

11281

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

"NIVELES EXTRACELULARES DE SEROTONINA Y
ACIDO 5-HIDROXI-INDOLACETICO EN LA FORMACION
RETICULAR BULBAR DURANTE EL SUEÑO
ESPONTANEO Y EN RESPUESTA A LA
PRIVACION DE SUEÑO MOR".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A:

M. en C. CARLOS ANTONIO BLANCO CENTURION

ASESOR PRINCIPAL: DR. RAFAEL J. SALIN PASCUAL

COASESOR: DR. OSCAR PROSPERO GARCIA

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico esta tesis a mi familia que me ha apoyado tanto; en particular a mi querida esposa así como a mi querida madre.

Asimismo estoy en deuda con el pueblo trabajador de México por haber financiado mis estudios de Doctorado. Agradezco también a cada uno de los sinodales sus revisiones a la presente tesis así como muy especialmente al Dr. Priyattam J. Shiromani que me brindó su desinteresada ayuda para poder publicar mi tesis doctoral. Thank you Peter.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
REGULACIÓN DEL SUEÑO MOR: NEURONAS GENERADORAS Y NEURONAS INHIBIDORAS.	7
PAPEL FACILITADOR DE LA SEROTONINA SOBRE EL TONO MUSCULAR DURANTE LOS ESTADOS DE VIGILANCIA.	10
LA FORMACIÓN RETICULAR PONTO-BULBAR Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DEL TONO MUSCULAR DURANTE EL SUEÑO MOR.	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
METODOLOGÍA	15
SUJETOS, CONDICIONES AMBIENTALES GENERALES Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.	15
EXPERIMENTO 1. MEDICIÓN DE LOS NIVELES EXTRACELULARES DE SEROTONINA DURANTE LOS PRINCIPALES ESTADOS DE VIGILANCIA.	16
EXPERIMENTO 2. MEDICIÓN DE LOS NIVELES EXTRACELULARES DE SEROTONINA Y ÁCIDO 5-HIDROXI-INDOLACÉTICO EN RELACIÓN CON LA PRIVACIÓN SELECTIVA DE SUEÑO MOR.	18
HPLC-ECD	20
RESULTADOS	21
UBICACIÓN ANATÓMICA DE LAS SONDAS DE MICRODIÁLISIS. ...	21
NIVELES EXTRACELULARES DE SEROTONINA DURANTE LOS PRINCIPALES ESTADOS DE VIGILANCIA.	22
NIVELES EXTRACELULARES DE SEROTONINA Y 5-HIAA EN RELACIÓN CON LA PRIVACIÓN SELECTIVA DE SUEÑO MOR.	24
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Resumen

El sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) es un estado de actividad cerebral que se presenta cíclicamente cuando los animales homeotermos duermen. Asimismo la cantidad de sueño MOR está regulada en forma homeostática. Actualmente se hipotetiza que el sueño MOR es el resultado de la interacción entre dos conjuntos de neuronas cerebrales. Un tipo de neuronas se encargaría de generar y mantener este estado mientras que el otro inhibiría su ocurrencia. Se postula que las neuronas serotoninérgicas representan una parte del conjunto de estas neuronas que inhiben al sueño MOR ya que se muestran selectivamente inactivas durante el sueño MOR. Consistente con esta inactividad durante el sueño MOR, es el hecho de que la liberación de serotonina es mínima en muchas regiones del cerebro durante este estado. Así por ejemplo en la formación reticular pontina, la liberación es máxima durante la vigilia, intermedia durante el sueño lento y mínima durante el sueño MOR. Empero a la fecha nadie ha reportado qué ocurre con la liberación de serotonina durante los diferentes estados de vigilancia en la formación reticular del bulbo raquídeo. En conjunto la formación reticular pontina y bulbar esta involucrada importantemente en la generación y mantenimiento del sueño MOR. Asimismo la formación reticular bulbar regula un fenómeno cardinal del sueño MOR; la atonía muscular. Se sugiere también que la serotonina estaría participando en la regulación del tono muscular. Mas aún nadie sabe qué ocurre con la liberación de serotonina durante el rebote de sueño MOR. En el presente estudio se utilizó la técnica de muestreo de microdiálisis acoplada con la cromatografía de líquidos de alta presión-detección electroquímica, para medir la liberación de serotonina así como su principal metabolito (5-HIAA) en la formación reticular bulbar a lo largo de los diferentes estados de vigilancia, durante la privación selectiva de sueño MOR así como durante el rebote de sueño MOR. Se encontró que en comparación a la vigilia, la liberación de serotonina fue significativamente menor durante el sueño, en especial durante el sueño MOR. Independientemente del estado de vigilancia, los niveles extracelulares de serotonina y los de 5-HIAA se redujeron drásticamente durante la privación de sueño MOR. Durante el rebote de sueño MOR, la liberación de serotonina se mantuvo significativamente disminuida; por el contrario aumentó significativamente para el caso de 5-HIAA. Adicionalmente, cuando se consideraron los estados de vigilancia se observó que los niveles de serotonina fueron significativamente bajos cuando el animal estuvo preponderantemente dormido que cuando estuvo despierto. En conjunto estos datos apoyan la hipótesis acerca de que la neurotransmisión serotoninérgica constituye un elemento permisivo para el sueño MOR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract

Rapid eye movement (REM) sleep is hypothesized to result from the activity of REM sleep-generating and REM sleep-inhibiting neurons. The serotonergic neurons of the raphe nuclei represents one such populations of REM-sleep inhibiting neurons since they are silent only during REM sleep. Consistent with the decrease in activity of 5-HT neurons, the brain extracellular levels of serotonin are lower during REM sleep compared to wakefulness. It is not known whether serotonin release is also reduced as a consequence of REM sleep rebound. Using microdialysis sampling coupled to HPLC-ECD, we measured the extracellular levels of 5-HT and its metabolite (5-HIAA) in the medial medullary reticular formation (mMRF) of freely behaving rats during normal sleep, REM sleep deprivation as well as during REM sleep rebound. We found that the levels 5-HT and 5-HIAA were significantly decreased by REM sleep deprivation. The reduction of 5-HT release was maintained during REM sleep rebound but the extracellular level of its main metabolite was increased. In addition, even during REM sleep rebound, 5-HT release during sleep was low compared to wakefulness. Taken together these data support the permissive role of 5-HT neurotransmission for REM sleep expression.

Note: The present study has already been published in a peer-review journal. Its complete reference is Blanco-Centurion C.A., Salin-Pascual R.J. "Extracellular serotonin levels in the medullary reticular formation during normal sleep and after REM sleep deprivation". *Brain Res* (2001) Vol. 923 pp. 128-136.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introducción

En la gran mayoría de los animales homeotermos la actividad eléctrica registrada en poblaciones amplias de neuronas cerebrales (EEG) cursa por tres estados diferentes [102]. [121]. Conjuntamente con estos cambios en la actividad del cerebro, se modifica el nivel de actividad eléctrica registrada en los músculos (EMG) bajo control voluntario. Considerando estas dos variables se han descrito las siguientes fases o estados de vigilia:

- ❑ La **vigilia** caracterizada por la predominancia de la actividad eléctrica de rápida frecuencia y bajo voltaje (actividad desincronizada) acompañada de un alto grado de tono muscular.
- ❑ El **sueño de ondas lentas** caracterizado por la preponderancia de actividad eléctrica cerebral de baja frecuencia y alto voltaje (actividad sincronizada) asociada con un grado intermedio de tono muscular.
- ❑ El **sueño de movimientos oculares rápidos (MOR)** que se caracteriza por la presencia de actividad eléctrica cerebral desincronizada similar a la vigilia pero a diferencia de ésta, durante el sueño MOR el tono muscular alcanza su nivel espontáneo más bajo (atonía muscular).

Además en la especie humana se ha observado que las ensoñaciones se asocian frecuentemente con el sueño MOR [14]. Este hecho hizo que en forma incidental se descubriera otra propiedad del sueño MOR; su regulación homeostática. Así fue que cuando se privó de sueño MOR a voluntarios para eliminar simultáneamente las ensoñaciones, se observó que aumentaba también el número de intentos de entrar al sueño MOR. Finalmente luego que al sujeto se le permitió dormir *ad libitum*, la cantidad de sueño MOR aumentó significativamente con respecto al periodo previo a la privación. Este fenómeno se le denominó rebote de sueño MOR [13]. El rebote de sueño MOR no es consecuencia del aumento de vigilia durante la privación ya que no se presenta en sujetos que son despertados por el mismo tiempo pero durante el sueño de ondas lentas. El rebote de sueño MOR con características similares se ha observado en otras especies de mamíferos distintas al humano como es la rata [105], ó el gato [48]. Estos hallazgos indican que el cerebro de los mamíferos tiene la capacidad de detectar y compensar la pérdida del sueño MOR. Esta respuesta es vital para el organismo ya que se ha visto que la privación experimental crónica y selectiva de esta fase de sueño conduce inevitablemente a la muerte [2].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Regulación del sueño MOR: neuronas generadoras y neuronas inhibitoras.

Actualmente se cree que el sueño MOR esta regulado a nivel del tallo cerebral por distintos fenotipos neuronales [61]. Entre estos se piensa que un subconjunto de neuronas colinérgicas ubicadas en el tegmento laterodorsal y el pedunculopontino-complejo parabraquial (LDTg/PPTg+PB) juegan un papel clave en la generación de este tipo de sueño. Como evidencia de esto se sabe que la estimulación colinérgica de la región ventral del Locus Coeruleus (LC) produce un fenómeno muy similar al sueño MOR [107]. Se ha visto también que existe un grupo de neuronas en el LDTg/PPTg+PB que solo disparan durante el sueño MOR [36],[73]. Dado que varias de las neuronas colinérgicas del LDTg/PPTg+PB proyectan descendentemente hacia la región ventral del LC [79], es posible que algunas de estas proyecciones provengan precisamente de aquellas células activas solo durante el sueño MOR. En la parte de la formación reticular medial pontina (mPRF) correspondiente a la parte ventral del LC también existen neuronas que se despolarizan exclusivamente durante el sueño MOR [31]. Ya que la estimulación colinérgica (vía receptores muscarínicos no-M1) es capaz de generar estas mismas respuestas electrofisiológicas en algunas neuronas de la mPRF [30],[84],[108], se postula que la liberación de acetilcolina proveniente del LDT/PPTg+PB constituye uno de los mecanismos neurofisiológicos claves para la generación del sueño MOR. Como evidencia adicional de esta hipótesis se encuentra que la estimulación eléctrica de la región del LDT/PPTg+PB en efecto genera un aumento de la liberación de acetilcolina en la mPRF [53], así como de sueño MOR [100]. Además se ha medido que en la mPRF, la liberación espontánea de acetilcolina es máxima durante el sueño MOR [39]. Finalmente luego de que se lesiona más del 60% de la población de células colinérgicas en el LDT/PPTg+PB, el sueño MOR resulta eliminado transitoria y selectivamente para luego retornar muy disminuido mostrando características aberrantes [112].

Las neuronas colinérgicas del LDT/PPTg+PB no solo envían terminales a lo largo de la formación reticular del tallo cerebral, también proyectan hacia varias regiones del cerebro anterior como son el tálamo, la formación hipocámpal y el cerebro basal anterior [80]. Se postula que estas proyecciones ascendentes son las encargadas de producir ciertos fenómenos presentes durante el sueño MOR como son la actividad desincronizada cortical, el ritmo teta hipocámpal y las ondas PGO mientras que las hacen sinápsis en la formación reticular del tallo cerebral regulan otros aspectos del mismo fenómeno como la atonía muscular y los movimientos oculares rápidos [80]. Asimismo se ha visto que en estas neuronas colinérgicas se colocan otros neurotransmisores como glutamato, atriopetina, CRF, y óxido nítrico [80]. Al respecto es relevante apuntar que al igual que sucede con la estimulación de los receptores colinérgicos tipo no-M₁, la estimulación de los receptores glutamatérgicos no-NMDA de la formación reticular ponto-bulbar

también induce sueño MOR [65] o atonía muscular [89]. No se conoce si este glutamato proviene de las mismas neuronas colinérgicas o de otras neuronas dentro de la formación reticular. Esto último es posible ya que no todas las neuronas que muestran un patrón de disparo selectivo del sueño MOR, son colinérgicas [75]. Se postula que estas otras neuronas no-colinérgicas contienen además de glutamato otros neurotransmisores como GABA, VIP, CRF, neurotensina o galanina [80]. Al respecto la administración de VIP a la formación reticular pontina incrementa el sueño MOR [+4] o en el caso del CRF produce atonía muscular [+4]. Por otro lado el bloqueo de los receptores GABA_A en la mPRF genera también un incremento de sueño MOR [116]. Por todo ello se propone que el sueño MOR no se genera exclusivamente por el subconjunto de neuronas colinérgicas selectivamente activas durante el sueño MOR, sino que además pudieran participar otras neuronas reticulares no-colinérgicas ubicadas en la misma área del LDTg/PPTg+PB y/o en la formación reticular medial pontina. En apoyo de esta última idea está el hecho que luego de una transección completa que separe al LDTg/PPTg de la parte caudal de la mPRF, se elimina permanentemente cualquier signo característico del sueño MOR en cualquiera de los dos lados [88]. Esta misma transección también elimina el sueño MOR producido por la inyección de carbacol en la formación reticular pontina [106]. Esto sugiere que ni las neuronas colinérgicas o no-colinérgicas del LDT/PPTg+PB por un lado, ni las neuronas reticulares ponto-bulbares por el otro, son capaces por si mismas de generar y mantener el sueño MOR. Se deduce entonces que durante el sueño MOR espontáneo o inducido con carbacol, diferentes grupos neuronales deben de estar interactuando positivamente para así iniciar y mantener este estado de vigilancia. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que existen neuronas que disparan durante el sueño MOR, no sólo en el LDTg/PPTg+PB y en la mPRF, sino además en la formación reticular del bulbo raquídeo [89].

El hecho antes mencionado acerca de que el bloqueo de los receptores GABA_A en la mPRF de lugar al aumento del sueño MOR sugiere por otro lado que durante este estado, las neuronas GABAérgicas que proyectan hacia o se ubican en esta región pudieran estar selectivamente inactivas. Puesto que la transmisión GABAérgica es fundamentalmente inhibitoria, se puede especular que estas neuronas estarían inhibiendo a las neuronas generadoras del sueño MOR durante la vigilia y el sueño de ondas lentas. Durante el sueño MOR cesaría esta inhibición. A la fecha no se sabe si esto es cierto para el caso de las neuronas GABAérgicas que proyectan a la formación reticular ponto-bulbar. Sin embargo, sí se conoce que existen al menos otros dos distintos fenotipos neuronales que se muestran selectivamente inactivos durante el sueño MOR. Por un lado se encuentran las neuronas del LC. Debido a que el LC es un agregado casi homogéneo de neuronas inmunoreactivas a Dopamina-β-hidroxilasa, se postula que muy posiblemente estas células selectivamente inactivas durante el sueño MOR utilicen noradrenalina como neurotransmisor [1]. En apoyo del papel inhibitorio de la noradrenalina sobre el sueño MOR, se ha visto que la estimulación de los

receptores adrenérgicos α_2 hiperpolariza a las células colinérgicas del LDTg/PPTg+PB [115]. Además se conoce que el LC proyecta hacia la región del LDTg/PPTg+PB [78] e inerva a la formación reticular ponto-bulbar [79]. Igualmente la aplicación de noradrenalina a la parte ventral del LC inhibe el sueño MOR [12] y bloquea el efecto inductor de sueño MOR producido por la estimulación colinérgica de esta región [11]. Recientemente se ha medido que la liberación espontánea de noradrenalina durante el sueño MOR es mínima en la parte ventral del LC [86] como es de esperarse si estuviese inhibiendo a algunas de las neuronas generadoras del sueño MOR.

Respecto a la otra población de neuronas inactivas únicamente durante el sueño MOR, se trata de células presuntamente serotoninérgicas en los núcleos del rafe. Se aplica el calificativo de presuntas ya que a diferencia de la homogeneidad neuroquímica del LC, en los núcleos del rafe existen otros fenotipos distintos a las neuronas serotoninérgicas [91]. Empero existe evidencia que señala que muy posiblemente son las neuronas serotoninérgicas del rafe, en particular del rafe dorsal, las que juegan un papel en la modulación del sueño MOR. Por ejemplo las células silentes únicamente durante el sueño MOR del rafe dorsal inhiben su descarga durante la vigilia por la aplicación del agonista para el autoreceptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT [21],[34]. Lo anterior sugiere que probablemente estas células sean serotoninérgicas. Además luego de la aplicación de 8-OH-DPAT en el rafe dorsal, la concentración extracelular de serotonina se ve disminuida en este sitio y se produce además un aumento del sueño MOR [71]. De la misma forma se conoce que durante el sueño MOR la concentración extracelular de serotonina es mínima en varias áreas cerebrales [67],[114], incluyendo al LDTg/PPTg [96] y a la mPRF [32]. Ya que el patrón temporal de liberación serotoninérgica es análogo al patrón temporal de disparo observado en las células del rafe [21],[62], se propone que son precisamente las neuronas presuntamente serotoninérgicas las que están inactivas durante el sueño MOR. También se sabe que las neuronas serotoninérgicas de los núcleos mesencefálicos del rafe proyectan tanto a la región del LDTg/PPTg+PB [78] como a la formación reticular [79]. Asimismo, se ha visto que la estimulación de los receptores post-sinápticos serotoninérgicos tipo 5HT_{1A} hiperpolariza a las células colinérgicas *in vivo* [95],[101] e *in vitro* [51]. En particular esta inhibición ocurre sobre las neuronas selectivamente activas durante el sueño MOR pero no ocurre así con aquellas que están activas tanto en vigilia como durante el sueño MOR [101]. La estimulación de los receptores 5 HT_{1A} en el área del LDTg/PPTg igualmente inhibe al sueño MOR [95]. En resumen y basado en todo lo anterior se propone que tanto las neuronas noradrenérgicas del LC, como las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe constituyen neuronas inhibitorias para las células que generan el sueño MOR. Se sugiere que esta inhibición ocurre durante el sueño de ondas lentas y especialmente durante la vigilia y cuando esta inhibición cesa, el sueño MOR puede ocurrir [61].

Por otro lado durante el **rebote de sueño MOR** ocurren cambios de actividad tanto en las células colinérgicas del LDTg/PPTg+PB como en las células serotoninérgicas y noradrenérgicas del tegmento mesopontino. Estos cambios de actividad son congruentes con la idea de que ambos grupos celulares regulan en forma diferente al sueño MOR. Se ha visto que hay un aumento de actividad en las células colinérgicas del LDTg/PPTg durante el rebote de sueño MOR [59]. Este incremento de actividad en las neuronas colinérgicas se correlaciona positivamente con la cantidad de rebote de sueño MOR. Por el contrario se observó un decremento en el número de células serotoninérgicas activas en los núcleos del rafe y de las células noradrenérgicas del LC [58],[59]. Estos decrementos de actividad también correlacionaron positivamente con la cantidad de rebote de sueño MOR. Así pues es posible que durante el rebote de sueño MOR ocurra una disminución importante en la actividad de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas que en consecuencia daría lugar a un aumento de actividad en las células colinérgicas generadoras del sueño MOR. Este aumento de actividad explicaría el rebote de este tipo de sueño. Estudios de actividad unitaria realizados durante la privación de sueño MOR también apoyan esta hipótesis. En estos se ha visto que las células selectivamente activas durante el sueño MOR incrementan su tasa de disparo mientras que aquellas selectivamente inactivas muestran un efecto contrario[57].

Papel facilitador de la serotonina sobre el tono muscular durante los estados de vigilia.

Otros estudios indican que durante el sueño MOR el papel inhibitorio propuesto para las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe guarda estrecha relación con la atonía muscular. Esta conclusión se deriva en parte de estudiar el patrón de disparo de neuronas del rafe dorsal en animales que muestran sueño MOR sin atonía muscular [104] así como en animales que se les induce atonía muscular durante la vigilia [93]. En el primer caso se vio que durante el sueño MOR sin atonía muscular, la tasa de disparo de las células del rafe dorsal se incrementó en lugar de reducirse como ocurre normalmente. De hecho los animales que desplegaron el mayor grado de actividad motora durante el sueño MOR, presentaron el mayor incremento en la tasa de disparo de las células del rafe dorsal. Por el contrario durante los episodios inducidos de cataplexia, las neuronas de este núcleo se mostraron silentes no obstante que el animal fuera capaz de seguir con la mirada un estímulo visual. De igual forma se ha reportado que en animales normales, las neuronas del rafe dorsal incrementan su tasa de disparo del 100 al 400% en respuesta a ciertos tipos de actividad motora como es la masticación, el lamido o el acicalamiento [34]; por el contrario se muestran silentes en respuesta a estímulos novedosos que producen inhibición motora. Las neuronas del rafe bulbar también incrementan su actividad durante la locomoción [34]. Asimismo se ha visto que la aplicación de serotonina en la mPRF es capaz de bloquear la atonía muscular inducida con la administración de carbacol a la región ventral del

LC [97]. Dado que en la mPRF están presentes neuronas que excitan a motoneuronas espinales [69], parece lógico suponer que la serotonina pudiera jugar un papel facilitador sobre el tono muscular al activar a estas neuronas retículo-espinales. Adicionalmente se puede presuponer que la inactividad selectiva observada en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe durante el sueño MOR, constituiría un factor desfacilitatorio que iría a la par con la inhibición que ocurre sobre las motoneuronas. Es sabido que durante el sueño MOR ocurre una intensa inhibición sobre las motoneuronas espinales [9]. Así pues ambos procesos desfacilitación e inhibición irían a la par para que ocurriera la atonía muscular durante el sueño MOR.

La formación reticular ponto-bulbar y su papel en la regulación del tono muscular durante el sueño MOR.

Actualmente se propone que la atonía muscular durante el sueño MOR se lleva a cabo por neuronas localizadas paramedialmente a lo largo de la formación reticular ponto-bulbar [89],[98]. Estas regiones proyectan hacia los núcleos motores del tallo cerebral así como de la médula espinal [69],[119]. Asimismo se sabe que la estimulación eléctrica [22],[55], colinérgica [43] o glutamatérgica no-NMDA, [46] tanto de la región ventral del LC, como más caudalmente al nivel del núcleo reticular giganteocelular (bulbo raquídeo) produce atonía muscular en animales intactos o decerebrados. Por el contrario la lesión de estas mismas regiones produce sueño MOR sin atonía muscular [83],[85]. Registros intracelulares en la formación reticular bulbar señalan que muchas de las células ahí presentes se despolarizan tónicamente a lo largo de episodios de atonía muscular durante el sueño MOR. La formación reticular pontina y bulbar actúan en concierto para producir esta inhibición ya que se ha visto que la estimulación eléctrica del núcleo reticular giganteocelular no fue capaz de producir atonía muscular en animales con transección ponto-bulbar mientras que sí lo fue en animales donde la transección se hizo por delante del puente [87]. Lo mismo sucedió cuando se inactivó temporalmente a la mPRF con lidocaína [40]. En apoyo de la existencia de esta interacción positiva entre puente y bulbo durante el sueño MOR se ha visto que sólo durante este estado, la estimulación de la formación reticular bulbar produce potenciales post-sinápticos excitatorios en las neuronas reticulares pontinas [31]. Además los estudios con trazadores han puesto en evidencia la fuerte inervación recíproca existente entre ambas regiones [19],[60],[81].

Se ha descubierto también que la región pontina inhibitoria del tono muscular así como también la región mesencefálica locomotora (PPTg-núcleo cuneiforme) excitan a la formación reticular bulbar [33]. Lo anterior indica que el núcleo reticular giganteocelular puede considerarse como una vía común para la generación tanto de la atonía muscular como de la facilitación motora. La estimulación de la región PPTg-núcleo cuneiforme también es capaz de inhibir a otras neuronas de la formación reticular bulbar. Sin embargo ambos efectos son congruentes para la función de generación del sueño MOR porque

las células que se inhiben son fundamentalmente aquellas que responden a la estimulación somato-sensorial mientras que las que se activan son células reticuloespinales que inhiben a motoneuronas [33].

Actualmente se conoce bastante acerca de la conexión del núcleo reticular gigantocelular con motoneuronas lumbares. En el gato intacto, descerebrado o anestesiado se observa que esta conexión es tanto inhibitoria como excitatoria [7],[8]. La conexión excitatoria involucra menor número de sinápsis intermedias que la inhibitoria. Además se sabe que en un animal intacto la magnitud de los potenciales post-sinápticos excitatorios no se modifica en el transcurso del sueño o la vigilia mientras que la magnitud de los potenciales post-sinápticos inhibitorios si presenta importantes modificaciones relacionadas con los estado de vigilancia. La influencia sobre la excitabilidad de las motoneuronas lumbares durante la vigilia y el sueño de ondas lentas es menor. Sin embargo durante el sueño MOR, se ve incrementada la amplitud de estos potenciales inhibitorios en tal proporción que puede bloquear la generación de espigas antidrómicas generadas desde el nervio periférico. Esta potente inhibición sobre las motoneuronas lumbares durante el sueño MOR, esta mediada por glicina y no por GABA. De este modo los estudios electrofisiológicos también brindan soporte a la idea que el núcleo reticular gigantocelular es una vía común para aumentar o disminuir la excitabilidad de las motoneuronas espinales. Empero la vía inhibitoria aparece ser preponderante durante el sueño MOR y estar mediada por interneuronas inhibitorias glicinérgicas. ¿Qué papel pudiera jugar la serotonina en este aspecto?

La idea acerca de la función divalente de la formación reticular en relación con el tono muscular se ve apoyada por los experimentos que han medido la liberación de acetilcolina y serotonina [32],[39]. Tanto las células colinérgicas la región del LDTg/PPTg como las células serotoninérgicas en los núcleos del rafe proyectan hacia la formación reticular ponto-bulbar [79],[110],[118],[120]. Esto en principio sugiere que las células reticulares encargadas de producir la atonía muscular estarían siendo moduladas por aferencias colinérgicas y serotoninérgicas. Así es posible especular que durante el sueño MOR la aferencia colinérgica esté relativamente mas activa, con respecto al nivel de la aferencia serotoninérgica. En efecto, durante el sueño MOR al nivel de la mPRF, la liberación de serotonina es mínima [32] mientras que la de acetilcolina es máxima [39]. Por el contrario durante la vigilia esta relación se invierte. Además se conoce que en la formación reticular bulbar, la liberación de acetilcolina [38] es igualmente máxima durante el SMOR. Empero, a la fecha no se sabe qué ocurre con respecto a la liberación de serotonina en esta región del tallo cerebral. Es por esto importante conocer si en esta región clave para la regulación del tono muscular, la liberación de serotonina resulta ser mínima durante el estado fisiológico donde este tono es naturalmente mínimo. De ser así se reforzaría la hipótesis de que los mismos mecanismos que modulan el tono muscular al

nivel de la formación reticular pontina también están presentes al nivel de la formación reticular del bulbo raquídeo. Más aún nadie ha reportado qué ocurre con la liberación serotoninérgica a consecuencia de la privación selectiva de sueño MOR. De ser cierto que el rebote de sueño MOR esta asociado con decrementos en la actividad de las células serotoninérgicas es de esperarse que se observe una disminución en la concentración extracelular de este neurotransmisor.

Hipótesis

De acuerdo al modelo antes descrito es de esperarse que si la serotonina juega un papel facilitador sobre el tono muscular al nivel del núcleo reticular gigantocelular, los niveles extracelulares de serotonina en esta estructura sean mínimos durante el sueño MOR ya que durante este estado, el tono muscular es mínimo también. Además es de esperarse que la liberación de serotonina disminuya en respuesta a la privación de sueño MOR ya que esta maniobra ha sido asociada con una disminución de la actividad de las neuronas serotoninérgicas que proyectan a la formación reticular bulbar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Objetivos

El propósito del presente trabajo, fue estudiar la liberación de serotonina así como su principal metabolito (5-HIAA) en la formación reticular bulbar. Este estudio abarcó la medición de la liberación serotoninérgica en tres diferentes condiciones;

- a) Durante la ocurrencia natural de los diferentes estados de vigilancia (vigilia, sueño de ondas lentas y sueño MOR)
- b) Durante la privación selectiva de sueño MOR
- c) Durante el rebote de sueño MOR

Para estudiar la liberación de serotonina bajo estas condiciones se utilizó la técnica de muestreo de microdiálisis acoplada con la cromatografía de líquidos de alta presión-detección electroquímica (HPLC-ECD).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Metodología

Sujetos, condiciones ambientales generales y procedimiento quirúrgico.

Como sujetos experimentales se utilizaron veintidós ratas machos de la variedad Wistar cuyo peso estuvo entre 250-300 g al momento de la cirugía. Durante todo el experimento se mantuvieron a los animales aislados y bajo un régimen de fotoperíodo 12:12 h (las luces se encendían automáticamente las 8:00 am). Las ratas siempre se mantuvieron dentro de ambientes con temperatura regulada (18-25° C) así como tuvieron acceso *ad libitum* de agua potable fresca así como alimento comercial.

Para la implantación de los dispositivos de microdiálisis y registro de sueño, se anestesiaron profundamente a los animales con una mezcla de droperidol (0.25 mg/kg; IM) y ketamina (100 mg/kg; IP). En un aparato estereotáxico se les colocó unilateralmente una cánula-gufa (BAS) dirigida hacia la formación reticular paramedial bulbar utilizando las siguientes coordenadas: P: -2.0 (usando la línea interaural como referente); L: +0.4; V: -8.0 mm. por debajo de la superficie de la dura madre. La implantación de esta cánula permitió que en el día del experimento, la sonda de microdiálisis fuera dirigida con precisión hacia la región de estudio sin necesidad de reanestesiarse al animal. Además dado que el extremo de la cánula quedó 1 mm por arriba de la región de estudio, no se comprometió la integridad de esta área durante el periodo de recuperación.

Para realizar el registro de sueño se colocaron seis electrodos de acero inoxidable barnizados excepto por 3 mm en la punta. Estos electrodos se enredaron a tornillos miniatura del mismo material que previamente fueron fijados bilateralmente en diferentes locaciones en el cráneo de la rata. Un par de tornillos se colocó en los huesos nasales, otro par se colocó 2 milímetros por delante de *Bregma* en los huesos frontales y el último par se atornilló 2 mm delante de *Lambda* en cada uno de los huesos parietales. Los electrodos de tornillo quedaron en estrecho contacto con la superficie cerebral y permitieron así registrar la actividad eléctrica de grandes poblaciones de neuronas a nivel cortical (ECoG). Para el registro del tono muscular (EMG) se utilizó otro par de electrodos de acero inoxidable que se insertaron profunda y bilateralmente dentro de los músculos elevadores del cuello. El conjunto de los ocho electrodos fue soldado a un conector macho de ocho puntas. Posteriormente este conector así como la cánula guía para microdiálisis se fijaron permanentemente al cráneo con cemento dental, se suturó la piel que cubre al cráneo y se aplicó una dosis única de penicilina G benzatínica (1,200,000 U IM). Finalmente se aguardó un periodo de dos semanas para que los animales se recuperasen plenamente de la cirugía.

Experimento 1. Medición de los niveles extracelulares de serotonina durante los principales estados de vigilia.

En este experimento se utilizaron cinco ratas para determinar el nivel de la liberación de serotonina durante episodios espontáneos de vigilia, sueño de ondas lentas así como durante el sueño MOR. Una vez que las ratas se recuperaron de la cirugía, se habituaron al ambiente experimental durante tres sesiones consecutivas de 4 h cada una de las 16:00 a las 20:00 h. Esta habituación consistió en colocar al animal dentro del aparato de colecta de microdializados en libre movimiento y engancharlo simultáneamente al brazo-balancín de éste y al cable que transmite la señal del ECoG y EMG hacia el oscilógrafo. Este dispositivo de colecta estaba a su vez colocado dentro de una cámara sonoamortiguada, con sistema de ventilación y con vidrio de observación unidireccional. Mediante la observación a través del vidrio y al registro polisomnográfico se pudo constatar que al cabo de tres sesiones, el animal desplegaba una conducta normal y exhibía los tres principales estados de vigilia a estudiar. A las 8:00 am. del cuarto día se instaló otra vez al animal en el ambiente experimental, se extrajo el estilete que ocluía la cánula y se le insertó en su lugar una sonda nueva comercial de microdialísis (1 mm de longitud de membrana; BAS). La diálisis cerebral también inició en ese momento. El líquido de perfusión que se utilizó consistió en líquido cefalorraquídeo artificial, filtrado (0.2 μm) y mantenido 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, HCO_3^- 23 mM, H_2PO_4^- 1.5 mM (osmolaridad total= 312 mM) y pH 7.4. La velocidad de flujo para este experimento fue 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Con esta velocidad de flujo, el tiempo de muestreo fue de 2 min. debido a que el volumen del inyector del HPLC era de 5 μL . Este tiempo de muestreo permitió coleccionar muestras para cada estado de vigilia, incluido el sueño MOR cuya duración promedio en la rata es de 2 min. A partir de las 16:00 y hasta las 20:00 h de ese mismo día, se coleccionaron varias muestras durante cada estado de vigilia. En total se coleccionaron 58 muestras; 18 correspondientes a vigilia, 19 durante el sueño de ondas lentas y 21 durante el sueño MOR. Debido al volumen muerto presente en la tubería de salida, siempre existió un retraso constante entre lo que se registraba en el oscilógrafo con respecto a lo que se estaba coleccionando con la microdialísis. Empero, siempre se tomó en cuenta este valor de retraso (2 min.) para aparear en forma precisa cada muestra con su estado de vigilia. Las muestras fueron coleccionadas por control remoto en un colector refrigerado (4°C; CMA), se acidificaron inmediatamente (pH=2) y luego se analizaron in fresco en el HPLC-ECD. Luego de terminada la colecta, se sacó la sonda de microdialísis, se colocó de nuevo el estilete dentro la cánula-gufa y se reubicó a la rata en su jaula habitual por una semana más.

Para la identificación de la vigilia, el sueño de ondas lentas y el sueño MOR se utilizaron dos diferentes derivaciones para la señal ECoG (fronto-frontal y fronto-occipital) junto con la señal EMG. Además durante toda la

colecta, el registro visual de la conducta de la rata sirvió como criterio adicional y definitivo para la identificación precisa del estado de vigilancia en cuestión. La actividad eléctrica cortical y muscular se amplió diferencialmente ($\mu\text{V}/\text{mm}$), se filtró según el caso (0.3-35 Hz. para el ECoG; 15-70 Hz para el EMG) para luego registrarse simultáneamente en tiempo real sobre papel (15 mm/seg) en un oscilógrafo de ocho canales (GRASS Serie 6). La calificación de estos registros fue realizada visualmente sobre la base de los siguientes criterios. La vigilia se identificó por la presencia de actividad tónica desincronizada en ambas derivaciones ECoG junto con una señal EMG de gran amplitud. Asimismo durante la vigilia se presentaron periodos de actividad teta en una o ambas derivaciones (5-8 Hz) que coincidían con la exhibición de actividad locomotora o más comúnmente con actividad exploratoria olfativa. En adición a estas conductas, la vigilia registrada en el oscilógrafo siempre estuvo asociada a otras conductas como la alimentación, el acicalamiento, el rascado, los cambios de postura, la ingesta de agua, etc. Por otro lado el sueño de onda lenta fue caracterizado por la presencia de un fondo de actividad cortical sincronizada de baja frecuencia-alto voltaje más ráfagas ocasionales de husos de sueño (actividad fusiforme de ondas en la banda de los 12-15 Hz.) asociado todo esto con un nivel menor de actividad EMG en comparación a la vigilia. Durante el sueño de ondas lentas siempre se observó al animal en una postura relajada, comúnmente acostado sobre un costado formando un ovillo, con los párpados cerrados o semi-cerrados así como su respiración era lenta comparada con la vigilia. En lo que respecta al sueño MOR, este se caracterizó por la presencia de actividad cortical desincronizada en la derivación fronto-frontal, actividad teta hipersincrónica en la derivación fronto-occipital más la presencia de un fondo de atonía muscular. Sobre este fondo de atonía muscular se presentaron espigas de actividad fáscica en el EMG que frecuentemente coincidieron con breves (< 1 seg.) mioclonías observadas en los músculos del hocico, ojos y en algunos casos de las extremidades. Durante el sueño MOR la rata siempre se observó completamente relajada, acostada sobre el piso, con los ojos cerrados así como su respiración era acelerada e irregular en comparación con el sueño de ondas lentas. En todos los casos se consideró una época mínima de 2 min. para coleccionar los microdializados.

A la semana siguiente de la colecta las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de Nembutal (800 mg/kg IP), profundizada vía intracardíaca con solución salina 0.9 % y luego con solución de buffer de formaldehído al 10%. El cerebro fue extraído y post-fijado en soluciones que contenían sacarosa (10,20,30 %) -formaldehído por varios días a 4° C. Posteriormente el cerebro fue seccionado transversalmente en cortes de 50 μm , montado en portaobjetos gelatinizados y teñido con violeta de cresilo. Esta tinción facilitó la visualización de la huella que dejó la cánula así como la sonda de microdialísis. Estas huellas se caracterizaron no sólo por la presencia de una evaginación en el piso del cuarto ventrículo generada por el extremo distal de la cánula-guía sino además porque en la zona donde estuvo la membrana, se

observó una fuerte reacción gliótica evidenciada por la presencia de numerosas células diminutas globiformes e intensamente teñidas con la violeta de cresilo (Figura 1). Las locaciones donde estuvieron las sondas de microdiálisis fueron registradas en láminas representativas tomadas del atlas del cerebro de la rata [68].

Experimento 2. Medición de los niveles extracelulares de serotonina y ácido 5-hidroxi-indolacético en relación con la privación selectiva de sueño MOR.

En este experimento se utilizaron diecisiete ratas que fueron subdivididas aleatoriamente en los siguientes tres grupos: jaula normal (n=5), pedestal ancho (n=5) y pedestal de privación de sueño MOR (n=7). Como se señaló previamente las ratas fueron implantadas dos semanas atrás con una cánulagufa de microdiálisis en la región paramedial de la formación reticular bulbar así como con electrodos para el registro de los estados de vigilancia. Para la privación selectiva de sueño MOR se utilizó el método de la "isla". Este consiste en colocar al animal sobre un pedestal que medía 6.5 cm de diámetro. El pedestal estaba fijo al fondo de un contenedor donde se vertió agua potable hasta un nivel donde el pedestal sobresalía 5 cm. Dada la natural aversión de las ratas por el agua, estas prefirieron mantenerse en todo momento sobre el pedestal (el contenedor tenía una tapa enrejada así que no había posibilidad de escape). La dimensión reducida del pedestal imposibilitó que la rata pudiera relajarse por completo al momento de dormir. Debido a que el sueño MOR se caracteriza por la presencia de atonía muscular generalizada se entiende que para llevarse a cabo normalmente, el animal debe estar dormido sobre una superficie que le permita sustentar todo el peso de su cuerpo al momento en que el tono muscular desaparece. El pedestal estrecho impide que el animal durmiera en sueño MOR ya que al iniciarse la atonía muscular, la rata cae al agua y consiguientemente se interrumpe este estado. Como control de este ambiente se utilizó un pedestal más ancho (15.5 cm de diámetro) en donde los animales pudieron relajarse completamente a la hora de dormir y en consecuencia el sueño MOR se presentara sin impedimentos. Sin embargo, como este pedestal también estuvo rodeado de agua, las ratas se veían forzadas a permanecer sobre esta "isla" todo el tiempo del experimento. Para obtener los valores de línea-base se utilizaron a las ratas que permanecieron en sus jaulas normales con cama de aserrín.

Las ratas permanecieron sobre los pedestales por 92 h consecutivas iniciándose a las 20:00 h (inicio de la fase oscura). Dos periodos de descanso diario de una hora cada uno fueron programados durante el experimento (8:00 y 20:00 h). Durante los mismos se cambió el agua de los contenedores y mientras tanto las ratas fueron retornadas a sus jaulas normales en donde se les permitió conducirse normalmente exceptuando que no se les dejó dormir. Para corroborar el efecto los dos diferentes pedestales sobre los

estados de vigilancia, se llevaron a cabo registros de sueño en los animales de ambos grupos por 4 h de las 16:00 a las 20:00 durante el segundo (44-48 h) y tercer (68-72 h) día de estancia sobre los pedestales. Estos registros se llevaron a cabo preservando las condiciones experimentales y además se hicieron dentro de una cámara sonoamortiguada. Se calificó los registros visualmente en vigilia, sueño de ondas lentas y sueño MOR siguiendo los criterios antes mencionados excepto que en este caso la época mínima fue de 5 seg. La reducción en la duración de la época mínima se hizo para que todo el sueño MOR que se registrara fuera cuantificado. Para obtener el valor representativo para cada rata durante esta condición se promediaron los dos registros. Al finalizar el segundo registro de sueño, se insertó la sonda de microdialísis (1 mm de longitud de membrana, BAS) así como se empezó a dializar con líquido cefalorraquídeo artificial cuyas características fueron idénticas a las del experimento 1. Dieciséis horas después de la inserción de la sonda (88 h sobre las plataformas), se inició la colecta de microdializados estando aún los animales sobre sus respectivos pedestales. Este muestreo se llevó a cabo por 4 h de las 12:00 a las 16:00 h. Simultáneamente se registró polisomnográficamente a los animales. Por el hecho de que este registro no se llevó a cabo a la misma hora que todos los demás, no se promedió con los obtenidos durante el segundo y tercer día pero sí se usó para correlacionar las muestras con los estados de vigilancia. En este experimento el flujo de perfusión fue de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min.}$ y no así de 2.5 $\mu\text{L}/\text{min.}$ como en el caso del experimento 1. Esto se hizo así ya que los experimentos piloto demostraron que a consecuencia de la privación de sueño MOR, la recuperación de serotonina obtenida con flujo de 2.5 $\mu\text{L}/\text{min.}$ estuvo por debajo de los límites del sistema HPLC-ECD (0.05 fmol/5 μL). Al disminuir este flujo de perfusión a 0.5 $\mu\text{L}/\text{min.}$ se consiguió obtener consistentemente picos de serotonina con un cociente de señal/ruido por encima de 3:1. Esto sin embargo hizo que ya no se pudiera colectar por estado de vigilancia como inicialmente se había planeado hacer ya que ahora se requería de un tiempo cercano a los 12 min. para llenar el inyector. No obstante con la ayuda de los registros polisomnográficos fue posible correlacionar posteriormente cada muestra con los estados de vigilancia presentes al momento de su colecta. Solo se utilizaron para este análisis muestras en las cuales los animales estuvieron mas del 75% del tiempo despiertos o dormidos en una combinación cualesquiera de sueño de ondas lentas con sueño MOR.

A las 92 h de estancia sobre los pedestales, se regresó a los sujetos a sus jaulas habituales. En esta condición la colecta de microdializados continuó por otras 4 h más de las 16:00 a las 20:00 h. Cuatro o más muestras de 12 min. se obtuvieron por cada rata. Las muestras fueron colectadas igualmente por control remoto en un colector refrigerado, acidificadas y analizadas en fresco para serotonina así como para 5-HIAA. Igualmente se obtuvo un registro polisomnográfico de estas cuatro horas. En este caso el registro sirvió no sólo para correlacionar los estados de vigilancia presentes en cada muestra sino además sirvió para obtener el valor representativo del rebote de sueño MOR.

En el caso de los animales mantenidos siempre en las jaulas habituales, la colecta de microdializados se llevó a cabo igualmente de 16:00 a 20:00 h (dieciséis horas después del comienzo de la perfusión) y con el mismo flujo utilizado en las ratas sobre los pedestales (0.5 μ L/ min.). Al finalizar la colecta y el registro de sueño, se extrajo la sonda de microdiálisis, se reinsertó el estilete en la cánula y se retornaron a los animales a sus jaulas normales por una semana adicional. Posteriormente se procedió a sacrificarlos y a llevar a cabo el análisis *post-mortem* de las locaciones de las sondas del mismo modo que fue ya descrito para el experimento anterior.

HPLC-ECD

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 de octadecilsilica tipo "microbore" (C-18, 100 x 1 mm, 3 μ M; BAS). La fase móvil utilizada fue una solución acuosa de ácido monocloroacético 100mM (buffer), octilsulfato de sodio 0.65 mM (par aniónico), EDTA•2Na 1-2 mM (quelante férrico), acetonitrilo 5 % y tetrahidrofurano 1.2 % v:v (bases orgánicas) ajustada a pH= 3.2 con NaOH. La velocidad de flujo fue de 0.08 ml/min. Una vez separadas, la oxidación de la serotonina y el 5-HIAA 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 corriente generada por la serotonina mientras que para 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 y concentración de los picos cromatográficos correspondientes a la serotonina y al 5-HIAA se constató al comparar los tiempos de retención de los analíticos contra los obtenidos con estándares de referencia comerciales (SIGMA) de concentración conocida. La inyección de los estándares se hizo antes, durante y después de las corridas. La identificación la daba automáticamente el programa de análisis cromatográfico del HPLC con un margen de error del 5% (Gilson 715). Asimismo, las áreas bajo los picos fueron calculadas también automáticamente por el programa de análisis del HPLC. Finalmente los datos de concentración relativa (fmol/5 μ L) fueron comparados estadísticamente entre los grupos por medio de una ANOVA y luego una prueba "t" para muestras independientes a un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando un programa estadístico (Microcal Origin Ver 4.0).

Resultados

Ubicación anatómica de las sondas de microdiálisis.

Gracias a la tinción con violeta de cresilo se pudo distinguir sin ambigüedad los sitios donde quedaron las sondas de microdiálisis, en particular la porción activa de éstas; la membrana. En general la punta de la cánula-guía quedó un milímetro por debajo del piso del cuarto ventrículo frecuentemente produciendo una evaginación en esta cavidad así como gliosis a nivel del parénquima nervioso. El lugar donde estuvo la membrana quedó definido mediante un agregado de diminutas células esféricas teñidas fuertemente con violeta de cresilo. Posiblemente estas correspondan a células gliales. De hecho la forma de este agregado celular es muy semejante a la forma cilíndrica que tiene la punta de la sonda de microdiálisis (Figura 1).

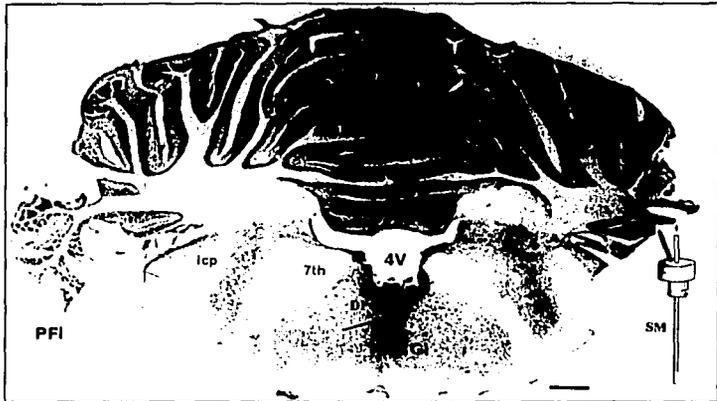


Figura 1. Microfotografía en blanco y negro de un corte transversal del bulbo donde se observa la huella dejada por la sonda de microdiálisis. El tejido fue teñido con violeta de cresilo. La flecha apunta hacia la huella que dejó la membrana de microdiálisis una semana después de haber sido insertada en el animal. Nótese como el agregado de células intensamente teñidas con violeta de cresilo delinea la forma del extremo distal de la sonda de microdiálisis (SM) así como la longitud de ésta corresponde a la de la membrana (1 mm.). 4V= cuarto ventrículo, 7th= raíz ascendente del nervio facial, icp= pedúnculo cerebeloso inferior, DPGi= núcleo dorsal paraventricular, Gi= núcleo reticular gigantocelular, PFI= lóbulo cerebeloso parafloccular. SM representa un dibujo a escala de la sonda de microdiálisis utilizada en este estudio. La escala de la parte inferior derecha representa 1 mm.

Los análisis *post-mortem* indicaron que en todos los casos las sondas de microdiálisis se ubicaron paramedialmente dentro de la formación reticular bulbar desde la proximidad de la unión bulbo-pontina hasta el nivel del núcleo del tracto solitario (Figura 2). Las huellas de las veintidós sondas se observaron dentro de una región relativamente amplia que comprendió a los siguientes núcleos: reticular gigantocelular, reticular gigantocelular *pars alfa*, dorsal paragigantocelular y reticular intermedio. No se observaron huellas de las sondas en la parte lateral de la formación reticular bulbar correspondiente al núcleo reticular parvocelular o al núcleo lateral paragigantocelular así como tampoco a nivel del núcleo del nervio facial. Del mismo modo no se encontraron huellas de sondas medialmente dentro de los núcleos del rafe bulbar o dentro del fascículo longitudinal medio.

Niveles extracelulares de serotonina durante los principales estados de vigilia.

Durante el sueño MOR se encontró que la concentración extracelular de serotonina fue significativamente menor que durante el sueño de ondas lentas o la vigilia (Tabla 1). No hubo diferencia significativa en la concentración de serotonina entre el sueño de ondas lentas y la vigilia. Empero cuando se agruparon los valores correspondientes a sueño total (sueño de ondas lentas + sueño MOR) y se compararon con respecto a los valores obtenidos durante la vigilia, se encontró que durante el sueño la liberación de serotonina estuvo significativamente disminuida. Estos resultados señalan que durante el sueño y en especial durante el MOR, la liberación de serotonina en la formación reticular bulbar es menor comparativamente a la vigilia.

Estado	Concentración media (\pm FSM)	Número de muestras	N
Vigilia	51.6 (7.6)	18	5
Sueño de Ondas Lentas	30.4 (7.9)	19	5
Sueño MOR	4.7 (5.4) * **	21	5
Sueño Total	26.3 (5.8)*	40	5

Tabla 1. Niveles extracelulares de serotonina en la formación reticular bulbar a lo largo de ciclo sueño-vigilia. Los datos fueron obtenidos al agrupar muestras de 5 ratas durante episodios de cada uno de los tres principales estados de vigilancia. La calificación de estos estados se hizo visualmente sobre la base de criterios convencionales (época mínima = 2 min.). En total se colectaron 36 min. de vigilia, 38 min. de sueño lento y 42 min. de sueño MOR. Los valores representan concentraciones relativas expresadas como fmol/5 μ L. Una prueba "t" para muestras independientes fue usada para comparar estadísticamente los datos. * = $p < 0.05$ vs. sueño de ondas lentas ; ** = $p < 0.001$ vs. vigilia, \diamond = $p < 0.05$ vs. vigilia.

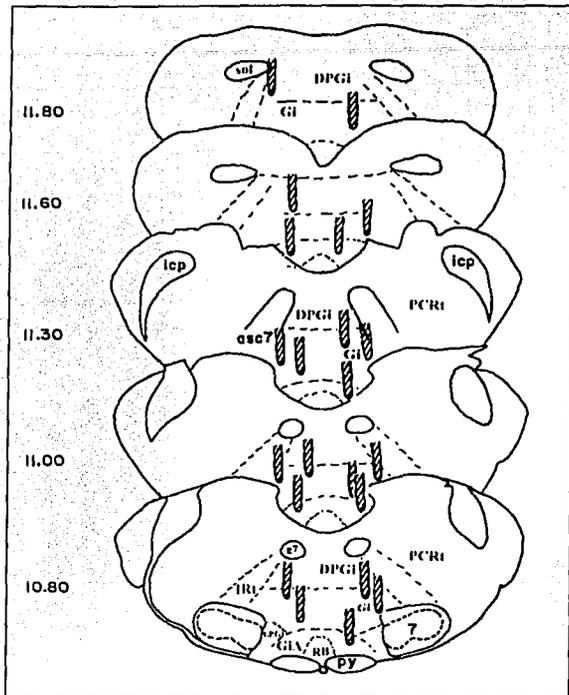


Figura 2. Posición anatómica de las membranas de microdiálisis en series de cortes transversales a nivel del bulbo raquídeo. Las huellas donde quedaron las membranas de microdiálisis fueron ubicadas bajo el microscopio gracias a la gliosis generada por éstas una semana después de retiradas del parénquima nervioso. Las huellas de las sondas fueron representadas como barras sobre los esquemas correspondientes del atlas de Paxinos & Watson [68]. Los números del lado izquierdo representan las coordenadas antero-posteriores en milímetros a partir de Bregma. El cerebelo fue omitido por razones de espacio, no obstante fue utilizado también como referente para ubicar el plano antero-posterior de las sondas. 7= núcleo del nervio facial, asc7= raíz ascendente del nervio facial, icp= pedúnculo cerebeloso inferior, py= tracto corticoespinal, g7= rodilla del nervio facial, Gi= núcleo reticular gigantocelular, GiA= núcleo reticular gigantocelular *pars alpha*, DPGi= núcleo dorsal paragigantocelular, IRi= núcleo reticular intermedio, LPGi= núcleo lateral paragigantocelular PCRi= núcleo reticular parvocelular, RB= núcleos del rafe bulbar (magno+pálido=), sol= núcleo del tracto solitario.

Niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA en relación con la privación selectiva de sueño MOR.

Los registros polisomnográficos obtenidos durante el segundo y tercer día de estancia sobre pedestales demostraron que sólo los sujetos colocados sobre el pedestal angosto (6.5 cm. de diámetro) mostraron alteraciones significativas en los porcentajes de sueño MOR y vigilia comparados con animales que permanecieron en sus jaulas normales (Tabla 2). Dada la reducida superficie de sustentación del pedestal, los animales perdían el balance al momento de presentarse la relajación postural durante el sueño, especialmente al inicio del sueño MOR. Esto produjo una constante interrupción de este estado. De este modo el porcentaje de sueño MOR en estos animales prácticamente desapareció durante los periodos registrados (Figura 3).

Estado	Jaula normal % (± ESM)	Periodo sobre los pedestales		Periodo post - pedestal	
		Pedestal ancho % (± ESM)	Pedestal angosto % (± ESM)	Pedestal ancho % (± ESM)	Pedestal angosto % (± ESM)
Vigilia	24.9 (5.7)	25.6 (4.5)	48.3 (3.2)***	26.1 (3.8)	24.8 (5.0)
Sueño de Ondas Lentas	61.6 (4.8)	63.1 (3.5)	51.1 (3.2)	62.3 (2.8)	39.9 (3.6)**
Sueño MOR	13.1 (2.4)	10.6 (2.7)	0.8 (0.2)****	12.9 (2.5)	35.8 (3.8)****

Tabla 2. Efecto de la estancia encima de dos diferentes tipos de pedestales sobre el porcentaje de cada estado de vigilancia. Las ratas permanecieron por 92 h sobre los pedestales. Pedestal ancho = 15.5 cm. de diámetro; Pedestal angosto = 6.5 cm. de diámetro. Todos los registros fueron llevados a cabo de las 16:00 a las 20:00 h. La calificación fue realizada visualmente siguiendo criterios convencionales incluyendo criterios conductuales (ver método). La época mínima fue de 5 seg. Los valores del periodo sobre los pedestales son un promedio de dos registros obtenidos durante el segundo y tercer día. **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ vs. jaula normal.

Durante el periodo sobre el pedestal angosto el sueño MOR se redujo en un 96% ($p < 0.0001$). Por el contrario el porcentaje de vigilia aumentó un 89% en estos animales. Esto también se debió a las constantes pérdidas de balance que obligaban al animal a despertarse para reajustar la postura. En la mayoría de los casos, estas caídas fueron leves de forma que rara vez la rata se mojaba ostensiblemente. La vigilia aumentó debida a un aumento en el número de episodios ($p < 0.0001$) pero no así en la duración de los mismos. El porcentaje total de sueño de ondas lentas no se vio modificado significativamente aunque si se observó una reducción significativa en la duración promedio de los

episodios de sueño de ondas lentas ($p < 0.0001$). Esta reducción se debió igualmente a las constantes pérdidas de balance sobre la plataforma. Lo anterior era de esperarse ya que un cierto grado de relajación muscular también es característico del sueño de ondas lentas. No obstante desde que simultáneamente a la reducción en la duración de los episodios de sueño lento se presentó un aumento significativo ($p < 0.001$) en el número de episodios de este tipo de sueño, se dio como resultado que el porcentaje total no se viera modificado significativamente. Por otro lado los animales que permanecieron sobre los pedestales de 15.5 cm. de diámetro no mostraron diferencias significativas con respecto a los animales en jaulas normales en los porcentajes de cualquiera de los estados de vigilancia.

Después que se permitió a los animales dormir de nuevo dentro de sus jaulas habituales, se observó que aquellos que habían permanecido sobre los pedestales angostos mostraron un rebote significativo de sueño MOR a lo largo de las cuatro horas posteriores a la privación (Tabla 2; $p < 0.0001$). El sueño MOR aumentó en un 173% con respecto a la cantidad expresada por animales que permanecieron siempre dentro de sus jaulas normales (Figura 3). Durante el rebote de sueño MOR aumentó significativamente el número de episodios ($p < 0.001$) de este tipo de sueño pero no se modificó la duración de los mismos. Asimismo el rebote de sueño MOR se dio a expensas de una reducción significativa del sueño de ondas lentas ($p < 0.01$). Este se redujo en un 35% con respecto a la basal. Por el contrario el porcentaje de vigilia no se vio modificada en estos animales. Por otro lado cuando se les permitió dormir de nuevo en su jaula habitual a los animales que permanecieron sobre los pedestales anchos, no se observó ningún cambio significativo en los porcentajes de cualquiera de los estados de vigilancia.

En resumen los anteriores resultados muestran que los pedestales de 6.5 cm. de diámetro constituyeron un método efectivo de privación selectiva del sueño MOR así como que posterior a la estancia sobre estos por 92 h, aumentó significativamente la cantidad de este tipo de sueño.

Por otro lado los niveles extracelulares de serotonina encontrados en animales privados de sueño MOR estuvieron significativamente bajos comparados con los hallados en animales sin perturbaciones del sueño (Figura 4). Este efecto de disminución significativa en la liberación de serotonina durante la privación se continuó durante el rebote de sueño MOR (Tabla 3). En contraste no hubo diferencia significativa en los niveles extracelulares de serotonina en los animales mantenidos sobre los pedestales anchos. Esto indica que la disminución en la liberación de serotonina encontrada en los animales sobre pedestales angostos se asocia con la pérdida de sueño MOR y no así con el estrés que genera el ambiente experimental.

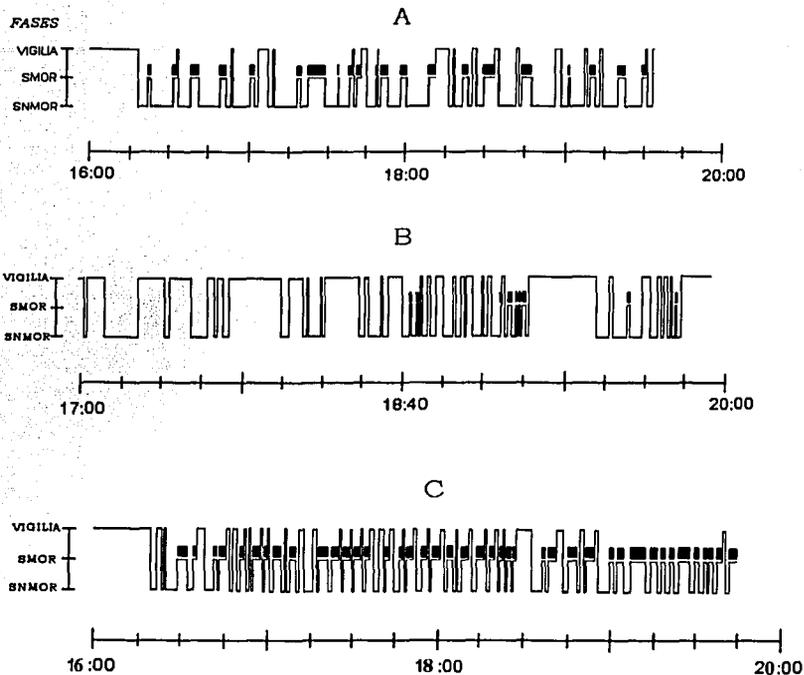


Figura 3. Hipnogramas representativos que muestran los efectos de la privación de sueño MOR. Panel A= hipnograma de un sujeto que permaneció en su jaula normal. Panel B= hipnograma de una rata que permaneció sobre el pedestal de 6.5 cm. de diámetro. Panel C= inmediatamente después que esta misma rata se le permitió dormir *ad libitum* en su jaula normal. 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 sueño MOR se observa un incremento en los episodios de vigilia. Mientras que en el periodo posterior a la estancia sobre el pedestal angosto, el sueño MOR aumenta importantemente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

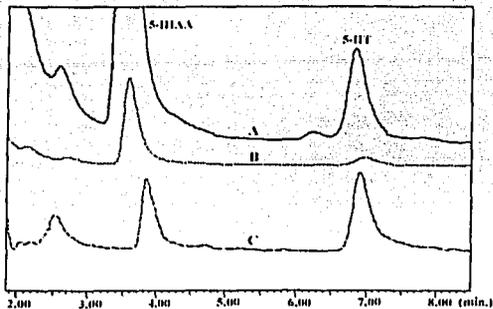


Figura 4. Efecto de la privación sobre la concentración extracelular de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). A= muestra de microdializado obtenida de una rata mantenida en su jaula normal. B= muestra proveniente de un sujeto privado de sueño MOR. C= inyección que contenía una mezcla de estándares externos de referencia (25 fmol/cu). Nótese cómo la privación de sueño MOR disminuye la altura de ambos picos. Asimismo véase cómo coinciden los tiempos de retención entre las muestras y los estándares. El eje horizontal representa el tiempo de retención. Los nombres de los picos correspondientes fueron colocados en la proximidad de estos. Dado que la sensibilidad del potenciómetro en los tres casos estuvo ajustada para leer la corriente de oxidación de la serotonina (0.5 nA/V), el pico de 5-HIAA mostrado en el panel A se muestra fuera de escala.

	5-HT	5-HIAA
	Media \pm ESM (n)	Media \pm ESM (n)
Jaula normal	21.26 \pm 2.21 (23)	340.8 \pm 29.7 (38)
Pedestal ancho	20.32 \pm 3.12 (20)	345.3 \pm 32.1 (29)
Pedestal para privación de sueño MOR	0.23 \pm 0.02**** (24)	230.6 \pm 18.6* (34)
Rebote de sueño MOR	1.07 \pm 0.41**** (20)	588.2 \pm 63.3** (51)

Tabla 3. Niveles extracelulares de serotonina (5-HT) y ácido hidroxi-indolacético (5-HIAA) en la formación reticular paramedial bulbar en respuesta a la privación de sueño MOR. Los valores están expresados como fmol/muestra. El volumen de muestra fue 5 μ L. Los números en paréntesis son el total de muestras para cada condición. Para el caso de la 5-HT en total 276 min. fueron colectados del grupo que estuvo en las jaulas normales, 240 min. para el grupo pedestal ancho, 288 min. cuando los animales estaban siendo privados de sueño MOR y 240 min. durante el periodo de rebote de sueño MOR. Debido que los valores post-plataforma en los

animales que estuvieron sobre pedestales anchos no fueron estadísticamente diferentes de aquellos obtenidos durante el periodo sobre la plataforma ni tampoco de los valores basales, estos no aparecen en la tabla. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.0001$. En todos los casos las comparaciones estadísticas fueron hechas con respecto al grupo jaula normal.

Del mismo modo que ocurrió con la serotonina, los niveles extracelulares de 5-HIAA fueron significativamente menores durante la privación de sueño MOR ($p < 0.05$). La magnitud relativa de esta reducción en la excreción de 5-HIAA fue aún menor a la observada en el caso de la serotonina. Durante la privación de sueño MOR los niveles de 5-HIAA se redujeron 32% mientras que los de serotonina disminuyeron más de 99%. En contraste durante el rebote de sueño MOR, los niveles de excreción de 5-HIAA fueron significativamente más altos (73%). Así, la liberación de serotonina y la excreción de su principal metabolito fueron afectadas diferentemente por el rebote de sueño MOR.

La relación funcional entre la liberación de serotonina y la excreción de su principal metabolito fue examinada más profundamente removiendo el calcio del líquido cefalorraquídeo artificial. Cuando se removió el calcio, tanto los niveles de serotonina como de 5-HIAA disminuyeron significativamente ($p < 0.05$, Figura 5). Sin embargo de nuevo los efectos resultaron ser más pronunciados sobre la serotonina que sobre su metabolito. La concentración promedio de serotonina se redujo en un 70% mientras que la de 5-HIAA se redujo sólo 35%. Después de que el calcio fue restablecido en el líquido de perfusión, los niveles extracelulares retornaron rápidamente a los valores previos (5-HT=0.14, 5-HIAA=185.6 fmol/ 5 μ L). Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de degradación de serotonina que es en cierta medida independiente de su recaptura. Esta degradación independiente de la recaptura fue muy alta durante el rebote de sueño MOR como se señaló anteriormente.

Gracias a que durante la colecta de muestras se registró polisomnográficamente a los animales fue posible investigar la relación entre la concentración de serotonina y los estados de vigilancia. Empero ya que el tiempo de colecta de 12 min. no permitió realizar un muestreo por cada estado de vigilancia por separado, sólo se utilizaron en este análisis muestras colectadas mientras que la rata estuvo más del 75% del tiempo ya sea en vigilia o dormida (sueño lento + sueño MOR). Así se encontró que los niveles de serotonina exhibidos cuando la rata estuvo más del 75% del tiempo de muestreo despierta fueron significativamente mayores que cuando estuvo dormida (Figura 6). Lo anterior fue cierto no sólo para la condición basal como era de esperarse sino además durante el rebote de sueño MOR. El porcentaje de decremento en los niveles de serotonina exhibido durante periodos de abundante sueño fue de 47.6 y 81.5% para la condición basal y para el rebote de sueño MOR respectivamente. En resumen

independientemente de los estados de vigilancia, la concentración extracelular de serotonina al nivel de la formación reticular paramedial bulbar estuvo fuertemente disminuida durante el rebote de sueño MOR. Sin embargo esta reducción fue todavía mayor en el caso de que el animal estuviese durmiendo. Esto confirma los resultados que fueron expuestos anteriormente en el caso de animales sin perturbaciones de los estados de vigilancia donde se mostró también que durante el sueño, la liberación de serotonina es menor que durante la vigilia.

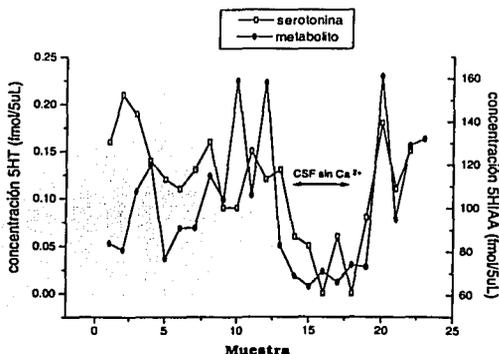


Figura 5. Efectos de la sustracción transitoria del calcio del líquido de diálisis sobre las concentraciones extracelulares de serotonina (5-HT) y ácido hidroxindolacético (5-HIAA). El periodo durante el cual se cambió el líquido de diálisis esta señalado por la flecha. Cuando se removió el calcio del líquido de diálisis la osmolaridad fue ajustada subiendo la concentración de sodio de 148 a 149 mM. Nótese como ambas concentraciones son dependientes del calcio extracelular. Las muestras fueron obtenidas de una rata mientras se encontraba sobre el pedestal angosto (90 h de privación de sueño MOR).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

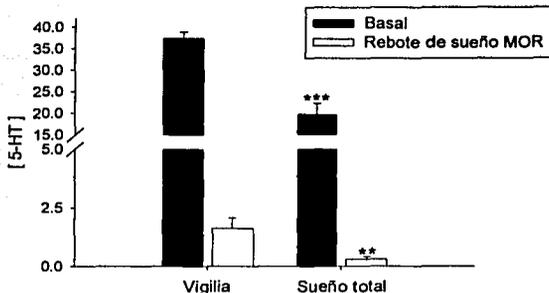


Figura 6. Niveles extracelulares de serotonina en relación con los estados de vigilancia en ratas sin perturbaciones de sueño (basal) así como en ratas inmediatamente después de 92 h de privación de sueño MOR (rebote de sueño MOR). Los valores representan concentraciones promedio expresadas como $\text{fmol}/5\mu\text{L} \pm$ error estándar de la media. Para este análisis se utilizaron solamente muestras obtenidas de animales que estuvieron ya sea más del 75% despiertos (vigilia) o en una combinación de sueño de ondas lentas más sueño MOR (sueño total) *** $t=5.261$; $gl=10$; $P\leq 0.001$ vs. vigilia basal, ** $t=2.949$; $gl=8$; $P=0.018$ vs. vigilia basal.

Discusión.

Los resultados presentados aquí indican claramente que los niveles extracelulares de serotonina dentro de la formación medial reticular bulbar disminuyen significativamente durante el sueño, en particular durante el sueño MOR. Esta observación es similar a los reportes presentados para otras áreas del cerebro como fueron el núcleo rafe dorsal [70], la formación reticular medial pontina [32], el núcleo tegmental pedúnculo-pontino [96], la formación hipocámpal [67], el área hipotalámica anterior + área preóptica [114] así como en la corteza frontal [70]. En todos los casos la liberación de serotonina fue mínima durante el sueño MOR y máxima durante la vigilia. Más importante aún es que este patrón de liberación sináptica estado-dependiente es análogo al patrón de descarga de las neuronas presuntamente serotoninérgicas dentro de los diferentes núcleos del rafe, incluyendo a los núcleos del rafe bulbar [21],[34],[62]. Estos núcleos bulbares junto con el rafe dorsal inervan a la formación reticular bulbar [17],[19],[110],[118],[120]. En todos estos núcleos se ha observado que la descarga de las neuronas disminuye o incluso desaparece durante el sueño MOR. Así pues es válido afirmar que los resultados presentes pueden ser explicados como resultado de los cambios estado-dependientes en el nivel de disparo de las neuronas serotoninérgicas que inervan a la formación reticular bulbar.

Dado que la liberación de serotonina durante el sueño MOR es significativamente baja a lo largo del cerebro y que simultáneamente se observa que el nivel de descarga es nulo o mínimo en diferentes núcleos serotoninérgicos durante este mismo estado, pudiera pensarse que sobre estas neuronas ocurren mecanismos desfacilitatorios, inhibitorios o incluso ambos tipos que explicarían la inactividad selectiva observada durante esta fase de sueño. Como soporte de la idea acerca de la inhibición está el hecho de que la estimulación de la formación reticular pontina produce un incremento muy notorio en el disparo de las neuronas del rafe durante la vigilia o durante el sueño de ondas lentas pero es inefectiva durante el sueño MOR [54]. A la fecha todavía no se conocen bien si esta inhibición serotoninérgica durante el sueño MOR es producida por uno o varios mecanismos aunque se sospecha que tenga que ver con el nivel de actividad inhibitoria de las neuronas GABAérgicas que proyectan a los núcleos del rafe (ver más adelante).

En el gato otros estudios señalan sin embargo que el silencio de las neuronas serotoninérgicas observado durante el sueño MOR se debe a una disminución del tono excitatorio proveniente tanto de neuronas histaminérgicas como de neuronas noradrenérgicas [74]. De igual forma, el bloqueo de estas aferencias durante la vigilia o el sueño de ondas lentas suprime la descarga espontánea en las neuronas del rafe dorsal [74]. Queda por saber si estos mismos mecanismos operan en el caso de la rata así como el origen preciso de estas aferencias excitatorias al rafe dorsal. De cualquier modo sea inhibición GABAérgica o desfacilitación histaminérgica-noradrenérgica, lo cierto es que durante el sueño MOR, las neuronas serotoninérgicas se encuentran relativamente inactivas en comparación al sueño de ondas lentas o a la vigilia.

Por otro lado es posible proponer que esta baja de la neurotransmisión serotoninérgica durante el sueño en general y en especial durante el sueño MOR tenga relación con la inhibición motora que ocurre naturalmente a lo largo del sueño. Esta idea pudiera ser válida al menos para explicar la baja en las concentraciones extracelulares de serotonina en varias áreas relacionadas con la modulación motora como la formación reticular ponto-bulbar, el núcleo pedúnculo pontino así como la corteza frontal. Al respecto se mencionó en la introducción que el nivel de descarga de las neuronas presuntamente serotoninérgicas de los núcleos del rafe se encuentra estrechamente relacionado con el nivel de actividad muscular. Por ejemplo en animales que presentan sueño MOR sin atonía, la descarga de las neuronas de rafe dorsal aumenta en el mismo grado que el animal exhibe actividad motora durante este estado [104]. Por el contrario durante los episodios inducidos de atonía muscular durante la vigilia, las neuronas en estos núcleos presentan una disminución significativa en el nivel espontáneo de descarga [93]. Lo mismo se ha observado en animales normales donde disminuye la descarga espontánea cuando el animal se encuentra quieto mientras que aumenta con la activación motriz [34]. Otro hecho que da soporte al papel facilitador de la

serotonina sobre el tono muscular es que luego de la lesión selectiva de las células serotoninérgicas se observa una reducción en la hipertonia muscular producida por descerebración [76].

Aunado a estas evidencias, hay otras más que indican que la serotonina en efecto cumple una función facilitadora sobre el tono muscular así como que esta función parece ser opuesta a la llevada a cabo por la acetilcolina. Así por ejemplo, la aplicación de serotonina a la formación reticular medial pontina bloquea la atonía muscular producida con la aplicación de carbacol [97]. Luego de la aplicación de serotonina se observa un aumento en el número y amplitud de los potenciales post-sinápticos excitatorios al nivel de las motoneuronas espinales así como una disminución en los potenciales post-sinápticos inhibitorios generados luego de la aplicación de carbacol. De este modo parece que la serotonina favorece el tono muscular por dos medios; uno es aumentando la excitabilidad de las motoneuronas y por otro retirando la inhibición que pesa sobre estas células. Este doble efecto implica que la serotonina debe de excitar y también inhibir a distintos tipo de neuronas retículo-espinales que a su vez modulan diferentemente a las motoneuronas. Al respecto se ha visto que la aplicación de serotonina es capaz tanto de hiperpolarizar como despolarizar a neuronas reticulares pontinas [94]. Al respecto se sabe que el efecto desinhibitorio de la serotonina sobre el tono muscular esta asociado con una disminución significativa en la descarga de muchas neuronas retículo-espinales que se ubican en el núcleo reticular gigantocelular [98]. La frecuencia de descarga de estas neuronas esta negativamente relacionada con el tono muscular de modo que cuando estas células aumentan su descarga después de la aplicación de carbacol, aumenta significativamente el número y la amplitud de los potenciales post-sinápticos inhibitorios registrados en las motoneuronas espinales. La serotonina produce el efecto contrario en estas neuronas del núcleo reticular gigantocelular, es decir, disminuye su nivel de descarga y simultáneamente disminuyen los potenciales post-sinápticos inhibitorios registrados en las motoneuronas dando como consecuencia un aumento en el tono muscular. Empero no se sabe todavía si estas neuronas retículo-espinales del bulbo raquídeo son en verdad inhibidas por la serotonina en forma directa. Los resultados aquí presentados sugieren que pudiera ser así.

Ya que durante el sueño MOR la concentración extracelular de serotonina es mínima [resultados del presente estudio] mientras que la de acetilcolina es máxima en la formación reticular ponto-bulbar [38],[39], se puede pensar además que estas concentraciones son el reflejo de como estos dos neurotransmisores están llevan a cabo diferentes funciones modulatorias sobre las neuronas retículo-espinales que controlan la atonía muscular del sueño MOR. De este modo durante el sueño MOR la mayor liberación colinérgica favorecería la activación de los mecanismos inhibitorios del tono muscular y en el mismo sentido estaría operando la disminución en la liberación de serotonina.

Esta modulación distinta llevada a cabo por la serotonina y la acetilcolina sobre las neuronas del núcleo reticular gigantocelular encargadas de la inhibición motora durante el sueño, se pone en evidencia después de lesionar diferentes tipos de neuronas en este núcleo. Así, luego de una lesión neurotóxica se produce un incremento en el tono muscular durante el sueño y en especial durante el sueño MOR [29]. Lo anterior se explica suponiendo que la lesión destruyó a las neuronas retículo-espinales que participan en la inhibición motora durante el sueño. Adicionalmente el aumento del tono muscular producido por esta lesión estuvo positivamente correlacionado con el cociente de células serotoninérgicas/colinérgicas sobrevivientes. En otras palabras, la inhibición del tono muscular durante el sueño en general y especialmente durante el sueño MOR, requiere de la integridad de las neuronas en el núcleo reticular gigantocelular pero además, va de la mano con la actividad de las neuronas colinérgicas mientras que también precisa de la inactividad de las neuronas serotoninérgicas de la formación reticular bulbar. Otra evidencia que apoya esta hipótesis de modulación motora dual proviene de los estudios de la liberación de serotonina luego de la aplicación de carbacol a la formación reticular pontina. Se ha visto que esta concentración disminuye significativamente en el núcleo hipogloso [41] así como al nivel de los núcleos motores de la médula espinal [42]. Esta reducción no ocurre cuando el carbacol es aplicado a regiones del tallo cerebral que no inducen una atonía muscular bilateral. El núcleo hipogloso es un agregado de motoneuronas que inervan los músculos de la vía área superior y en donde se sabe además que la serotonina constituye un facilitador tónico sobre la excitabilidad de estas motoneuronas que inerva el músculo geniogloso [35]. Más aún, al igual que la formación reticular bulbar, la innervación serotoninérgica hacia el núcleo hipogloso y hacia los núcleos motores de la médula espinal proviene de los núcleos del rafe bulbar [92]. De igual forma se conoce que la estimulación de las células serotoninérgicas excita a las motoneuronas espinales así como la innervación serotoninérgica de estos núcleos espinales proviene tanto de los núcleos del rafe bulbar como del rafe dorsal [18],[92]. A la fecha no se sabe que ocurre con la concentración extracelular de serotonina al nivel de la formación reticular ponto-bulbar durante la aplicación de carbacol a la formación reticular pontina pero de nuevo el presente estudio sugiere que deben verse decrementada. En resumen es muy probable que la disminución en la liberación de serotonina observada durante el sueño en general y durante el sueño MOR en particular, esté relacionada con la función facilitadora que este neurotransmisor tiene al nivel de estructuras moduladoras del tono muscular. Esto aplica para el caso del presente trabajo llevado a cabo en el núcleo reticular gigantocelular pero también pudiera explicar el mismo fenómeno en otras regiones del cerebro que también participan en el control motor (incluyendo regiones donde se encuentran las motoneuronas).

Los estudios de lesión tanto a nivel del puente [85] como a nivel del bulbo raquídeo [83] demuestran que el sueño MOR puede ocurrir sin atonía muscular así que en este sentido se pudiera considerar que la inactivación de las neuronas serotoninérgicas durante el sueño MOR no es un fenómeno *sin e qua non* para la ocurrencia del sueño MOR. Sin embargo también es cierto que la atonía muscular durante este estado evita que el organismo "actúe" sus sueños. Como se mencionó previamente, se ha visto que las ensoñaciones se asocian frecuentemente con el sueño MOR [14]. Cuando la atonía muscular no se presenta durante el sueño MOR, los sujetos despliegan conductas aberrantes. Esto es cierto tanto para humanos [56] como para el gato doméstico [23]. Estas conductas denominadas oníricas ocurren fuera de contexto perjudicando seriamente la integridad física del sujeto que las manifiesta. Es por esta razón muy probablemente que a lo largo de la evolución se desarrollaron diversos mecanismos que suprimieran la ejecución motora durante este estado. Así pues la defacilitación serotoninérgica que se lleva a cabo en la formación reticular ponto-bulbar puede considerarse como parte de estos mecanismos importantes para que el sueño MOR ocurra de forma adaptativa.

Otro hallazgo de la presente investigación fue que en respuesta a la privación selectiva de sueño MOR e independientemente del estado de vigilancia, los niveles extracelulares de serotonina disminuyen significativamente. Esta disminución significativa en la concentración de serotonina sigue presente durante el rebote de sueño MOR. Además también se observó que esta disminución es aún mayor en el caso de que el animal estuviese durmiendo la mayor parte del tiempo. En otras palabras en respuesta a la privación, la liberación de serotonina en la formación reticular bulbar disminuye significativamente durante la vigilia pero aún más durante el sueño. Lo anterior sugiere que en respuesta a la privación de sueño MOR se deben echar a andar mecanismos que reducen la descarga tónica de las neuronas serotoninérgicas aunque estos mecanismos ciertamente no afectan los cambios de actividad estado-dependientes que ocurren naturalmente en estas neuronas. Infortunadamente a la fecha no existe otro estudio, aparte del presente trabajo, que haya medido las concentraciones extracelulares de serotonina en respuesta a la privación de sueño MOR; de modo que no es posible comparar lo reportado aquí en la formación reticular bulbar con otras áreas del cerebro. Sin embargo los presentes hallazgos son congruentes con otros reportes que utilizaron otros métodos para evaluar la actividad de las neuronas serotoninérgicas en respuesta a la privación de sueño. Por ejemplo utilizando registros unitarios se ha observado que durante la privación de sueño, disminuye significativamente el nivel de descarga de las células selectivamente inactivas durante el sueño MOR (como es el caso de las células serotoninérgicas)[57]. Por otro lado utilizando inmunohistoquímica para c-FOS como indicador de actividad neuronal, se observó que durante el rebote de sueño MOR existe una reducción significativa en el número de neuronas serotoninérgicas que expresan simultáneamente c-FOS [58],[59].

Esta reducción se correlacionó positivamente con la cantidad de sueño MOR. Así pues en ambos casos parece haber evidencias que señalan que las neuronas serotoninérgicas disminuyen significativamente su actividad en respuesta a la privación de sueño MOR. Todo esto apoyaría la idea de que la disminución de la neurotransmisión serotoninérgica es un factor permisivo para la expresión de este tipo de sueño.

La disminución en la actividad de las neuronas serotoninérgicas observada en el presente y en otros estudios, pudiera deberse a un aumento en la inhibición GABAérgica sobre estas neuronas ya que se ha observado que durante el rebote de sueño MOR ocurre un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a GAD+ c-FOS en todos los núcleos del rafe [58],[59]. Al respecto, también se ha medido un incremento significativo de la liberación de GABA durante el sueño MOR en el núcleo rafe dorsal [64]. Es más si se favorece la inhibición GABAérgica con muscimol en este núcleo se incrementa a su vez la expresión de sueño MOR en un 200% mientras que si se bloquea esta neurotransmisión con bicuculina desaparece completamente el sueño MOR [64]. De hecho se sabe que la aplicación de GABA a las neuronas del rafe dorsal, las inhibe poderosamente [66]. Asimismo se ha visto que durante el sueño de ondas lentas la aplicación local de bicuculina revierte la disminución de la descarga en las neuronas del rafe dorsal [49]. Por todo lo anterior se propone que durante el sueño y en especial durante el sueño MOR, ocurre un aumento de actividad en las neuronas GABAérgicas que están inhibiendo a las neuronas serotoninérgicas. Este aumento explicaría la inhibición de la descarga de las neuronas serotoninérgicas durante el sueño. A su vez la inhibición de la excitabilidad serotoninérgica daría lugar a una disminución en la liberación de serotonina a lo largo del cerebro. En particular al nivel de la formación reticular ponto-bulbar esta disminución en la liberación de serotonina serviría como factor permisivo para que ocurra un aumento en la descarga en las neuronas encargadas de iniciar y mantener el sueño MOR. Estos mismos mecanismos se verían potenciados en respuesta a la privación de sueño MOR, posibilitando el rebote de sueño MOR.

Los resultados obtenidos en estudios conductuales realizados en ratas en respuesta a la privación selectiva de sueño MOR también son congruentes con los hallazgos del presente estudio. Así, se ha visto que la privación de sueño MOR induce un aumento en la conducta agresiva, en la ingesta de alimento, en la actividad exploratoria al igual que en la respuesta ante estímulos nociceptivos [15],[16],[25],[26],[27],[28]. De igual modo las manipulaciones que disminuyen la liberación serotoninérgica como la administración de paraclofenilalanina o la lesión selectiva de neuronas serotoninérgicas con 5,7 dihidroxitriptamina inducen un incremento análogo en cada una de estas variables conductuales [3],[5],[47],[77],[109],[111]. En especial el incremento en la respuesta a estímulos dolorosos resulta muy relevante para el presente trabajo ya que la formación reticular bulbar participa de manera importante en la modulación de la respuesta al dolor [6]. Así pues, se sugiere que todos estos

cambios observados en la conducta en respuesta a la privación de sueño MOR pudieran tener una relación con la baja en la liberación de serotonina.

La reducción en la concentración extracelular de serotonina en respuesta a la privación de sueño MOR tampoco parece deberse al factor intrínseco del estrés causado por el ambiente novedoso así como la restricción de movilidad experimentada por los animales mantenidos sobre el pedestal angosto. Esto se ve sustentado en primer término porque las ratas que permanecieron sobre las plataformas anchas también se vieron expuestas a estos mismos factores estresantes pero no presentaron cambios en las concentraciones de serotonina ó 5-HIAA ni tampoco hubo modificaciones en los estados de vigilancia. Estos resultados coinciden por los reportados por otros autores donde no se observan cambios en las concentraciones tisulares de serotonina o 5-HIAA en ratas mantenidas sobre las plataformas control [117]. Al respecto también se ha visto que las neuronas serotoninérgicas no modifican sus niveles de descarga en respuesta a diferentes estímulos estresantes incluyendo la inmovilidad [34]. Así pues se deduce que los cambios observados en la liberación de serotonina se relacionan fundamentalmente con las alteraciones sobre el sueño MOR causadas por la estancia sobre el pedestal angosto.

Por otro lado la reducción en la concentración extracelular de 5-HIAA observada en el presente estudio durante la privación de sueño MOR puede ser comprendida en función de la drástica disminución observada en la concentración extracelular de serotonina. Así se propone que al haber menos liberación de serotonina, también debería de haber menor recaptura y por ende menos serotonina citosólica que pueda ser metabolizada. Esto se ve apoyado por los estudios de medición de la concentraciones extracelulares de serotonina y 5-HIAA luego de la administración de bloqueadores selectivos de la recaptura. En estos se reporta que la concentración extracelular de serotonina aumenta significativamente mientras por el contrario se reduce la de 5-HIAA [72],[90]. Por otro lado los reportes donde se demuestra que la privación de sueño MOR no modifica significativamente la actividad de las MAOs a nivel del tallo cerebral [99] ni tampoco altera la tasa de excreción de 5-HIAA [10] no apoyan la idea de que esta maniobra este reduciendo el recambio al afectar negativamente estos otros aspectos de la catabolización de la serotonina.

En el presente estudio la reducción en el nivel extracelular de 5-HIAA durante la privación de sueño MOR resultó relativamente menor a la reducción observada en la concentración de serotonina. Esto podría ser explicado suponiendo que la privación de sueño MOR sólo disminuye el recambio de serotonina que es dependiente de la recaptura pero no afecta al recambio independiente de ésta. Esto es apoyado en parte por el hecho de que en todas las condiciones medidas en este estudio se encontró que las concentraciones extracelulares de 5-HIAA estuvieron un orden de magnitud por arriba con respecto a la de serotonina. Este hecho no es compatible con la

idea de que todo el 5-HIAA excretado al espacio extracelular provenga de la metabolización de la serotonina recapturada. Estas grandes diferencias en las concentraciones extracelulares de ambos compuestos también han sido reportadas por otros autores en varias áreas cerebrales incluyendo la formación reticular del tallo cerebral [32],[67]. Asimismo luego de bloquear la recaptura de serotonina, los niveles extracelulares de 5-HIAA se reducen pero no desaparecen demostrando así que la recaptura de serotonina no explica por entero la concentración extracelular de 5-HIAA [72],[90]. Otros estudios donde se ha medido la concentración extracelular de serotonina y 5-HIAA luego de la administración de L-triptófano indican que este recambio independiente de la recaptura esta en verdad presente. Así la liberación basal de serotonina no se modifica con esta maniobra pero sí en cambio hace aumentar muy significativamente la concentración extracelular de 5-HIAA [82].

Por otro lado se encontró que las concentraciones extracelulares de 5-HIAA estuvieron significativamente aumentadas durante el rebote de sueño. Otros autores han reportado aumentos en las concentraciones tisulares de 5-HIAA durante el rebote de sueño [103]. Dado que las concentraciones extracelulares de serotonina se mantuvieron drásticamente reducidas durante este mismo momento, no se puede lógicamente explicar este cambio en función de un aumento en el recambio proveniente de la recaptura. Más bien se propone que durante el rebote de sueño MOR, el recambio independiente de la recaptura se ve aumentado en función de un aumento en la síntesis de serotonina. Esta propuesta se ve sustentada por estudios que han medido el nivel de L-triptófano durante el rebote de sueño y que indican que sus concentraciones tisulares a nivel del cerebro se encuentran significativamente elevadas [24],[103]. Adicionalmente otros estudios parecen indicar que este aumento en la concentración del triptófano cerebral tiene que ver con la inactivación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal dado que la enzima hepática que cataboliza este aminoácido es modulada positivamente por el cortisol [10][20]. Dado que la terminación de la liberación de sueño MOR supone también el final del estrés causado por esta maniobra, se puede pensar que durante el rebote de sueño MOR el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal entra en una etapa de inactivación. Así, durante el rebote de sueño MOR, se elevaría la concentración cerebral de triptófano debido al cese de su catabolismo hepático. Esto daría como consecuencia que las neuronas serotoninérgicas aumentarían la síntesis de serotonina puesto que se sabe que cuando aumentan el nivel de triptófano cerebral también aumenta la concentración de serotonina en este tejido [82]. No obstante se ha visto también que no necesariamente el aumento en la síntesis de serotonina motivada por aumento de la concentración cerebral de su precursor, es seguida de aumento en la liberación. Esto depende del grado de actividad de estas neuronas. Si no existe aumento de actividad en estas células entonces se cataboliza la mayor parte de esa serotonina recién sintetizada [82]. Como ya se discutió hay varias evidencias que señalan que durante el rebote de sueño

MOR, las células serotoninérgicas permanecen inactivas de modo que se propone que durante este lapso, la serotonina sintetizada a partir del aumento de su precursor, en lugar de ser liberada, se cataboliza. Esto explicaría por qué se encontró aumentada la concentración extracelular de 5-HIAA no obstante la liberación de serotonina se mantuvo disminuida.

Finalmente, el hecho de que la concentración extracelular del serotonina fuera dependiente de la concentración de calcio extracelular también apoya la idea de que la serotonina medida en la presente tesis proviene de las neuronas serotoninérgicas. Lo anterior es similar a lo observado para el caso de otros neurotransmisores como la noradrenalina, la dopamina o la acetilcolina, en donde sus concentraciones extracelulares también disminuyen significativamente en ausencia de calcio en el medio extracelular [113]. Asimismo, es conocido que para que la liberación del contenido de las vesículas sinápticas al medio extracelular ocurra, se requiere la entrada de calcio hacia el citoplasma. Al menos en el caso de neurotransmisores como serotonina, noradrenalina o dopamina ya que la remoción de calcio de medio extracelular no afecta los niveles extracelulares de otros, como GABA o glutamato.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Conclusiones

El presente estudio demuestra que en la formación reticular paramedial bulbar de la rata de laboratorio:

- 1) La liberación de serotonina es máxima durante la vigilia, intermedia durante el sueño de ondas lentas y alcanza su nivel mínimo durante el sueño MOR.
- 2) Independientemente de los estados de vigilancia, la liberación tónica de serotonina se reduce significativamente, tanto durante la privación selectiva de sueño MOR, como durante el rebote de sueño MOR.
- 3) La liberación de serotonina es significativamente menor cuando el animal está dormido que cuando está despierto durante el rebote de sueño MOR.
- 4) La concentración extracelular del principal metabolito de la serotonina, el 5-HIAA, disminuye significativamente durante la privación de sueño MOR mientras que aumenta significativamente durante el rebote de sueño MOR.
- 5) La concentración extracelular de serotonina es estrictamente dependiente la concentración de calcio del medio extracelular, mientras que la de ácido 5-hidroxi-indolacético, lo es menor grado.

Bibliografía

- [1] Aston-Jones G, Bloom FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* (1981) 1:876-886.
- [2] Bonnet MH. Sleep deprivation en "Principles and Practice of Sleep Medicine". Kryger MH, Roth T, Dement WC. Eds. Tercera edición. (2000) W.B. Saunders Company pp. 53-71.
- [3] 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: 1-22.
- [4] Bourgin P, Lebrand C, Escourrou P, Gaultier C, Franc B, Hamon M, Adrien J. Vasoactive intestinal polypeptide microinjections into the oral pontine tegmentum enhance rapid eye movement sleep in the rat. *Neuroscience* (1997) 77:351-360.
- [5] Breise ST, Zelman FP, Hoebel BG. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science* (1976) 192:382-384.
- [6] 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: 150-161.
- [7] Chase MH, Enomoto S, Murakami T, Nakamura Y, Taira M. Intracellular potential of medullary reticular neurons during sleep and wakefulness. *Exp. Neurol.* (1981) 71:226-233.
- [8] 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) 386:237-244
- [9] Chase MH, Morales FR. The Control of Motoneurons During Sleep en: "Principles and Practice of Sleep Medicine". Kryger MH, Roth T, Dement WC. Eds. Tercera edición. (2000) W.B. Saunders Company pp.163-175.
- [10] 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.
- [11] Crochet S, Sakai K. Alpha-2 adrenoceptor mediated paradoxical (REM) sleep inhibition in the cat. *Neuroreport* (1999) 10:2199-2204.
- [12] Crochet S, Sakai K. Effects of microdialysis application of monoamines on the EEG and behavioral states in the cat mesopontine tegmentum. *Eur J Neurosci* (1999) 11: 3738-3752.
- [13] Dement W. The effect of dream deprivation. *Science* (1960) 131(3415): 1705-1707.

- [14] Dement WC, 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.
- [15] Elomaa E, 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.
- [16] Elomaa E, 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.
- [17] Fardin V, Oliveras JL, Besson JM. Projections from the periaqueductal gray matter to the B3 cellular area (nucleus raphe magnus and nucleus reticularis paragigantocellularis) as revealed by the retrograde transport of horseradish peroxidase in the rat. *J Neurol Comp* (1984) 223: 483-500.
- [18] Fung SJ, Barnes CD. Raphe-produced excitation of spinal cord motoneurons in the cat. *Neurosci Lett* (1989) 103: 185-190.
- [19] Gallager DW, 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: 257-275.
- [20] Green AR, Curzon G. Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol. *Nature* (1968) 220: 1095-1097.
- [21] Guzmán-Marín R, Alam MD, Szymusiak R, Drucker-Colin R, Gong H, McGinty D. Discharge modulation of rat dorsal raphe neurons during sleep-waking: effects of preoptic/basal forebrain warming. *Brain Res* (2000) 875: 23-34.
- [22] Hajnik T, Lai YY, Siegel JM. Atonia-related regions in the rodent pons and medulla. *J Neurophysiol* (2000) 84: 1942-1948.
- [23] Hendricks JC, Morrison AR, Mann GL. Different behaviors during paradoxical sleep without atonia depend on pontine lesion site. *Brain Res* (1982) 239:81-105.
- [24] 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: 391-403.
- [25] Hicks RA, Coleman DD, Ferrante F, Sahatjian M, Hawkins J. Pain threshold in rats during recovery from REM sleep deprivation. *Percept Mot Skills* (1978) 48(3Pt1): 687-690.
- [26] 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.
- [27] Hicks RA, Moore JD, Hayes Ch, Phillips N, Hawkins J. REM sleep deprivation increases aggressiveness in male rats. *Physiol Behav* (1979) 22:1097-1100.

- [28] Hicks RA, Moore JD. REM sleep deprivation diminishes fear in rats. *Physiol Behav* (1979) 22: 689-692.
- [29] Holmes CJ, 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: 1179-1200.
- [30] Imon H, Ito K, Dauphin L, McCarley RW. Electrical stimulation of the cholinergic laterodorsal tegmental nucleus elicits scopolamine-sensitive excitatory postsynaptic potentials in medial pontine reticular formation neurons. *Neuroscience* (1996) 74:393-401.
- [31] Ito K, 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.
- [32] 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: 157-170.
- [33] 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: 47-53.
- [34] Jacobs BL, Fornal CA. An Integrative Role For Serotonin In The Central Nervous Systems en "Handbook of Behavioral State Control: cellular and molecular mechanisms". Lydic R, Baghdoyan HA. Eds. CRC Press. (1999) pp. 181-193.
- [35] JeleV A, Sood S, Liu H, Nolan P, Horner RL. Microdialysis perfusion of 5-HT into hypoglossal motor nucleus differentially modulates genioglossus activity across natural sleep-wake states *J Physiol (Lond)* (2001) 532: 467-481.
- [36] 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: 210-220.
- [37] Kodama T, Lai YY, Siegel JM. Enhancement glutamate release during REM sleep in rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res* (1998) 780: 178-181.
- [38] Kodama T, Lai YY, Siegel JM. Enhancement of acetylcholine release during REM sleep in caudomedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res* (1992) 580: 348-350.
- [39] Kodama T, Takahashi Y, Honda Y. Enhancement of acetylcholine release during paradoxical sleep in the dorsal tegmental field of the cat brainstem (1990) 114: 277-282.
- [40] Kohyama J, Lai YY, Siegel JM. Inactivation of the pons blocks medullary-induced muscle tone suppression in the decerebrate cat. *Sleep* (1998) 21: 695-699.

- [41] 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.
- [42] Lai YY, Kodama T, Siegel JM. Changes in monoamine release in the ventral horn and hypoglossal nucleus linked to pontine inhibition of muscle tone: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci* (2001) 21: 7384-7391.
- [43] Lai YY, Siegel JM. Cardiovascular and muscle tone changes produced by microinjection of cholinergic and glutamatergic agonist in dorsolateral pons and medial medulla. *Brain Res* (1990) 514: 27-36.
- [44] Lai YY, Siegel JM. Corticotropin-releasing factor mediated muscle atonia in pons and medulla. *Brain Res* (1992) 575:63-68.
- [45] Lai YY, Siegel JM. Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation. *J Neurosci* (1990) 10: 2727-2734.
- [46] Lai YY, Siegel JM. Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression. *J Neurosci* (1991) 11: 2931-2937.
- [47] Le Bars D. Serotonin and pain in "Neuronal Serotonin". Osborne NN, Hamon M. Eds. John Wiley & Sons. (1988) pp 171-230.
- [48] 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.
- [49] Levine ES, Jacobs BL. Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat. *J Neurosci* (1992) 12: 4037-4044.
- [50] Li YQ, Kaneko T, Mizuno N. Collateral projections of nucleus raphe dorsalis neurons to the caudate-putamen and region around the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis pars alpha in the rat. *Neurosci Lett* (2001) 299: 33-36.
- [51] 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.
- [52] Luppi PH, Sakai K, Fort P, Salvert D, 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: 1-20.
- [53] Lydic R, Baghdadyan HA. Pedunculopontine stimulation alters respiration and increases Ach release in the pontine reticular formation. *Am J Physiol* (1993) 264: R544-R554.
- [54] 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: 35-40.

- [55] Magoun HW, Rhines R. An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation. *J Neurophysiol* (1946) 9: 165-171.
- [56] Mahowald MW, Schenck C. REM sleep behavior disorder en "Principles and Practice of Sleep Medicine". Kryger MH, Roth T, Dement WC. Eds. Tercera edición. 2000 W.B. Saunders Company pp. 574-588.
- [57] Mallick BN, Siegel JM, Fahringer H. Changes in pontine unit activity with REM sleep deprivation. *Brain Res* (1989) 515: 94-98.
- [58] Maloney KJ, Mainville L, Jones BE, c-Fos expression in GABAergic, serotonergic and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation. *J Neurosci* (2000) 20: 4669-4679.
- [59] Maloney KJ, Mainville L, Jones BE. Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J. Neurosci* (1999) 19: 3057-3072.
- [60] 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: 124-141
- [61] McCarley RW, Massaquoi SG. Neurobiological structure of the revised limit cycle reciprocal interaction model of REMS cycle control. *J Sleep Res* (1992) 1:132-138.
- [62] McGinty DJ, Harper RM. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* (1976) 101: 569-575.
- [63] Mitler MM, Dement WC. Cataplectic-like behavior in cats after microinjections of carbachol in pontine reticular formation. *Brain Res* (1974) 68: 335-343.
- [64] Nitz D, Siegel JM. GABA release in the dorsal raphe nucleus: a role in the control of REM sleep. *Am J Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol* (1997) 42: R451-R455.
- [65] Onoe H, Sakai K. Kainate receptors: a novel mechanism in paradoxical (REM) sleep generation. *Neuroreport* (1995) 6: 353-356.
- [66] Pan ZZ, Williams JT. GABA and glutamate mediated synaptic potentials in the rat dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurophysiol* (1989) 61: 719-726.
- [67] Park PS, Lopez-Rodriguez F, Wilson Ch, Maidment N, Matsumoto Y, Engel J Jr. In vivo microdialysis measures of extracellular serotonin in the rat hippocampus during sleep-wakefulness. *Brain Res.* (1999) 833: 291-296.
- [68] Paxinos G, Watson Ch. "The rat brain in stereotaxic coordinates". (1986) Academic Press. Segunda Edición. Australia.
- [69] Peterson BW, Pitts NG, Fukushima K. Reticulospinal connections with limb and axial motoneurons. *Exp Brain Res* (1979) 36: 1-20.
- [70] Portas CM, Bjørvatn B, Fagerland S, Gronli J, Mundal V, Ursin ER. On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe

- nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat. *Neuroscience* (1998) 83: 807-814.
- [71] Portas CM, Thakkar M, Rainnie D, McCarley RW. Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-prpoylamino)tetralin (8-OH-DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. *J Neurosci* (1996) 16:2820-2828.
- [72] Rutter JJ, Aurebach SB. Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin in the rat forebrain. *Pharmacol Exp Ther* (1993) 265: 1319-1324.
- [73] Saito H, Sakai K, Jouvet M. Discharge patterns of the nucleus parabrachialis lateralis neurons of the cat during sleep and waking. *Brain Res* (1977) 134: 59-72.
- [74] Sakai K, Crochet S. Serotonergic dorsal raphe neurons cease firing by disfacilitation during paradoxical sleep. *Neuroreport* (2000) 11:3237-3241.
- [75] Sakai K, Koyama Y. Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurons in the pons? *Neuroreport* (1996) 7: 2449-2453.
- [76] Sakai M, Matsunaga M, Kubota A, Yamanishi Y, Nishizama Y. Reduction in excessive muscle tone by selective depletion of serotonin in intercollicularly decerebrated rats. *Brain Res* (2000) 860: 104-111.
- [77] Saller ChF, Sricker EM. Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science* (1976) 192: 385-387.
- [78] Semba K, 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.
- [79] 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.
- [80] Semba K. The Mesopontine Cholinergic System: A Dual Role in REM Sleep and Wakefulness en "Handbook of Behavioral State Control: cellular and molecular mechanisms". Lydic R, Baghdoyan HA, Eds. CRC Press. (1999) pp.161-180.
- [81] 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): 61-989.
- [82] 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: 1215-1223.

- [83] Shenkel E, Siegel JM. REM sleep without atonia after lesions of the medial medulla. *Neurosci Lett* (1989) 98: 159-165.
- [84] Shiromani PJ, Mc Ginty DJ. Pontine neuronal response to local cholinergic infusion: relation to REM sleep. *Brain Res* (1986) 386: 20-31.
- [85] Shouse MN, Siegel JM. Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res* (1992) 571: 50-63.
- [86] Shouse MN, Staba RJ, Saquib SF, Farber PR. Monoamines and sleep: microdialysis findings in pons and amygdala. *Brain Res* (2000) 860: 181-189.
- [87] Siegel JM, Nienhuis R, Tomaszewski KS. Rostral brainstem contributes to medullary inhibition of muscle tone. *Brain Res* (1983) 268: 344-348.
- [88] Siegel JM, Tomaszewski KS, Nienhuis R. Behavioral states in the chronic medullary and mid-pontine cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1986) 63: 274-288.
- [89] Siegel JM. Brainstem mechanisms generating REM sleep in "Principles and Practice of Sleep Medicine". Kryger MH, Roth T, Dement WC. Eds. Tercera edición. 2000 W.B. Saunders Company pp. 112-133.
- [90] Sprouse J, Clarke T, Reynolds L, Heym J, Rollema H. Comparison of the effects of sertraline and its metabolite desmethylsertraline on blockade of central 5-HT reuptake in vivo. *Neuropsychopharmacology* (1996) 14: 225-231.
- [91] Stamp JA, Semba K. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res* (1995) 677: 39-49.
- [92] Steinbusch HWM. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* (1981) 6: 557-618.
- [93] Steinfels GF, Heym J, Strecker RE, Jacobs BL. Raphe unit activity in freely moving cats is altered by manipulations of central but not peripheral motor systems. *Brain Res* (1983) 279: 77-84.
- [94] Stevens DR, McCarley RW, Greene RW. Serotonin 1 and serotonin 2 receptors hyperpolarize and depolarize separate populations of medial pontine reticular formation in vitro. *Neuroscience* (1992) 47:545-553.
- [95] 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) [Suppl] 21: 22.
- [96] Strecker RE, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Dauphin LJ, Björkum AA, McCarley RW. Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the pedunculopontine tegmental nucleus: a microdialysis study in freely moving animals. *J Sleep Res. Online* (1999) 2:21-27.

- [197] Takakusaki K, Kohyama J, Matsuyama K, Mori S. Synaptic mechanisms acting on lumbar motoneurons during postural augmentation induced by serotonin injection into the rostral pontine. *Exp Brain Res* (1993) 93: 471-482.
- [198] Takakusaki K, Shimoda N, Matsuyama K, Mori S. Discharge properties of medullary reticulospinal neurons during postural changes induced by intrapontine injections of carbachol, atropine and serotonin and their functional linkages to hindlimb motoneurons in cats. *Exp Brain Res* (1994) 99: 361-374.
- [199] Thakkar M, Mallick BN. Effect of rapid eye movement sleep deprivation on rat brain monoamine oxidases. *Neuroscience* (1993) 55: 677-683.
- [100] Thakkar MM, Portas Ch, McCarley RW. Chronic low-amplitude electrical stimulation of laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Res* (1996) 723: 223-227.
- [101] Thakkar MM, Strecker RE, McCarley RW. Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *J Neurosci* (1998) 18: 5490-5497.
- [102] Tobler I. Phylogeny of sleep regulation en "Principles and Practice of Sleep Medicine". Kryger MH, Roth T, Dement WC. Eds. Tercera edición. 2000 W.B. Saunders Company pp.72-81.
- [103] 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: 757-761.
- [104] Trulson ME, Jacobs BL, Morrison AR. Raphe unit activity during REM sleep in normal cats and in pontine lesioned cats displaying REM sleep without atonia. *Brain Res* (1981) 226: 75-91.
- [105] Van Lujtelaar ELJM, Coenen AML. Electrophysiological evaluation of three paradoxical sleep deprivation techniques in rats. *Physiol Behav.* (1986) 36: 603-609.
- [106] 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: 41-45.
- [107] Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M. Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* (1989) 127: 133-164.
- [108] Velazquez-Moctezuma J, Shalauta M, Gillin JC, Shiromani PJ. Cholinergic antagonists and REM sleep generation. *Brain Res* (1991) 543: 175-179.
- [109] 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: 85-91.

- [110] Vertes RP, Kocsis B. Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* (1994) 340: 11-26.
- [111] 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: 79-91.
- [112] 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: 285-302.
- [113] Westernick BHC. In vivo evidence for presynaptic modulation of neurotransmitters release en "Neurotransmitter release and its modulation". Pows DA, Bunn SJ. Eds. Cambridge University Press. New York (1995) pp. 217-232.
- [114] Wilkinson LO, Aurebach SB, Jacobs BL. Extracellular serotonin levels change with behavioral state but not with pyrogen-induced hyperthermia. *J Neurosci* (1991) 11: 2732-2741.
- [115] Williams JA, Reiner P. Noradrenaline hyperpolarizes identified rat mesopontine cholinergic neurons in vitro. *J Neurosci* (1993) 13: 3878-3883.
- [116] Xi MC, Morales FR, Chase MH. A GABAergic pontine reticular system is involved in the control of wakefulness and sleep. *Sleep Res Online* (1999) 2:43-48.
- [117] 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: 249-256.
- [118] Zagon A. Internal connections in the rostral ventromedial medulla of the rat. *J. Auton Nerv Syst* (1995) 53: 43-56.
- [119] Zelman FP, Behbehani MM, Beckstead RM. Ascending and descending projections from nucleus reticularis magnocellularis and nucleus reticularis gigantocellularis: an autoradiographic and horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res.* (1984) 292:207-220.
- [120] 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: 205-209.
- [121] Zepelin H. Mammalian Sleep en "Principles and Practice of Sleep Medicine". Kryger MH, Roth T, Dement WC. Eds. Tercera edición. 2000 W.B. Saunders Company pp. 82-92