracelular.
2. Las células 5-HT no permiten una acumulación indefinida de neurotransmisor cuando no hay una mayor demanda fisiológica de liberación. Para esto comienzan a metabolizar el exceso haciendo que el recambio intracelular aumente.

Esta explicación basada en la homeostasis nos permitiría entender porque frecuentemente no se encontró una baja en la cantidad de 5-HT intracelular con motivo de la PSMOR aunque si aumentó la concentración del principal metabolito. Sería factible que este decremento ocurriera al haber mayor liberación. Como ya se dijo bajo la perspectiva homeostática el aumento de 5-HIAA intracelular no provendría en estos casos, de mayor liberación sino de un aumento en el recambio intracelular. En otras palabras, se sintetiza mas 5-HT pero luego se cataboliza en igual medida siendo el resultado neto que no se encuentren cambios en la concentración intracelular de 5-HT pero si en cambio en la de 5-HIAA. Ahora lo mas importante de explicar aquí es ¿porqué habría de aumentar este recambio durante la PSMOR? Creo que esto estaría relacionado a dos procesos: inhibición de la descarga de las células 5-HT conjuntamente con un aumento de la síntesis motivada por la constante demanda de despertarse para no caer al agua. Así al estar fuertemente inhibida la descarga, esta 5-HT recién sintetizada derivaría en algo similar a lo sucede con las cargas de precursores serotoninérgicos, donde no se modifica la liberación basal sino que mas bien aumenta la catabolización del exceso de 5-HT. Una pregunta que surge de esta hipótesis es ¿cómo puede estar frenada la liberación en condiciones de mayor demanda de liberación?

Se puede vislumbrar que la vigilia aumentada durante la PSMOR necesariamente fuerza también hacia la activación y mayor síntesis de las células 5-HT ya que estas células modulan positivamente su actividad precisamente con el nivel de alerta⁸⁰. Ahora bien sólo considerando este factor de presión, en efecto la activación debería darse hasta tanto la vigilia forzada continúe. Sin embargo plantear una activación indefinida no sería compatible con una cada vez mayor presión de sueño MOR. Así no resulta congruente imaginar que una continua estimulación de los receptores 5-HT, en particular 5-HT_{1A}, situados en las células "REM-on" favorezca su actividad porque precisamente ya se señaló que mas bien las hiperpolarizan. Esto nos lleva a la necesidad de plantear el surgimiento de mecanismos de freno a la transmisión 5-HT que permitan ir construyendo una progresivamente mayor presión de entrada a SMOR aún en condiciones de mayor demanda del estado de vigilia. Estos frenos bien podría ser de carácter presináptico estrictamente local como las ya mencionadas interneuronas inhibitorias o bien mecanismos de freno aferentes que provengan por ejemplo del hipotálamo anterior como se propone para el caso de factores hipnógenos como el VIP o el CLIP⁴⁷ (por supuesto bien pudieran estar actuando en forma simultánea). En ambos casos tendríamos menor liberación a la vez que se mantenga la excitación debido a la vigilia adicional.

Claro está también es posible imaginar mecanismos postsinápticos como la desensibilización de los receptores que permite armonizar mayor liberación con menor eficacia sináptica. Sin embargo opto por la primera alternativa porque en primer lugar mis datos no apoyan mayor liberación así como que la inhibición presináptica intensa me parece mas efectiva para frenar la transmisión 5-HT que la desensibilización de los receptores. No obstante también debo reconocer que la opción presináptica va en contra de los estudios que han encontrado una desensibilización de los sitios de ligadura para 5-HT durante la PSMOR. Afortunadamente también hay un trabajo que en cambio encontró evidencias de una hipersensibilización (y por tanto menor liberación) causada por la PSMOR. En este¹⁶³ se vio que esta maniobra produce una facilitación del síndrome serotoninérgico generado por cargas de precursor. Así pues

quizá no sea tan descabellado pensar que la liberación de 5-HT este interferida durante la PSMOR.

Adicionalmente a estos frenos presinápticos se me ocurre que el aumento del recambio intracelular podría servir adicionalmente para ayudar a resolver el conflicto de intereses dentro de las células 5-HT. Por un lado se frena la descarga pero por el otro se favorece la síntesis. Este mecanismo estaría destinado a que no se sobrecargaran los almacenes intracelulares en circunstancias de elevada síntesis como por ejemplo con las cargas de precursores o la vigilia forzada. En ambos casos no se requiere mayor liberación. De este modo se va a catabolizar el exceso de 5-HT sintetizado por fuerza de estas circunstancias. Esto haría que el 5-HIAA empezara a aumentar tanto dentro como fuera de la célula sobre todo en relación al 5-HT.

La anterior explicación permite armonizar bien los resultados de la bioquímica intracelular, es decir, constancia de la concentración intracelular de 5-HT pero aumento del metabolito. Igualmente me permite explicar porque hay una baja muy importante en la liberación aún sin cambios a la alta en las concentraciones intracelulares de 5-HT. Sin embargo también me genera un gran problema de explicar. La baja simultánea que se observó para el caso de la excreción de 5-HIAA durante la PSMOR. Según el modelo que se acaba de describir lo esperado es que aumente esta excreción no que disminuya. Esto debido a que a menos de que el mecanismo de excreción este fallando, el aumento del 5-HIAA intracelular debe corresponderse con uno a nivel de fuera de la célula. No hay que olvidar que este compuesto esta destinado a eliminarse del cuerpo (no se sabe que sea precursor de aún otro) de manera que no resulta ventajoso acumularlo dentro de la célula. Sin embargo no hay evidencias³⁰ que la PSMOR interfiera con el proceso de excreción. Esto se dedujo de que al bloquear a la MAO no existen diferencias en la curva de decaimiento del 5-HIAA intracelular entre ratas controles y privadas.

Si no se trata de una falla en la excreción ¿no podría ser una falla en el funcionamiento de las MAO's ? Como se mencionó en los antecedentes en efecto hay pruebas que señalan que la actividad de la MAO se decrementa después de 96 h de PSMOR. Esto bien puede sacarme del problema pero al mismo tiempo ¿cómo pudiera armonizarse este dato con los incrementos intracelulares de 5-HIAA? No encuentro salida a esto. Creo que lo mas sencillo de explicar es que la baja en la excreción de 5-HIAA se debe principalmente a la baja en la liberación de 5-HT. Esto haría que menos cantidad de esta amina estuviera disponible como sustrato al ser recapturada. Secundariamente también se puede atribuir este descenso a la disminución en la actividad de la MAO. Bajo estas circunstancias se debe considerar que se excreta menos 5-HIAA es porque hay menos 5-HIAA dentro de la célula ¿quería esto decir que el mecanismo de regulación antes mencionado no está funcionando en este caso?

Creo que la respuesta es afirmativa y me baso en lo siguiente. El grado de reducción de la liberación de 5-HT por la PSMOR fue mayor al 1000% mientras que el de la excreción sólo estuvo afectado en un 32%. Así de cada 1000 moléculas de 5-HT catabolizadas sólo 5 provenían de la recaptura mientras que en condiciones basales esta cifra se elevaba hasta 60. De este modo se aprecia que durante la privación y en proporción, mucho mas cantidad de 5-HT se cataboliza sin ser liberada. Lo cual sugiere que la 5-HT esta siendo derivada a la catabolización y no a la liberación.

Sin embargo este proceso de recambio a nivel intracelular parece ser en efecto muy relevante durante el sueño recuperativo. Lo anterior no solo basado en los resultados que obtuve sino también por lo que se reporta a nivel de bioquímica del tejido cerebral. Así otros autores¹⁹¹ han encontrado que por un lado durante el rebote de sueño ocurre un incremento en la concentración intracelular de TRP, 5-HT y el 5-HIAA cerebral. En particular el metabolito se incrementa entre 140-180% lo cual es el más del doble de lo que encontré (72%). De este modo se me ocurre que durante el rebote de sueño, el aumento en la disponibilidad del precursor da origen a más 5-HT. Sin embargo como este nuevo 5-HT no se puede utilizar para la transmisión sináptica por estar inhibida la descarga, entonces se metaboliza para luego excretarse en mayor cantidad como ya intenté explicarlo. Esto explicaría bien la baja en la liberación junto con el incremento en la excreción.

Ahora bien varias veces he planteado que las células 5-HT deben estar inhibidas para liberar como consecuencia de la elevada presión de SMOR. Me he basado en los presentes hallazgos básicamente, asimismo he traído a la discusión la posibilidad de la existencia de interneuronas inhibitorias GABAérgicas. No obstante como me mencioné este proceso todavía falta por comprobar. Así pues ¿no habrá alguna prueba más evidente que señale que en efecto existe una fuerte inhibición de la descarga durante el sueño MOR? Si la hay y viene de un estudio electrofisiológico¹¹⁰. En este se observó que la estimulación eléctrica de la formación reticular medial pontina incrementa 10 veces el nivel de disparo de la células del rafe dorsal durante la vigilia y el sueño NMOR. Sin embargo la aplicación de este mismo estímulo durante el sueño MOR no produce ningún efecto. Las células siguen tan silenciosas como usualmente lo están durante este estado. Esto fuertemente sugiere que debe existir una intensa hiperpolarización en estas células 5-HT durante el sueño MOR; de manera que si muchos otros autores han encontrado^{76,144,212} que casi no hay liberación de 5-HT durante este tipo de sueño, esto no se debe a una falta de aferencia excitatoria. En otras palabras si se muestran silentes no es porque no tengan que "decir" sino porque están literalmente "amordazadas". Aun más si consideramos que durante el rebote de sueño MOR esta fase se vuelve muy importante entonces las células 5-HT deben de permanecer más tiempo hiperpolarizadas de manera que la posibilidad de descargar es todavía menor que en condiciones basales. Asimismo señalé en la introducción que un factor clave para que las células 5-HT dejen de disparar es la atonía muscular. Es así que muy probablemente esta influencia hiperpolarizante hacia las células 5-HT se relacione con la actividad de células que también modulen la excitabilidad de las motoneuronas o células conectadas a estas últimas.

Además ultimamente se comprobó que en efecto a nivel del rafe dorsal, el rebote de SMOR induce un aumento en el número de células FOS+GAD IR, es decir, GABAérgicas que se activan durante esta etapa. Así pues estas deben de estar hiperpolarizando postsinápticamente a las células 5-HT y por tanto inhibiendo su descarga de neurotransmisor.

EL DESCENSO DE LA TRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA DURANTE EL REBOTE DE SUEÑO MOR

Por otro lado quisiera abordar otros dos puntos adicionales que según mi opinión también dan sustento a una baja importante en la transmisión 5-HT durante el rebote de SMOR. Esto son la depresión del sueño NMOR observada durante el rebote así como la relación entre 5-HT y actividad PGO.

En la presente tesis se observó una especie de "rebote negativo" de SNMOR. De este modo aunque existió una facilitación en relación a la entradas a SNMOR, el mecanismo de mantenimiento este tipo de sueño estuvo severamente deprimido por la emergencia continua del SMOR. Como resultante disminuyó significativamente la cantidad de SNMOR con respecto a valores basales. Este fenómeno de falta de rebote o aún descenso del tiempo total de SNMOR ha sido reportado por otros investigadores^{19,55,57,58} que lo encontraron después de la privación total de sueño o después de la PSMOR^{52,65}. ¿Qué relación podría tener esta depresión del sueño NMOR con la disminución en la liberación de serotonina?

El rebote de SMOR preferencial se parece en cierto grado a lo que se ha observado en experimentos con p-CPA crónico⁴⁴, p-CPA y privación¹⁶¹ así como con p-CPA asociado a enfriamiento del rafe dorsal²⁶. En los tres casos se presentan la aparición de episodios de SMOR sin SNMOR precedente. Esta condición tan peculiar denota una elevada presión de entrada a sueño MOR pero que además se asocia con una depresión en los mecanismos relacionados a la expresión del SNMOR. Esto es similar al caso reportado aquí aunque en menor grado ya que raramente pude observar episodios de inicio de sueño con SMOR. No obstante los tres enfoques tienen en común un grado elevado de decremento de la transmisión 5-HT como también fue el caso de los presentes hallazgos. Es mas llama la atención en especial como la privación adicionada a la p-CPA da efectos similares a las otros dos enfoques experimentales haciendo pensar que de algún modo la privación de SMOR facilita el decremento aún mayor de la transmisión 5-HT como lo hace la p-CPA administrada crónicamente o bien la p-CPA adicionada a enfriamientos del rafe dorsal. Es así que me atrevo a sugerir que la depresión de los mecanismos de SNMOR inducido por el rebote de SMOR en las ratas, es una consecuencia de un descenso muy importante de la transmisión de 5-HT que favorece la expresión de SMOR a costa deprimir la continuidad del otro tipo de sueño.

Mas aún esta idea también es congruente con lo ya comentado del estudio de Mallick y cols. (1983) donde no solo se señala que la PSMOR deprime la actividad de las células "REM-off", sino que en oposición activa a las "REM-on". Ahora bien si se piensa que los bajos niveles de 5-HT no son compatibles con los estados de sincronización pero si con aquellos caracterizados por la desincronización cortical, entonces tendríamos los elementos para pensar en una facilitación del SMOR a costa del SNMOR como la que se muestra en la presente tesis. Ahora pasemos a revisar la relación entre actividad PGO y 5-HT en el contexto de la PSMOR.

Al respecto se comentó en la introducción que el reforzamiento de la transmisión 5-HT no solo inhibe fuertemente al SMOR sino principalmente a estos potenciales⁸⁹. Por el contrario la interferencia con esta transmisión favorece la

anormal aparición de la actividad PGO. Asimismo se mencionó que las PGO's habitualmente se relacionan a la fase preparatoria del SMOR pero sobre todo aparecen durante este tipo de sueño¹⁷⁹. Basándome en estos conocimientos me planteo la siguiente hipótesis. Si durante la privación así como también durante el rebote de SMOR, la liberación de 5-HT estuviera significativamente decrementada entonces lo esperado es que durante estas dos fases, la actividad PGO se vea facilitada. Es así que al menos en el caso del rebote de sueño MOR, se ha visto⁴⁶ que la densidad PGO esta en efecto significativamente aumentada. Esto no sólo se observó durante los episodios de SMOR sino además durante el sueño de ondas lentas que precede al SMOR. Esto ciertamente apoya de nuevo la idea de una baja liberación de 5-HT durante el sueño recuperativo.

En relación a esto también se ha visto como la PSMOR genera una hiperreactividad ante los estímulos del ambiente. Asimismo se acaba de mostrar que además produce una mayor actividad PGO. Al respecto es interesante hacer notar que se ha querido ver en las PGO un correlato neurofisiológico que indica una mayor "reactividad sensorial". Por ejemplo hay evidencias que apuntan hacia que una actividad muy similar a las PGO puede ser generada con estímulos auditivos^{7,45,83} o somatosensoriales². De hecho se ha mostrado⁹² que la células presuntamente colinérgicas del LDT/PPT donde se ubican las células "PGO-on", también responden a diferentes modalidades de estímulos sensoriales. Si sumamos a estas propiedades sensoriales que las PGO propiamente se relacionan a la vía visual, entonces podríamos decir que las células colinérgicas del tegmento mesopontino dorsolateral son una estación central para la captación de información sensorial no específica. ¿Qué tiene que ver esto con la transmisión 5-HT? En forma curiosa las células del rafe también responden a la estimulación sensorial de diferentes modalidades⁹². De este modo Jacobs BL y Fornal CA proponen (1999) que la 5-HT serviría para integrar adaptativamente dos aspectos: movimiento y reactividad sensorial. Afirman que la 5-HT inhibiría la reactividad sensorial inespecífica en función de permitir la ejecución de una conducta dada. Si consideramos a las PGO como signos de esta reactividad sensorial no específica entonces se puede comprender el porque la actividad de las células 5-HT cesa antes de estos potenciales y cuando resurge desaparecen las PGO's. En congruencia la liberación de 5-HT en el área PPT/LDT es mínima durante el SMOR¹⁸¹. Además hay evidencia^{91,216} que relaciona estrechamente la temporalidad de la inhibición motora con la generación de ondas PGO. De esta manera se permite una mayor reactividad sensorial a costa de suprimir la conducta en proceso. Si consideramos que durante el sueño MOR, hay poderosos mecanismos de inhibición motora, entonces se puede entender porque no se requiere de 5-HT a la vez que se permite una gran reactividad sensorial que se manifiesta en las PGO y en los ensueños. Asimismo el papel integratorio de la 5-HT en este aspecto se puede apreciar con la aplicación de p-CPA. Wu MF y Siegel JM (1990) descubrieron que la magnitud de reflejo de sobresalto se incrementa en un 555% en gatos con niveles bajos de 5-HT. Esto todavía se acentúa mas cuando el estímulo inductor de este reflejo se presenta poco después de un potencial PGO durante la "vigilia". Asimismo este tratamiento también induce un incremento en la amplitud del potencial PGO inducido. En relación a esto también hay que tener presente que estos gatos con p-CPA presentan conductas alucinatorias que se asocian precisamente a la actividad PGO⁴⁴. De este modo lo que me parece es que la 5-HT sería un freno especialmente efectivo para esta central colinérgica de reactividad sensorial no específica. De manera natural esta reactividad puede manifestarse sin problema alguno durante el sueño MOR donde

existe un mecanismo motor inhibitorio no serotoninérgico. Sin embargo si producimos un descenso no fisiológico de la transmisión 5-HT ya sea con p-CPA o PSMOR, la reactividad inespecífica y "autogenerada" de este centro traerá como consecuencia conductas fuera de contexto que bien pueden calificarse como hiperreactivas, aberrantes o incluso pseudoalucinatorias.

Finalmente mencionaré que a diferencia de lo que ocurre durante la PSMOR, durante el rebote en efecto se ha visto¹²⁴ una hipersensibilización de los sitios de ligadura para 5-HT que también apoyaría una menor liberación de 5-HT.

En conclusión hasta aquí he intentado aportar un conjunto de hechos que apoyen la idea de que durante la privación así como también durante el rebote de sueño MOR, debe haber una baja importante en la transmisión 5-HT a nivel del cerebro en general y en particular del NGC. Espero haber convencido al lector de tal posibilidad. Sin embargo aún queda un factor que puede meter ruido a los efectos que presento en esta tesis, este es el estrés de la PSMOR. Es así que la PSMOR es un estresor como lo señala los hallazgos de hipertrofia de las adrenales, baja de peso así como involución del timo. Bajo esta circunstancia la PSMOR por el método de la plataforma única obtiene mayor calificación en el índice de estrés propuesto por Selye a comparación de otro método de privación como la plataforma múltiple o el método del péndulo²⁸. Se me ocurre que en principio el estrés de la plataforma única puede ser atribuido básicamente a la inmovilización pero además a las caídas en el agua fría entre otros factores. Así es válido preguntarse ¿no podría ser que los cambios observados en las concentraciones intracelulares o las extracelulares de 5-HT y 5-HIAA pudieran deberse a estos factores intrínsecos a la estancia en la plataforma y no tanto a la pérdida del sueño MOR? A continuación se intentara evaluar este factor.

EL FACTOR DEL ESTRÉS CAUSADO POR LA PLATAFORMA DE PRIVACIÓN DE SUEÑO MOR

En experimentos³² donde se ha evaluado el papel de la inmovilización en ratas, se ha visto que en efecto también se incrementa significativamente la catabolización de 5-HT cerebral que se asocia a una baja de la 5-HT intracelular. Sin embargo este aumento del metabolismo es un efecto independiente de las hormonas adrenales ya que igual se presenta en ratas adrenalectomizadas. La inmovilización también genera un decremento en la disponibilidad del 1-TRP y como consecuencia también por esto baja la 5-HT intracelular. Este otro efecto en cambio si es dependiente de la cantidad de secreción adrenal. No obstante ambos efectos solo son transitorios y no se mantienen en una inmovilización que se prolongue mas allá de 6 h. De hecho existe una ventana entre 3 y 6 h donde se aprecian sus efectos sobre la transmisión 5-HT. Después de este intervalo tanto el valor intracelular de 5-HT como el de 5-HIAA regresan a valores basales. Esto coincide con lo observado por Rampin C. y cols (1991) con respecto a la habituación del aumento en la cantidad de sueño MOR a lo largo de las inmovilizaciones repetidas. De este modo parece que aunque hay un efecto de "primera vez" que genera más liberación de 5-HT, esto no puede aplicarse para el caso de la presente tesis en donde los animales tuvieron tiempo suficiente para habituarse a la inmovilidad. Incluso este efecto de inicio causado por la inmovilidad sobre la transmisión 5-HT, también parece apoyar la idea de las "dos etapas" de afectación

sobre la transmisión 5-HT que posiblemente ocurra en una privación de SMOR prolongada. Una etapa inicial de mayor liberación y otra donde esta se normalice.

Asimismo hay evidencias¹⁴⁶ que señalan que aunque la restricción de movimientos producto de la estancia sobre las plataformas de privación o control puede aumentar la catabolización de 5-HT, este aumento no guarda relación con el tiempo de estancia sobre estas reducidas superficies o bien no se mantiene, no obstante se continúe con la restricción de movimientos como acabo de mostrar en el párrafo anterior. Mas aún no se ha encontrado²¹¹ cambios en la tasa de disparo de las neuronas del rafe dorsal con diferentes tipos de condiciones estresantes incluida la inmovilidad. Esto descalifica fuertemente que la inmovilidad pueda activar a las células 5-HT al menos en el corto plazo.

Esta falta de consistencia causal entre el factor estrés por inmovilidad y cambios en el metabolismo de la serotonina se puede ahondar mas diciendo que no se encuentran diferencias entre los niveles de estrés medidos por el índice de Seyle entre ratas mantenidas en la plataforma control y las mantenidas sobre las de privación²⁸. De modo que el factor de "estrés" de la estancia en las plataformas no podría explicar porque en la presente tesis si encontré diferencias significativas entre la concentración extracelular de 5-HT y 5-HIAA entre ambos grupos. De hecho no hay diferencias significativas en estos parámetros entre la condición basal y la condición de plataforma control. Esto se relaciona a que tampoco se encontraron diferencias en los tiempos totales de los estados de vigilancia entre ambos momentos. Así pues parece que en este caso es el factor de SMOR, el más lógicamente responsable para la baja en la transmisión 5-HT.

Por otro lado se ha visto¹⁸⁰ que en efecto la inmersión en agua fría (19°C) aumenta también el recambio de 5-HT en las ratas. Asimismo Myers RD (1973) encontró que en el mono, la exposición al frío intenso produce un aumento en la liberación de 5-HT a nivel del área preóptica media del hipotálamo anterior. Esto se interpreta como una respuesta termoregulatoria para contrarrestar la pérdida de calor. Así la 5-HT a este nivel diencefálico media una intensa hipertermia periférica. De modo que es posible imaginar que las inmersiones repetidas también pudieran echar andar este mecanismo 5-HT termoprotector en los animales que constantemente caen al agua durante la PSMOR. No obstante como ya señale en los resultados, estas caídas no son nada frecuentes de manera que aunque no se le puede descartar del todo, creo mas bien que las inmersiones no son un factor constante sino mas bien ocasional y por ello no muy importante para explicar los cambios encontrados. Además dado que no hay evidencias de que el NGC participa en una respuesta termoregulatoria no creo que los cambios que observé en esta región se puedan atribuir en lo absoluto al factor de las inmersiones. Incluso como lo vio Wilkinson y Jacobs (1988), el estrés por inmersión en agua realmente fría (4°C) no modifica el patrón de disparo del rafe dorsal en el gato. Bajo estas circunstancias no parece creíble que el aumento en la liberación 5-HT hipotálica sea un efecto directo sino mas bien debe estar mediado por alguno otro factor primario.

Para finalizar comentaré los resultados de eliminación del calcio del líquido de diálisis. Se encontró que tanto la liberación de 5-HT como la excreción de 5-HIAA se disminuyeron significativamente cuando se eliminó este catión del líquido de diálisis. Este efecto seguramente se debió a que la eliminación del calcio del interior del

compartimiento membranal produjo que el calcio extracelular en las cercanías de la sonda de MD, empezará a difundir a favor de gradiente y por tanto a disminuir en su concentración en esta región. Por otro lado dado que tampoco se puede evitar que el calcio del compartimiento extramembranal también difunda a favor de sus gradientes, se entenderá que es imposible "sacar" la totalidad de calcio. Es así que yo preveo que las regiones alejadas de la sonda debieron de haber servido como un "buffer" que impidió el vaciamiento total del calcio. Es por ello que quizá la liberación de 5-HT no se eliminó del todo.

Al respecto otros autores también han reportado que la substracción del calcio decrementa significativamente la concentración extracelular de 5-HT. Por ejemplo Iwakiri y cols. (1994) reportan una disminución del 25-48% a nivel de la formación reticular pontina. Lo mismo se ha encontrado²¹⁰ para otros neurotransmisores como la noradrenalina, la dopamina o la acetilcolina pero no así para otros como el GABA o el glutamato. Esto hace pensar que a lo mejor no todos los neurotransmisores tengan una fuerte dependencia del calcio extracelular para liberarse. Sin embargo para el caso de la 5-HT reportada aquí no tengo duda de que el calcio es un factor muy importante para su liberación.

Ahora bien el hecho de que la concentración extracelular de 5-HIAA no haya disminuido en igual proporción a la del 5-HT sugiere de nuevo que no toda la metabolización depende de la recaptura. Así se ve que también puede catabolizarse serotonina que no ha sido liberada y por tanto debe haber un recambio en la poza intracelular. Quizá este recambio sea una forma de mantener renovadas las moléculas de 5-HT almacenadas y así garantizar su óptimo funcionamiento.

En conclusión creo haber aportado al lector evidencia que apoya el hecho de una reducción en la baja en la liberación de 5-HT tanto durante como después de la PSMOR. Asimismo opino que este descenso debe ser interpretado como un reflejo de la homeostasis del sueño MOR. Por otro lado debo reconocer que en el caso de los hallazgos durante la PSMOR también existe evidencia que va en contra de mis resultados de modo que hasta que no se hagan otros experimentos no es posible confirmar o desmentirlos plenamente.

Experimentos a futuro

Finalmente me gustaría terminar esta discusión proponiendo algunos experimentos que se derivan de los presentes datos:

- Medir las concentraciones extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en otras regiones cerebrales como el hipotálamo, hipocampo o el área del PPT/LDT. Estas mediciones deben por supuesto hacerse bajo las mismas condiciones experimentales con las cuales fue hecha la presente tesis. Esto permitiría contrastar los presentes datos obtenidos en el bulbo con otras regiones.
- Medir estas concentraciones en el curso temporal de la privación de sueño MOR. Esto ayudaría a saber si en efecto hay etapas en la dinámica de liberación o excreción de estas indolaminas.
- Aplicar 5-HT o algunos de sus agonistas durante el rebote en el NGC para ver si se interfiere con este proceso en particular con la atonía.
- Por el contrario aplicar antagonistas 5-HT o bien llevar a cabo lesiones de la estirpe serotoninérgica en esta área y analizar sus efectos sobre el polisomnograma en animales primero sin manipulación de sueño. En este caso se esperaría facilitar la expresión del sueño MOR.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

Los principales hallazgos son los siguientes:

- Ni las concentraciones extracelulares de 5-HT y 5-HIAA así como el tiempo total de los estados de vigilancia se modifican por la estancia durante 96 h sobre las plataformas de 188 cm².
- En condiciones basales existe un estrecho paralelismo entre los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el núcleo reticular gigantocelular de la rata.
- Durante las horas finales de la privación de sueño MOR, la concentración extracelular de serotonina así como la de 5-HIAA se reducen significativamente en esta región. El efecto sin embargo es más significativo para la serotonina.
- Durante las primeras horas del rebote de sueño MOR, la concentración de serotonina se mantiene muy disminuida pero por el contrario se incrementa la de 5-HIAA.
- La excreción de 5-HIAA es significativamente menor durante el sueño MOR que durante los otros estados de vigilancia.
- La concentración extracelular de 5-HT y 5-HIAA es fuertemente dependiente del nivel de calcio extracelular.
- La infusión de carbacol a nivel de este núcleo genera con una latencia muy breve un estado de vigilia asociado con conducta motora estereotipada. Este estado se revierte rápidamente en cuanto el carbacol deja de estar presente en el líquido extracelular.

REFERENCIAS

1. Adams DB., Cowan CW., Marshall ME., Stark J. **Competitive and territorial fighting: two types of offense in the rat.** *Physiol Behav.* (1994) 55(2):247-254.
2. Arankowsky-Sandoval GF., Aguilar-Roblero R., Prospero-Garcia O., Drucker-Colin R. **Rapid eye movement (REM) sleep and ponto-geniculo-occipital (PGO) spike density are increased by somatic stimulation.** *Brain Res* (1987) 400(1):155-158.
3. Aserinsky E. y Kleitman N. **Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep.** *Science* (1953) 118:273-274.
4. Asikainen M., Deboer T., Porkka-Heiskanen T., Stenberg D., Tobler I. **Sleep deprivation increases brain serotonin turnover in the Djungarian hamster.** *Neurosci Lett* (1995) 198:21-24.
5. Asikainen M., Toppila J., Alanko L., Ward DJ., Stenberg D., Heiskanen-Porkka T. **Sleep deprivation increases brain serotonin turnover in the rat.** *Neuroreport* (1997) 8:1577-1582.
6. Baghdoyan HA., Rodrigo-Angulo ML., McCarley RW., Hobson JA. **Site specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions.** *Brain Res* (1984) 306(1-2):39-52.
7. Ball WA., Hunt WH., Sanford LD., Ross RJ., Morrison AR. **Effects of stimulus intensity on elicited ponto-geniculo-occipital waves.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1991) 78 (1):35-39.
8. Belin MF., Aguera M., Tappaz M., McRae-Deguerce A., Bobillier P., Pujol JF. **GABA-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal gray in the rat: a biochemical and radioautographic study.** *Brain Res* (1979) 170(2):279-97.
9. Benington JH., Kodali SK., Heller HC. **A1 adenosine receptor stimulation mimics changes in non-REM sleep EEG slow-wave activity produced by sleep deprivation in the rat.** *Sleep Res.* (1993)22,4 (abstr.)
10. Benington JH, Woudenber MC, Heller HC. **REM-sleep propensity accumulates during 2-h REM-sleep deprivation in the rest period in rats.** *Neurosci Lett* (1994) 180:76-80
11. Benveniste H. y Hansen A.J. **Practical aspects of using microdialysis for determination of brain interstitial concentrations.** en "Microdialysis in the Neurosciences". Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Vol.7. Elsevier Science Publishers. 1991. pp81-102.
12. Bergmann BM., Seiden LS., Landis CA., Gilliland MA., Rechtschaffen A. **Sleep deprivation in the rat: XVIII. Regional brain levels of monoamines and their metabolites.** *Sleep* (1994) 17(7):583-589.
13. Bergmann BM., y cols. **Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation.** *Sleep* (1989) 12(1):31-41.
14. Berman A.L. **The brain stem of the cat.** (1968). The University of Wisconsin Press
15. Bloom FE., Hoffer BJ., Nelson CN., Sheu Y., Siggins GR. **The physiology and pharmacology of serotonin mediated synapses** en: "Serotonin and Behavior". Barchas J. y Usdin E. Eds. Academic Press (1973) pp249-262.
16. Borbely AA, Steigrad P., Tobler I. **Effect of sleep deprivation on brain serotonin in the rat.** *Behav Brain Res* (1980) 1(2):205-210.

17. Borbely AA. **A two process model of sleep regulation.** *Hum Neurobiol.*(1982) 1(3):195-204.
18. Borbely AA., Nehaus HU., Tobler I. **Effect of p-chlorophenylalanine and tryptophan on sleep, EEG and motor activity in the rat.** *Behav Brain Res* (1981) 2(1):1-22.
19. Borbely AA., Tobler I., Hanagasioglu M. **Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat.** *Behav Brain Res.* (1984) 14(3):171-182.
20. Breisc ST., Zelman FP., Hoebel BG. **Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine.** *Science* (1976) 192:382-384.
21. Bueno OFA., Lobo LL., Oliviera MGM., Gugliano EB., Pomarico AC., Tufik S. **Dissociated paradoxical sleep deprivation effects on inhibitory avoidance and conditioned fear.** *Physiol Behav.* (1994) 56(4):775-779.
22. Bunin MA., Bunin MA., Wightman RM. **Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission.** *J Neurosci.* (1998) 18(13):4854-4860.
23. Casey KL. **Escape elicited by bulbo reticular stimulation in the cat.** *Int. J Neurosci* (1971) 2(1):29-34.
24. Casey KL. **Somatosensory responses of bulboreticular units in awake cat: relation to escape-producing stimuli.** *Science* (1971) 173(991):77-80.
25. Casey KL., Morrow TJ. **Effect of medial bulboreticular and raphe nuclear lesions on the excitation and modulation of supraspinal nocifensive behaviors in the cat.** *Brain Res* (1989) 501(1):150-161.
26. Cespuglio R., Gomez ME., Walker E., Jouvet M. **Effets du refroidissement et de la stimulation des noyaux du systeme du raphe sur les etats de vigilance chez le chat.** *Electroencephalography Clin neurophysiol.* (1979) 47:289-308.
27. Cespuglio R., Sarda N., Gharib A, Chastrette N., Houdouin F., Rampin C., Jouvet M. **Voltametric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat.** *Exp. Brain Res.*(1990)80:121-128.
28. Coenen AML. y Van Luitelaar ELJM. **Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep.** *Physiol Behav.* (1985) 35(4):501-504.
29. Cooper JR., Bloom FE., Roth RH. **Serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine.** en: "The Biochemical Basis of Neuropharmacology". Seventh edition. Oxford University Press.(1996). pp352-409.
30. Cramer H., Tagliamonte A., Tagliamonte P., Perez-Cruet J., Gessa GL. **Stimulation of brain serotonin turnover by paradoxical sleep deprivation in intact and hypophysectomized rats.** *Brain Res* (1973) 54:372-375.
31. Crespi F., Garrat JC., Sleight A.J. Marsden CA. **In vivo evidence that 5-hydroxytryptamine (5-HT) neuronal firing and release are not necessarily correlated with 5-HT metabolism.** *Neuroscience* (1990) 35(1):139-144.
32. Curzon G. y Green AR. **Effects of immobilization on rat liver tryptophan pyrrolase and brain 5-hydroxytryptamine metabolism.** *Br. J. Pharmac.* (1969) 37:689-697.
33. Chan JY., Chan SH., Ong BT., Barnes CD. **Anatomic and physiologic evaluation of a link between the nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus ambiguus in the rat.** *Neurosci Lett* (1986) 67(1):31-36
34. Chan SH. **Arterial pressure and cardiac rhythm-related single-neuron activities in the nucleus reticularis gigantocellularis of the rat.** *J. Auton Nerv Syst* (1985) 13(2):99-109.

35. Chan-Palay. **Indolamine neurons and their processes in normal rat brain and in chronic diet induced thiamine deficiency demonstrated by uptake of ^3H serotonin.** *J Comp. Neurol.* (1977) 176:467-494.
36. Chase MH., Enomoto S., Murakami T., Nakamura Y., Taira M. **Intracellular potential of medullary reticular neurons during sleep and wakefulness.** *Exp. Neurol.* (1981) 71(1):226-233.
37. Chase MH., Morales FR., Boxer PA., Fung SJ., Soja PJ. **Effect of stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis on the membrane potential of cat lumbar motoneurons during sleep and wakefulness.** *Brain Res* (1986) 386(1-2):237-244
38. Dahlström A y Fuxe K. **Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines cell bodies of brain neurons.** *Acta Physiol. Scand* (1964) 62 (Suppl 232) 1-55.
39. Datta S., Siewek DF. **Excitation of the brain stem pedunculopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep.** *J Neurophysiol* (1997) 77(6):2975-2988.
40. De Simoni MG., Sokola A., Fodritto F., Dal Toso G., Algeri S. **Functional meaning of tryptophan-induced increase of 5-HT metabolism as clarified by *in vivo* voltametry.** *Brain Res* (1987) 411(1):89-94.
41. Dement W. **The effect of dream deprivation.** *Science* (1960) 131(3415):1705-1707.
42. Dement WC y Kleitman N. **The relation of eye movements during sleep to dream activity : an objective method for the study of dreaming.** *J. Exp. Psychol.* (1957) 53:339-346.
43. Dement WC. **The occurrence of low voltage, fast electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat.** *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* (1958) 10:291-296.
44. Dement WC., Henriksen S., Ferguson J. **The effect of the chronic administration of parachlorophenylalanine (PCPA) on sleep parameters in the cat.** en "Serotonin and Behavior" Barchas J y Usdin E. Eds. Academic Press (1973) pp419-424.
45. Drucker-Colin R., Bernal-Pedraza J., Fernandez-Cancino F., Morrison AR. **Increasing PGO spikes density by auditory stimulation increases the duration and decreases the latency of rapid eye movement (REM) sleep.** *Brain Res* (1983) 278(1-2):308-312.
46. Dusan-Peyrethon D. **Quantitative study of phasic phenomena of paradoxal sleep during and after its instrumental deprivation.** *C R Seances Soc Biol Fil* (1967) 161(12):2530-2533.
47. El Kafi B., Cespuglio R., Leger L., Marinesco S., Jouvet M. **Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides possessing hypnogenic properties?** *Brain Res* (1994) 637:211-221.
48. El Mansari M., Sakai K., Jouvet M. **Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats.** *Exp Brain Res.* (1989) 76(3):519-529.
49. Elomaa E y Johansson GG. **Daily rhythm of locomotor activity is abolished during rapid eye movement sleep deprivation in the rat.** *Physiol Behav.* (1980) 24(2):327-330.

50. Elomaa E y Johansson GG. **Decision-making to initiate voluntary movements in the rat is altered during deprivation of rapid eye movement sleep.** *Neurosci Lett* (1986) 63:51-55.
51. Elomaa E. y Johansson GG. **Rapid eye movement stage of sleep participates in the generation of the nocturnal meal pattern in the rat.** *Physiol Behav.*(1980) 24:331-336.
52. Everson CA., Gilliland MA., Kushida CA., Pilcher JJ., y cols. **Sleep deprivation in the rat: IX.Recovery.** *Sleep* (1989) 12(1):60-67.
53. Fagerson MH, Barmarck NH. **Responses to vertical vestibular stimulation of neurons in the nucleus reticularis gigantocellularis in rabbits.** *J Neurophysiol.* (1995) 73(6):2378-2391.
54. Farooqui SM., Brock JW., Zhou J. **Changes in monoamines and their metabolite concentration in REM sleep-deprived rat forebrain nuclei.***Pharmacol Biochem Behav.* (1996) 54(2):385-391
55. Feinberg I. y Campbell IG. **Total sleep deprivation in the rat transiently abolishes the delta amplitude response to darkness: implication for the mechanism of the "negative delta rebound".** *J. Neurophysiol* (1993) 70(6):2695-2699.
56. Fernstrom JD y Wurtman RJ. **Control of brain 5-HT content by dietary carbohydrates.** en: "Serotonin and Behavior". Barchas J y Usdin E. Eds. Academic Press.(1973).pp 121-128.
57. Fienberg I., Floyd TC., March JD. **Effects of sleep loss on delta (0.3-3Hz) EEG and eye movement density: new observations and hypotheses.** *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* (1987) 67(3):217-221.
58. Friedman L., Bergmann BM., Rechtschaffen A. **Effects of sleep deprivation on sleepiness, sleep intensity and subsequent sleep in the rat.** *Sleep* (1979) 1(4):369-391.
59. Friedman L., Jones BE. **Study of sleep-wakefulness states by computer graphics and cluster analysis before and after lesions of the pontine tegmentum in the cat.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1984) 57(1):43-56.
60. Fuxe K. **Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine terminals in the central nervous system.** *Acta Physiol. Scand.* (1965) 64 suppl 247:39-85.
61. Gallager DW y Pert A. **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* (1978) 144(2):257-275.
62. Gardner JP., Fornal CA., Jacobs BL. **Effects of sleep deprivation on serotonergic neuronal activity in the dorsal raphe nucleus of the freely moving cat.** *Neuropsychopharmacology* (1997) 17(2):72-81.
63. Goodenough D., Shapiro A., Holden M., Steinschreiber L. **A comparison of "dreamers" and "nondreamers": eye movements, electroencephalograms and the recall of dreams.** *J. of Abnormal and Social Psychol.* (1959) 59:295-302.
64. Graeff FG., Quintero S., Gray JA. **Median raphe stimulation, hippocampal theta rhythm and threat-induced behavioral inhibition.** *Physiol Behav.* (1980) 25(2):253-261.
65. Grahnstedt S., y Ursin R. **Platform sleep deprivation affects deep slow wave sleep in addition to REM sleep.** *Behav Brain Res* (1985) 18(3):233-239.

- 66.Haber LH, Martin RF., Chung JM., Willis WD. **Inhibition and excitation of primate spinothalamic tract neurons by stimulation in region of nucleus reticularis gigantocellularis.** *J Neurophysiol* (1980) 43(6):1578-1593.
- 67.Harandi M., Aguera M., Gamrani H., Didier M., Maitre M., Calas A., Belin MF. **gamma-Aminobutyric acid and 5-hydroxytryptamine interrelationship in the rat nucleus raphe dorsalis: combination of radioautographic and immunocytochemical techniques at light and electron microscopy levels.** *Neuroscience* (1987) 21(1):237-251.
- 68.Hery F., Pujol JF., Lopez M., Macon J., Glowinski J. **Increased synthesis and utilization of serotonin in the central nervous system of the rat during paradoxical sleep deprivation.** *Brain Res.* (1970) 21(3):391-403.
- 69.Hicks RA y Moore JD. **REM sleep deprivation diminishes fear in rats.** *Physiol Behav* (1979) 22(4):689-692.
- 70.Hicks RA., Moore JD., Findley P., Hirshfield C., Humphrey V. **REM sleep deprivation and pain thresholds in rats.** *Percept Mot Skills* (1978) 47(3 Pt1):848-850.
- 71.Hicks RA., Coleman DD., Ferrante F., Sahatjian M., Hawkins J. **Pain threshold in rats during recovery from REM sleep deprivation.** *Percept Mot Skills* 48(3Pt1):687-690.
- 72.Hicks RA., Moore JD., Hayes Ch., Phillips N., Hawkins J. **REM sleep deprivation increases aggressiveness in male rats.** *Physiol Behav* (1979) 22(6):1097-1100.
- 73.Hipólido DC., Raymond R., Tufik S., Nobrega JN. **Autoradiographic analysis of regional brain 5-HT 1A receptor binding after REM sleep deprivation.** *J Sleep Res.* (1998) 7 (Suppl 2):Abstr.233.
- 74.Holmes CJ., Y Jones BE. **Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by citotoxic lesions in the cat.** *Neuroscience* (1994) 62(4):1179-1200.
- 75.Ito K. y McCarley RW. **Alterations in membrane potential and excitability of cat medial pontine reticular formation neurons during changes in naturally occurring sleep-wake states.** *Brain Res.* (1984) 292:169-175.
- 76.Iwakiri H., Matsuyama K., Mori S. **Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: a microdialysis study.** *Neurosci Res* (1993) 18(2):157-170.
- 77.Iwakiri H., Oka T., Takakusaki K., Mori S. **Stimulus effects of the medial pontine reticular formation and the mesencephalic locomotor region upon medullary reticulospinal neurons in acute decerebrate cats.** *Neurosci. Res.* (1995) 23(1):47-53.
- 78.Jacobs BL y Cohen A. **Differential behavioral effects of lesions of the median or dorsal raphe nuclei in rats: open field and pain elicited aggression.** *J Comp Physiol Psychol* (1976) 90(1):102-108.
- 79.Jacobs BL. y Fornal CA. **An integrative role for serotonin in the central nervous system.** en "Handbook of behavioral state control. Cellular and molecular mechanisms". Lydic R. y Baghdoyan HA. CRC Press.USA (1999) pp181-193.
- 80.Jacobs BL., Heym J., Trulsson ME. **Behavioral and physiological correlates of brain serotonergic unit activity.** *J Physiol* (1981) 77(2-3):431-436.
- 81.Jouvet M. **Neuromediators and hypnogenic factors.** *Rev Neurol* (1984) 140 (6-7):389-400.

82. Karczmar AG., Longo VG., Scotti-Carolis A. **A pharmacological model of paradoxical sleep: the role of cholinergic and monoamine systems.** *Physiol Behav.* (1970) 5:175-182.
83. Kaufman LS. y Morrison AR. **Spontaneous and elicited PGO spikes in rats.** *Brain Res* (1981) 214(1):61-72
84. Kawahara M. Kitahata LM., Collins JG., Homma E. **Thiopental suppression of neurons of the nucleus reticularis gigantocellularis of the cat.** *Anesth Analog* (1982) 61 (9):763-766.
85. Kayama Y., Ohta M., Jodo E. **Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness.** *Brain Res.* (1992) 569(2):210-220.
86. Kitahama K., Sallanon M., Okamura H., Geffard M., Jouvét M. **Cells presenting GABA immunoreactivity in the hypothalamus of the cat.** *CR Acad Sci III* (1989) 308(19):507-511.
87. Klein M. **Etude poligraphique et phylogenetique des differents etats de sommeil.** Thèse de Medicine, Lyon. (1963).
88. Kocsis B., y Vertes RP. **Midbrain raphe cell firing and hippocampal theta rhythm in urethane-anaesthetized rats.** *Neuroreport* (1996) 7(18):2867-2872.
89. Kodama T y Honda Y. **Acetylcholine releases of mesopontine PGO-on cells in the lateral geniculate nucleus in sleep-waking cycle and serotonin regulation.** *Prog. Neuropsychopharma Biol. Psych.* (1996) 20(7):1213-1227.
90. Kohler C y Lorenz SA. **Open field activity and avoidance behavior following serotonin depletion: a comparison of the effects of parachlorophenylalanine and electrolytic midbrain raphe lesions.** *Pharmacol Biochem Behav* (1978) 8(3):223-233.
91. Kohlmeier KA., Lopez-Rodriguez F., Morales FR., Chase MH. **Relationship between sensory stimuli-elicited IPSPs in motoneurons and PGO waves during cholinergically induced muscle atonia.** *J Neurophysiol* (1997) 78(4):214-255.
92. Koyama Y., Jodo E., Kayama Y. **Sensory responsiveness of "broad-spike" neurons in the laterodorsal tegmental nucleus, locus coeruleus and dorsal raphe of awake rats: implications for cholinergic and monoaminergic neuron specific responses.** *Neuroscience* (1994) 63(4):1021-1031.
93. Kubin L., Reignier C., Tojima H., Taguchi O., Pack AI., Davies RO. **Changes in serotonin level in the hypoglossal nucleus region during carbachol-induced atonia.** *Brain Res.* (1994) 645:291-302.
94. Kuhn E., Rysánek K., Brodan V. **Alterations of tryptophan metabolism induced by sleep deprivation.** *Experientia* (1968) 24:901.
95. Lai YY y Siegel JM. **Medullary regions mediating atonia.** *J Neurosci* (1988) 8(12):4790-4796
96. Lai YY y Siegel JM. **Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression.** *J Neurosci.* (1991) 11(9):2931-2937
97. Lai YY., Siegel JM., Wilson WJ. **Effect of blood pressure on medial medulla-induced muscle atonia.** *Am J Physiol.* (1987) 252(6 Pt 2):H1249-H1257.
98. Lara-Lemus A. Drucker-Colin R, Mendez-Franco J., Palomero-Rivero M., Perez de la Mora M. **Biochemical effects induced by REM sleep deprivation in naive and in D-amphetamine treated rats.** *Neurobiol* (1998) 6(1):13-22.
99. Le Bars D. **Serotonin and pain.** en "Neuronal Serotonin". Osborne NN y Hamon M. Eds. John Wiley & Sons. (1988) pp 171-230.

100. Ledoux L., Sastre JP., Buda C., Luppi PH., Jouvet M. **Alterations in c-fos expression after different experimental procedures of sleep deprivation in the cat.** *Brain Res* (1996) 735:108-118.
101. Leibowitz SF., Alexander JT. **Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size and body weight.** *Biol Psychiatry* (1998) 44:851-864.
102. Leonard CS y Llinas R. **Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an *in vitro* electrophysiological study.** *Neuroscience* (1994) 59(2):309-330.
103. Levine Es., y Jacobs BL. **Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microinjection studies in the awake cat.** *J Neurosci* (1992) 12(10):4037-4044.
104. Lim HC., Chong OK., Chan SH. **Characterization of alpha-adrenoceptors in the nucleus reticularis gigantocellularis involved in the cardiovascular depressant of guanabenz in the rat.** *Neuropharmacology* (1988) 27(3):243-249.
105. Linthorst AC., Flachskamm C., Muller-Preuss P., Holboer F., Reul JM. **Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal activity and free corticosterone levels: an *in vivo* microdialysis study.** *J Neurosci* (1995) 15(4):2920-2934.
106. Lookingland KJ., Shannon NJ., Chapin DS., Moore KE. **Exogenous tryptophan increases synthesis, storage and intraneuronal metabolism of 5-hydroxytryptamine in the rat hypothalamus.** *J Neurochem* (1986) 47(1):205-212.
107. Lopez-Rodriguez F., Kohlmeier KA., Yamuy J., Morales FR., Chase MH. **Muscle atonia can be induced by carbachol injections into nucleus pontis oralis in cats anesthetized with alpha-chloralose.** *Brain Res* (1995) 699(2):201-207.
108. Luebke JI., Greene RW., Semba K., Kamondi A., McCarley RW., Reiner PB. **Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus *in vitro*.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1992) 89:743-747.
109. Luppi PH, Sakai K, Fort P., Jouvet M. **The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double-labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer.** *J Comp. Neurol* (1988) 277(1):1-20.
110. Lydic R., McCarley RW., Hobson JA. **Enhancement of dorsal raphe discharge by medial pontine reticular formation stimulation depends on behavioral state.** *Neurosci Lett* (1983) 38(1):35-40.
111. Llewelyn MB., Azami J., Roberts MH. **The effect of modification of 5-hydroxytryptamine function in nucleus raphe magnus on nociceptive threshold.** *Brain Res* (1984) 306(1-2):165-170.
112. Madhuit C., Jolas T., Chastanet M., Hamon M., Adrien J. **Reduced inhibitory potency of serotonergic neurons in rats selectively deprived of rapid eye movement sleep.** *Biol. Psychiatry* (1996) 40(1):1000-1007.
113. Mallick BN., Siegel JM., Fahringer H. **Changes in pontine unit activity with REM sleep deprivation.** *Brain Res* (1989) 515:94-98.
114. Manfredi A., Clavenna A., De Simoni MG. **Serotonin uptake inhibition: *in vivo* effect of sertraline in rats.** *Neurosci Lett.* (1992) 139(1):69-72.
115. Martin RF., Jordan LM., Willis WD. **Differential projections of cat medullary raphe neurons demonstrated by retrograde labelling following spinal cord lesions.** *J Comp Neurol.* (1978) 182(1):77-88.

116. Maru E., Takahashi LK., Iwahara S. **Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat.** *Brain Res* (1979) 163(2):223-234.
117. Matsuyama K, Ohta Y., Mori S. **Ascending and descending projections of the nucleus reticularis gigantocellularis in the cat demonstrated by the anterograde neural tracer, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L)** *Brain Res* (1988) 460(1):124-141
118. McCarley RW y Massaquoi SG. **Neurobiological structure of the revised limit cycle reciprocal interaction model of REM cycle control.** *J Sleep Res* (1992) 1:132-138.
119. Merchant-Nancy H., Vázquez J., García F., Drucker-Colín R. **Brain distribution of c-fos expression as a result of prolonged rapid eye movement (REM) sleep period duration.** *Brain Res.* (1995) 681:15-22.
120. Micsek KA., Altman JL., Appel JB., Boggan WO. **Parachlorophenylalanine, serotonin and killing behavior.** *Pharmacol Biochem Behav* (1975) 3(3):355-361.
121. Mikiten TM., Nielby PH., Henndley LD. **EEG desynchronisation during behavioral sleep associated with spike discharge for the thalamus of the cat.** *Fed.Proc.*(1961)20:237
122. Mileikovskii B Yu. **Influence of stimulation of movement-inhibiting areas of the pons on activity of neurons of the medial region of the medulla oblongata.** *Neurosci Behav Physiol* (1994) 24(5):423-428.
123. Miyamoto JK., Uezu E., Yusa T., Terashima SI. **Efflux of 5-HIAA from 5-HT neurons: a membrane potential-dependent process.** *Physiol Behav.* (1990) 47:767-772.
124. Mogilnicka E.. **REM sleep deprivation changes behavioral response to catecholaminergic and serotonergic receptor activation in rats.** *Pharmacol Biochem Behav* (1981) 15(1):149-151.
125. Mohrland JS. McNaus DQ., Gebhart GF. **Lesions in the nucleus reticularis gigantocellularis: effect on the antinociception produced by micro-injection of morphine and focal electrical stimulation in the periaqueductal gray matter.** *Brain Res* (1982) 231:(1):143-152.
126. Moore JD., Hayes Ch., Hicks RA. **REM sleep deprivation increases preferences for novelty in rats.** *Physiol Behav.*(1979) 23(5):975-976.
127. Morden BR., Conner G., Mitchell W., Dement W., Levine S. **Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on shock induced fighting.** *Physiol Behav* (1968) 3:425-432.
128. Moskowitz E y Berger R. **Rapid eye movements and dream imagery: Are they related?** *Nature* (1969) 224:613-614.
129. Myers RD. **The role of hypothalamic serotonin in thermoregulation.** en "Serotonin and Behavior". Barchas J y Usdin E Eds. Academic Press (1973) pp293-302.
130. Nitz D., y Siegel J. **GABA release in the dorsal raphe nucleus: a role in the control of REM sleep.** *Am J Physiol* (1997) Regulatory Integrative Comp.Physiol.42):R451-R455.
131. Olivier B., y Mos J. **Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (1992) 16(6):847-870.
132. Olszewski J y Baxter D. **Cytoarchitecture of human brain stem.** (1954) Karger Basel.
133. Orem J. **Medullary respiratory neuron activity: relationship to tonic and phasic REM sleep.** *J Appl Physiol* (1980) 48(1):54-65.

134. Paxinos G. y Watson CH. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** (1986) Academic Press. Second Edition. Australia.
135. Paxinos G., Burt J., Atrens DM., Jackson DM. **5-hydroxytryptamine depletion with para-chlorophenylalanine: effects on eating, drinking, irritability, muricide and copulation.** *Pharmacol Biochem Behav* (1977) 6(4):439-447.
136. Pearl GS. y Anderson KV. **Neuronal receptive field properties in feline nucleus reticularis gigantocellularis.** *Brain Res Bull* (1978) 3(3):241-244.
137. Peder M., Elomaa E., Johansson G. **Increased aggression after rapid eye movement sleep deprivation in Wistar rats is not influenced by reduction of dimensions of enclosure.** *Behav Neural Biol.* (1986) 45(3):287-291.
138. Pereda AE., Morales FR., Chase MH. **Medullary control of motoneurons during carbachol-induced motor inhibition.** *Brain Res* (1990) 514(1):175-179.
139. Perez NM. y Benedito MAC. **Activities of monoamines oxidase (MAO) A and B in discrete regions of rat brain after rapid eye movement (REM) sleep deprivation.** *Pharmacol Biochem Behav* (1997) 58(2):605-608.
140. Pilcher JJ., Bergmann BM., Refetoff S., Fang VS., Rechtschaffen A. **Sleep deprivation in the rat: XIII. The effect of hypothyroidism on sleep deprivation symptoms.** *Sleep* (1991) 14(3):201-210.
141. Pompeiano M., Cirelli C., Tononi G. **Effects of sleep deprivation on fos-like immunoreactivity in the rat brain.** *Arch Ital Biol* (1992) 130(4):325-335.
142. Popova NK., Nikulina EM., Arav VA., Kudriavtseva NN. **The role of serotonin in one of the types of aggressive behavior--"predatory aggression".** *Fiziol ZH SSSR* (1975) 61(2):183-186.
143. Porkka-Heiskanen T., Strecker RE., Thakkar M., Bjørkum AA., Greene RW., McCarley RW. **Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness.** *Science* (1997) 276:1265-1268.
144. Portas CM., Bjorvatn B., Fagerland S., Gronli J., Mundal V., Sorensen E., Ursin R. **On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat.** *Neuroscience* (1998) 83(3):807-814.
145. Prevot E., Mudhuit C., Le Poul E., Hamon M., Adrien J. **Sleep deprivation reduces the citalopram-induced inhibition of serotonergic neuronal firing in the nucleus raphe dorsalis of the rat.** *J Sleep Res* (1996) 5(4):238-245.
146. Radulovacki M. **Comparison of effects of paradoxical sleep deprivation and immobilization stress on 5-hydroxyindolacetic acid in cerebrospinal fluid.** *Brain Res.* (1973) 60:255-258.
147. Radulovacki M., Virus RM., Djuricic-Nedelson M., Greene RW. **Adenosine analogs and sleep in rats.** *J Pharmacol. Exp. Ther.* (1984) 228:268-274.
148. Rampin C., Cespuglio R., Chastrette N., Jouvet M. **Immobilization stress induces a paradoxical sleep rebound in rat.** *Neurosci Lett.* (1991) 126:113-118.
149. Reuter LE., y Jacobs BL. **A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations.** *Brain Res* (1996) 739(1-2):57-69.
150. Richard CA., Waldrop TG., Bauer RM., Mitchell JH., Stremel RW. **The nucleus reticularis gigantocellularis modulates the cardiopulmonary responses to central and peripheral drives related to exercise.** *Brain Res* (1989) 482(1):49-56.
151. Rimbaud L., Passouant H., Cadilhac J. **Participation de l'hippocampe à la régulation des états de veille et de sommeil.** *Rev Neurol.* (1955) 93:303-308.

152. Robinson TE y Camp DM. **The feasibility of repeated microdialysis for with-subjects design experiments: studies on mesoatrial dopamine system.** en "Microdialysis in the Neurosciences". Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Vol.7. Elsevier Science Publishers.1991. Microdialysis in the Neurosciences. Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Vol.7. Elsevier Science Publishers.1991. pp189-236.
153. Robinson TE y Justice JB. Ed **"Microdialysis in the Neurosciences"**. Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Vol 7. Elsevier Science Publishers.1991 pp.V-XI.
154. Roffwarg HP., Dement WC., Muzio JN., Fischer C. **Dream imagery: relationship to rapid eye movement of sleep.** *Arch Gen.Psychiatr.*(1962) 7:235-258.
155. Roldán RE y Weiss T. **The cycle of sleep in the rat (preliminary report)** *Bol. Inst. Estud. Méd. Biol.Méx* (1962) 20:155-164
156. Rutter JJ y Aurebach SB. **Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin in the rat forebrain.** *Pharmacol Exp Ther* (1993) 265(3):1319-1324.
157. Rye DB., Saper CB., Lee HJ., Wainer BH. **Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: Cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum.** *J Comp. Neurol.* (1987) 259:483-528.
158. Saavedra JM. **Distribution of serotonin and synthesizing enzymes in discrete areas of brain.** *Fed Proc.*(1977) 2134-2141.
159. Salin Pascual R.J. **Neurobioquímica de la depresión en "Bases bioquímicas y farmacológicas de la neuropsiquiatría"**. Mc Graw-Hill-Interamericana (1997) pp95-102.
160. Sallanon M., Denoyer M., Kitahama K., Aubert C., Gay N., Jouvet M. **Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into posterior hypothalamus in the cat.** *Neuroscience* (1989) 32(3)669-683.
161. Sallanon M., Janin M., Buda C., Jouvet M. **Serotonergic Mechanisms and sleep rebound.** *Brain Res* (1983) 268:95-104.
162. Saller ChF., y Srickler EM. **Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine.** *Science* (1976) 192 23 April:385-387.
163. Santos R. y Carlini EA. **Serotonin receptor activation in rats previously deprived of REM sleep.** *Pharmacol Biochem Behav* (1983) 18(4):501-507.
164. Schenkel E., Y Siegel JM. **REM sleep with atonia after lesions of the medial medulla.** *Neurosci Lett* (1989) 98(2):159-165
165. Semba K. **Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat.** *J Comp. Neurol.* (1993) 330:543-556.
166. Semba K. Y Fibiger HC. **Afferent connections of the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro and anterograde transport and immunohistochemical study.** *J Comp. Neurol.* (1992) 232:387-410.
167. Shammah-Lagnado SJ., Negrao N., Silva BA, Ricardo JA. **Afferent connections of the nuclei reticularis pontis oralis and caudalis: a horseradish peroxidase study in the rat.** *Neuroscience* (1987) 20(3):961-989.
168. Sharp T., Bramwell SR., Grahame-Smith DG. **Effect of acute administration of L-tryptophan on the release of 5-HT in rat hippocampus in relation to**

- serotonergic neuronal activity: an *in vivo* microdialysis study.** *Life Sci* (1992) 50(17):1215-1223.
169. Shiromani PY., Kilduff TS., Bloom FE., McCarley RW. **Cholinergically induced REM sleep triggers Fos-like immunoreactivity in dorsolateral pontine regions associated with REM sleep.** *Brain Res.* (1992) 580:351-357.
170. Siegel JM y Mc Ginty DJ. **Pontine reticular formation neurons: relationship of discharge to motor activity.** *Science* 1977 196(4290):678-680.
171. Siegel JM., Nienhuis R., Fahringer HM., Paul R., Shiromani P., Dement WC., Mignot E., Chiu C. **Neuronal activity in narcolepsy: identification of cataplexy-related cells in the medial medulla.** *Science* (1991) 252 (5010):1315-1318.
172. Siegel JM., Nienhuis R., Tomaszewski KS. **REM sleep signs rostral to chronic transections at the pontomedullary junction.** *Neurosci Lett* (1984) 45(3):241-246.
173. Siegel JM., Wheeler RL., McGinty DJ. **Activity of medullary reticular formation neurons in the unrestrained cat during waking and sleep.** *Brain Res* (1979) 179(1):49-60.
174. Snider RS y Neimer W.T. **A stereotaxic atlas of the cat brain.** (1961) The University of Chicago Press.
175. Soja PJ., Morales FR., Barayani A., Chase MH. **Effect of inhibitory amino acid antagonist on IPSPs induced in lumbar motoneurons upon stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis during active sleep.** *Brain Res.* (1987) 423 (1-2):353-358.
176. Stancampiano R., Melis F., Sarais L., Cocco S., Cugusi C., Fadda F. **Acute administration of a tryptophan-free amino acid mixture decreases 5-HT in the rat hippocampus *in vivo*.** *Am J Physiol* (1997) 272(3 Pt 2):R991-994.
177. Steigrad P., Tobler I., Waser PG., Borbely AA. **Effect of p-chlorophenylalanine on cerebral serotonin binding, serotonin concentration and motor activity in the rat.** *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol* (1978) 305(2):143-148.
178. Steinbusch HWM. **Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals.** *Neuroscience* (1981) 6(4):557-618.
179. Steriade M., Pare D., Datta S., Oakson G., Curro Dossi R. **Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves.** *J Neurosci* (1990) 10(8):2560-2579.
180. Stern WC., Miller FP., Cox RH., Maickel RP. **Brain norepinephrine and serotonin levels following REM sleep deprivation in the rat.** *Psychopharmacol* (1971) 22:50-55.
181. Strecker RE., Porkka-Heiskanen T., Thakkar MM., Dauphin L., McCarley RW. **Neuromodulation of the pedunculopontine tegmental nucleus (PPT) in the control of REM sleep as studied by microdialysis.** *Sleep* (1998) 21 (suppl):206.A abstr.
182. Stremel RW., Waldrop TG., Richard CA., Iwamaoto GA. **Cardiorespiratory responses to stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis.** *Brain Res Bull* (1990) 24(1):1-6.
183. Takagi H., Satoh M., Akaike A., Shibata T., Kurashi Y. **The nucleus gigantocellularis of the medulla oblongata is a highly sensitive site in the production of morphine analgesia in the rat.** *Eur J Pharmacol* (1977) 45(1):91-92.
184. Takeuchi Y. **Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain.** en "Neuronal Serotonin". Osborne NN. y Hamon M. Eds. John Wiley & Sons Ltd. (1988):25-55.

185. Thakkar M. y Mallick BN. **Effect of rapid eye movement sleep deprivation on rat brain monoamine oxidases.** *Neuroscience* (1993) 55(3):677-683.
186. Thakkar M., Portas Ch., McCarley RW. **Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep.** *Brain Res.* (1996) 723:223-227.
187. Thakkar MM., Strecker RE., McCarley RW. **Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study.** *J Neurosci* 1(1998) 18(4):5490-5497.
188. Timo-Iaria C. y cols. **Phases and states of sleep in the rat.** *Physiol. Behav.* (1970) 5(9):1057-1062.
189. Toru M., Mitsushio H., Mataga N., Takashima M., Arito H. **Increased brain serotonin metabolism during rebound sleep in sleep-deprived rats.** *Pharmacol Biochem Behav.* (1984) 20(5):757-761.
190. Tozer TN., Neff NH., Brodie BB. **Application of steady state kinetics to the synthesis rate and turnover time of serotonin in the brain of normal and reserpine-treated rats.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1966) 153(2):177-182.
191. Tsuchiya K., Toru M., Kobayashi T. **Sleep deprivation: changes of monoamines and acetylcholine in rat brain.** *Life Sci* (1969) 8(1):867-873.
192. Ungerstedt U. **Introduction to Microdialysis.** en "Microdialysis in the Neurosciences". Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Vol.7. Elsevier Science Publishers. 1991. pp 81-102.
193. Valzelli L., Bernasconi S., Garattini S. **p-Chlorophenylalanine-induced muricidal aggression in male and female laboratory rats.** *Neuropsychobiology* (1981) 7(6):315-320.
194. Van Luijtelaa ELJM y Coenen AML. **Electrophysiological evaluation of three paradoxical sleep deprivation techniques in rats.** *Physiol Behav.* (1986) 36(4):603-609.
195. Van Wijik M., Sebens JB., Korf J. **Probencid-induced increase of 5-hydroxytryptamine synthesis in rat brain, as measured by formation of 5-hydroxytryptophan.** *Psychopharmacology* (1979) 60(3):229-235.
196. Vanni-Mercier G., Sakai K., Lin JS., Jouvet . **Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat.** *Arch Ital Biol* (1989) 127(3):133-164.
197. Vanni-Mercier G., Sakai K., Lin JS., Jouvet M. **Carbachol microinjections in the mediodorsal pontine tegmentum are unable to induce paradoxical sleep after caudal pontine and prebulbar transections in the cat.** *Neurosci Lett* (1991) 130(1):41-45
198. Veasey Sc., Fornal CA., Metzler CW., Jacobs BL. **Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats.** *Neuroscience* (1997) 79(1):161-169.
199. Vergnes M., Depaulis A., Boehrer A., Kempf E. **Selective increase of offensive behavior in the rat following intrahypothalamic 5,7-DHT- induced serotonin depletion.** *Behav Brain Res* (1988) 29(1-2):85-91.
200. Vertes RP y Kocsis B. **Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat.** *J Comp Neurol* (1994) 340(1):11-26.
201. Vertes RP. **Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat.** *J Neurophysiol.* (1979) 42(1):214-228.

202. Vertes RP., Martin GF., Waltzer R. **An autoradiographic analysis of ascending projections from the medullary reticular formation in the rat.** *Neuroscience* (1986) 19(3):873-898.
203. Vertes RP., Kinney GG., Kcsis B., Fortin WJ. **Pharmacological suppression of the median raphe nucleus with serotonin 1A agonists, 8-OH-DPAT and buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat.** *Neuroscience* (1994) 60(2):441-451.
204. Waldbilling RJ., Bartness TJ., Stanley BG. **Disproportionate increases in locomotor activity in response to hormonal and photic stimuli following neurochemical depletions of serotonin.** *Brain Res* (1981) 217(1):79-91.
205. Webster HH, Friedman L., Jones BE. **Modification of paradoxical sleep following transections of the reticular formation at the pontomedullary junction.** *Sleep* (1986) 9(1):1-23.
206. Webster HH., Jones BE. **Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states.** *Brain Res* (1988) 458(2):285-302.
207. Wesemann W. y Weiner N. **Regulation of cerebral serotonin binding and metabolism in sleep-deprived rats.** *Behav Brain Res.* (1982) 6(1):79-84.
208. Wesemann W., Weiner N., Rotsch M., Sculz E. **Serotonin binding in rat brain: circadian rhythm and effect of sleep deprivation.** *J Neural Transm Suppl* (1983) 188:287-94.
209. Westernick BHC y Justice JB. **Microdialysis compared with other *in vivo* release methods.** en "Microdialysis in the Neurosciences". Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Vol 7. Elsevier Science Publishers. 1991 pp.23-46.
210. Westernick BHC. ***In vivo* evidence for presynaptic modulation of neurotransmitters release.** en "Neurotransmitter release and its modulation". Pows DA y Bunn SJ Eds. Cambridge University Press. New York. (1995) pp217-232.
211. Wilkinson LO. y Jacobs BL. **Lack of response of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of freely moving cats to stressful stimuli.** *Exp. Neurol* (1988) 101(3):445-457.
212. Wilkinson LO., Aurebach SB., Jacobs BL. **Extracellular serotonin levels change with behavioral state but not with pyrogen-induced hyperthermia.** *J Neurosci* (1991) 11(9):2732-2741.
213. Williams JA., Reiner P. **Noradrenaline hyperpolarizes identified rat mesopontine cholinergic neurons *in vitro*.** *J Neurosci* (1993) 13(9):3878-3883.
214. Wolf WA., Youdim MB, Kuhn DM. **Does brain 5-HIAA indicate serotonin release or monoamine oxidase activity?** *Eur J. Pharmacol* (1985) 109(3):381-387.
215. Wu MF. y Siegel JM. **Facilitation of the acoustic startle reflex by pontogeniculo-occipital waves: effects of PCPA.** *Brain Res* (1990) 532(1-2):237-241.
216. Wu MF., Mallick BN., Siegel JM. **Lateral geniculate spikes, muscle atonia and startle response elicited by auditory stimuli as a function of stimulus parameters and arousal state.** *Brain Res* (1989) 499(1):7-17.
217. Yamuy J. Mancillas JR., Morales FR., Chase MH. **C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep.** *J. Neurosci.* (1993) 13(6):2703-2718.
218. Yamuy J., Jimenez I., Morales F., Rudomin P., Chase M. **Population synaptic potentials evoked in lumbar motoneurons following stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis during carbachol-induced atonia.** *Brain Res.* (1994) 639(2):313-319.

219. Yamuy J., Sampogna S., Lopez-Rodriguez F., Luppi PH., Morales FR., Chase MH. **Fos and serotonin immunoreactivity in the raphe nuclei of the cat during carbachol-induced active sleep: a double-labeling study.** *Neuroscience* (1995) 67(1):211-223.
220. Yang CC., Chan JY., Chan SH. **Excitatory innervation of caudal hypoglossal nucleus from reticularis gigantocellularis in the rat.** *Neuroscience* (1995) 65(2):365-374.
221. Youngblood BD., Zhou J., Smagin GN., Ryan DH., Harris RB. **Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory.** *Physiol Behav* (1997) 61(2):249-256.
222. Zak R., Radulovacki M. **Quipazine has a biphasic effect on slow wave sleep and reduces REM sleep rebound in REM sleep deprived rats.** *Brain Res Bull* (1982) 8:329-331.
223. Zelman FP., Behbehani MM., Beckstead RM. **Ascending and descending projections from nuclei reticularis magnocellularis and nucleus reticularis gigantocellularis: an autoradiographic and horseradish peroxidase study in the rat.** *Brain Res.* (1984) 292(2):207-220.
224. Zelman FP., Kow LM., Pfaff DW. **Analgesia after lesions of nucleus reticularis magnocellularis: differential effect on supraspinal versus spinal pain reflexes.** *Pain.* (1984) 18(4):221-237.
225. Zelman FP., Kow LM., Pfaff DW. **Effect of interruption of bulbospinal pathways on lordosis, posture and locomotion.** *Exp Neurol* (1983) 81(1):177-194.
226. Zeng SL., Li YQ., Rao ZR., Shi JW. **Projections from serotonin and substance P-like immunoreactive neurons in the midbrain periaqueductal gray onto the nucleus reticularis gigantocellularis pars alpha in the rat.** *Neurosci Lett* (1991) 131(2):205-209.
227. Zhou FC., Tao-Cheng JH., Segu L., Patel T., Wang Y. **Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence.** *Brain Res* (1998) 805(1-2):241-254