

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**“ACETILCOLINA, GABA<sub>A</sub> y GLUTAMATO: REGULACIÓN  
DEL SUEÑO MOR Y DE LA ACTIVIDAD PGO EN EL GATO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**P R E S E N T A**

**IGNACIO RAMÍREZ SALADO**

**CODIRECTORES DE TESIS:**

**DR. JAVIER VELAZQUÉZ MOCTEZUMA**

**DRA. ANABEL JIMÉNEZ ANGUIANO**

**ASESOR:**

**DR. FRANCISCO PELLICER**

**MÉXICO, D.F.**

**3 DE MARZO DE 2015**

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Ignacio Ramírez Salado el día 3 de Marzo del año de 2015

**Jurado:**

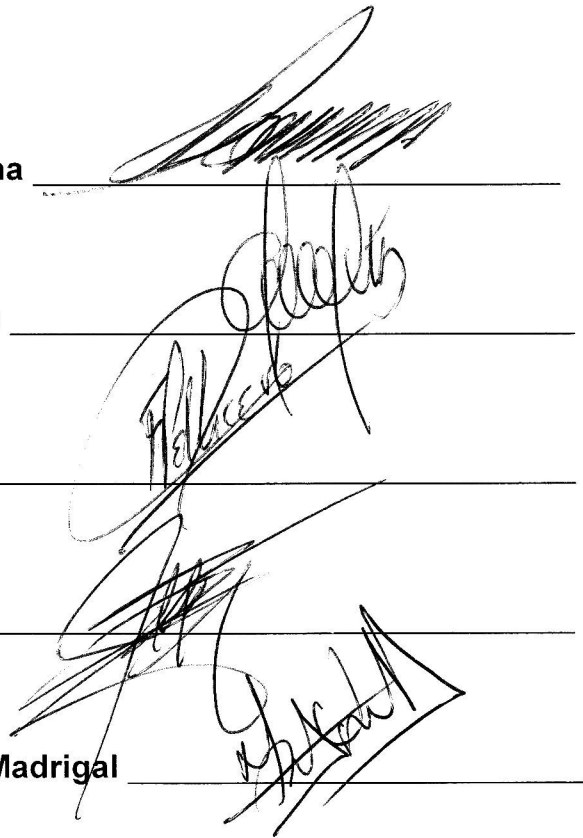
Cotutor: Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Cotutor: Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Asesor: Dr. Francisco Pellicer Graham

Sinodal: Dr. Eduardo Calixto González

Sinodal: Dr. Víctor Manuel Magdaleno Madrigal



The image shows five handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. A large, stylized signature for Dr. Javier Velázquez Moctezuma. 2. A signature for Dra. Anabel Jiménez Anguiano. 3. A signature for Dr. Francisco Pellicer Graham, with the name 'PELICER' written vertically in the signature. 4. A signature for Dr. Eduardo Calixto González. 5. A signature for Dr. Víctor Manuel Magdaleno Madrigal, which includes a large, bold, stylized initial 'V'.

## **DEDICATORIA**

*A Yara por su gran amor, su incomparable  
paciencia y por estar a mi lado.*

*A mi madre por su gran cariño y ternura, por su gran  
amor y sobre todo por nunca dejarme solo.*

*A mi hermano por su nobleza y por su  
sinceridad.*

A la memoria de mi Padre

**Ignacio Ramírez Ramos**

**Por tu gran sentido del humor, por tu sabiduría, por todas tus enseñanzas, gracias por ser ejemplo de lo que significa ser una persona íntegra.**

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. José María Calvo por transmitirme todos sus conocimientos, por haber aprendido conmigo. Gracias por ser mi mentor.*

*Al Dr. Javier Velazquez Moctezuma por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas y por haber aceptado ser mi tutor.*

*A la Dra. Anabel Jiménez Anguiano gracias por el apoyo brindado, gracias por su comprensión, gracias por todo el apoyo moral.*

*Al Dr. Francisco Pellicer gracias por confiar y creer en mi, gracias por su apoyo, gracias por su paciencia.*

*Ana Paula mi mejor complice y colaborador científico, gracias por esas extraordinarias discusiones y agradables pláticas sobre ciencia y sobre nuestras ideas.*

*A Manuel por ser un gran ejemplo de tenacidad, de empeño y constancia al momento de hacer ciencia e investigación. Gracias por levantarme cuando he caído.*

*A Carlos Jiménez y Carlos Camacho por sus enseñanzas, gracias por ayudarme a ser un buen investigador. Gracias por su paciencia y por su ayuda en la realización de esta tesis. Además gracias por ser unos verdaderos amigos, por hacerme fácil y divertido el trabajo.*

*A Edith López por tu amistad, por tu apoyo y por tus enseñanzas, gracias por ser una excelente compañera de trabajo.*

*A mis tíos Paco y Mali Rocha por el gran apoyo que siempre me han brindado, gracias por su cariño.*

*Gracias a la Universidad Autónoma Metropolitana, por mi formación.*

*Gracias al Instituto Nacional de Psiquiatría, mi casa.*



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cronobiología.  
Dirección de Investigaciones en Neurociencias.  
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz  
Proyecto NC123340.0.

## ABREVIATURAS

**ACh** acetilcolina

**ACTH** adrenocorticotrofina  
rápidos

**BC** braquium conjuntivum

**C-PBL** región peribraquial caudo-lateral

**EEG** electroencefalograma

**EMG** electromiograma

**EOG** electro-oculograma

**Frnc** formación reticular bulbar magnocelular

**FRP** formación reticular pontina

**FRPm** formación reticular pontina medial

**FTG** campo tegmental gigantocelular

**GABA** ácido gamma-aminobutírico

**Hz** hertz

**LC** locus coeruleus

**LDT** núcleo laterodorsal del tegmento pontino

**NCF** núcleo cuneiforme

**NE** norepinefrina

**NRM** núcleo reticular magnocelular

**PBL** región parabraquial

**PBN** núcleo parabraquial

**PCPA** paraclorofenianilina

**PPT** núcleo pedunculopontino tegmental

**RD** rafe dorsal

**REM** sueño con movimientos oculares

**REMs** movimientos oculares rápidos

**R-PBL** parte rostral de la región  
peribraquial

**RPC** núcleo reticularis pontis caudalis

**RPO** núcleo reticularis pontis oralis

**SLD** núcleo sublaterodorsal

**SPHOL** *sommeil phasique a ondes lentes*

**SubCD** parte dorsal del núcleo  
subcoeruleus

**SWS** sueño en ondas lentas

**VIPAG** sustancia gris periacueductual  
ventrolateral

**W** vigilia

**5-HT** serotonina



## ÍNDICE

1.	Resumen	1
1.1.	Abstract	2
2.	Introducción	3
3.	Estado de vigilia y fases del sueño en el humano	8
4.	Fases del sueño en el gato	10
4.1.	Vigilia	11
4.2.	Sueño en ondas lentas	13
4.3.	Sueño fásico en ondas lentas (SP)	13
4.4.	Sueño REM	15
5.	Mecanismos del Sueño	17
5.1.	Estado de vigilia	17
5.2.	Sueño de ondas lentas	19
5.3.	Sueño con movimientos oculares rápidos (REM)	22
5.4.	Regulación colinérgica del sueño REM	27
5.5.	Mecanismos corticales de desincronización EEG	29
5.6.	Atonía muscular	29
5.7.	Movimientos oculares rápidos (REMs)	30
6.	Potenciales ponto-geniculo-occipitales (PGO)	31
6.1.	Generación pontina de los potenciales PGO	33
6.2.	Propagación de los potenciales PGO	36
6.3.	Regulación y control de los potenciales PGO	40
7.	Región peribraquial caudo-lateral (C-PBL)	43
8.	Planteamiento del problema	46
9.	Hipótesis	47
9.1.	Objetivo general	47
9.2.	Objetivos específicos	47

10.	Material y Método	48
10.1.	Sujetos experimentales	48
10.2.	Material	49
10.3.	Procedimiento quirúrgico	50
10.4.	Registros polisomnográficos	52
10.5.	Administración de sustancias	53
10.6.	Verificación histológica	55
10.7.	Valoración y análisis de los estados conductuales y de la actividad PGO	56
10.8.	Análisis estadístico	56
11.	Resultados	58
11.1.	Activación del generador pontino de potenciales PGO	58
11.2.	Organización del sueño después de las pruebas experimentales	59
11.3.	Estado de vigilia	62
11.4.	Sueño de ondas lentas	63
11.5.	Sueño sincronizado con potenciales PGO (SP)	65
11.6.	Sueño REM	66
11.7.	Latencia al sueño lento y al sueño REM	67
11.8.	Duración promedio del sueño REM	68
11.9.	Conteo total de potenciales PGO	69
12.	Discusión	71
13.	Conclusión	76
14.	Modelo	77
15.	Referencias bibliográficas	78

## ANEXO

Publicación del proyecto de investigación

## 1. RESUMEN

*Objetivo:* Con el fin de explorar el posible papel del GABA, de acetilcolina y de glutamato en la zona peribrachial caudo-lateral (C-PBL) sobre la instalación y mantenimiento del sueño con movimiento oculares rápidos (REM), así como del sueño sincronizado (SP) con ondas ponto-geniculo-occipitales (PGO) en gatos, se realizó la aplicación local de muscimol, carbacol y de L-glutamato en la región C-PBL y se evaluaron los estadios conductuales.

*Método:* Catorce gatos machos adultos fueron implantados crónicamente y fueron sometidos a un registro polisomnográfico de 23 horas después de tres manipulaciones farmacológicas: carbacol, muscimol y L-glutamato. Cada gato recibió los tres fármacos de manera aleatoria con un intervalo de siete días.

*Resultados:* 1) El carbacol aumentó la vigilia, el SP y el sueño REM, mientras que el sueño de ondas lentas disminuyó (SWS). 2) El muscimol disminuyó el porcentaje y número de SP además de aumentar la latencia al sueño REM. 3) El carbacol facilitó la actividad PGO y aumentó la latencia tanto al SWS1 y al sueño REM, pero promovió la actividad PGO mientras que el muscimol la redujo.

*Conclusiones:* La acetilcolina promovió los estados relacionados a la actividad PGO (SP, así como sueño REM), mientras que el GABA redujo solamente el SP y específicamente a la actividad PGO.

## 1.1. ABSTRACT

*Purpose:* In order to explore the potential role of GABA, acetylcholine and glutamate in the caudo-lateral peribrachial area (C-PBL) over Rapid-Eye-Movement sleep (REM) onset and maintenance as well as on synchronized sleep with ponto-geniculo-occipital (PGO) waves (SP) in cats, a muscimol, carbachol and L-glutamate local application was performed and behavioral states were assessed.

*Methods:* Fourteen chronically implanted, adult, male cats underwent a 23 hour polysomnographic recording after 3 pharmacological manipulations: carbachol, muscimol and L-glutamate. Each cat received all three drugs randomly with a seven day interval. *Results:* 1) Carbachol increased waking, SP and REM sleep while decreased slow wave sleep (SWS). 2) Muscimol decreased SP percentage and number while increased REM sleep onset. 3) Carbachol facilitated PGO activity increased the latency to both SWS1 and REM sleep but enhanced PGO activity while muscimol decreased it.

*Conclusions:* Acetylcholine promoted PGO related states (SP) as well as REM sleep, while GABA reduced only SP and specifically PGO's.

## 2. INTRODUCCIÓN

La vigilia, el sueño de ondas lentas y el sueño con movimientos oculares rápidos son estados fisiológicos presentes en todos los mamíferos, incluyendo al hombre (Kleitman, 1963; Hassenberg, 1965; Jouvet, 1972; Aserinsky y Kleitman, 1953). La vigilia y el sueño son estados fisiológicos que se suceden de manera cíclica. La gran cantidad de eventos conductuales, neurofisiológicos, neuroquímicos, vegetativos, endocrinos, etc. que acompañan a cada uno de estos estados, han propiciado el estudio parcial o por separado del sueño y la vigilia (W por la sigla en inglés Wakefulness). Sin embargo, son estados dependientes entre sí y la alteración del curso normal de uno puede repercutir sobre la fisiología del otro. En el transcurso del sueño se presentan también en forma periódica dos estadios principales: el sueño de ondas lentas electroencefalográficas (SWS, del inglés slow wave sleep) y el sueño con movimientos oculares rápidos (REM del inglés Rapid Eye Movements). Durante cada uno de éstos ocurren a su vez variaciones cíclicas de diferentes funciones neuronales y somáticas. Todos estos cambios fisiológicos que se manifiestan durante el sueño, hacen evidente que este estado es un proceso activo. Es importante mencionar que tanto el sueño, como la vigilia, cumplen funciones cerebrales vitales y además que son estados peculiares de interacción dinámica entre regiones específicas del cerebro. Por otra parte, el conocimiento actual acerca de las regiones cerebrales responsables de los mecanismos de instalación del sueño y de su regulación cíclica a largo plazo, se ha obtenido a partir de estudios en animales de experimentación, particularmente del gato y de la rata.

En 1953 Aserinsky y Kleitman, observaron clínicamente en el niño dormido que de manera periódica los ojos se movían con rapidez (sin abrirlos) y que concomitantemente aparecía una actividad electroencefalográfica (EEG) rápida y de bajo voltaje semejante a la que se encuentra al inicio del sueño o durante la vigilia. A esta fase de sueño la denominaron como sueño de movimientos oculares rápidos. Después de que Aserinsky y Kleitman descubrieron el sueño REM en el ser humano, Dement en 1958 demostró que en los gatos tiene lugar una fase idéntica del sueño y más tarde Jouvet y Michel en 1959 describieron esta fase como sueño REM en el gato.

El sueño REM se acompaña de cambios electrofisiológicos, como la atonía muscular, movimientos oculares rápidos, conjugados y un EEG con gran actividad. Es importante mencionar que actualmente se conocen muchos de los mecanismos y neurotransmisores involucrados en la regulación del sueño REM en la rata, sin embargo, en el gato ha sido poco estudiada la interacción entre el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el glutamato a nivel pontino sobre la instalación y mantenimiento del sueño REM y sobre la actividad ponto-geniculo-occipital (PGO). Por lo tanto el objetivo del presente estudio será conocer y analizar la participación de ambos neurotransmisores sobre la regulación del sueño, específicamente en la región peribraquial caudo-lateral (C-PBL) del tallo cerebral, área que ha demostrado tener un papel importante sobre la generación del sueño REM y sobre la actividad PGO mediante activación colinérgica.

El sueño REM es un estado fisiológico regulado por la interacción de diferentes neurotransmisores: acetilcolina (ACh) (Calvo et al., 1992; Hernández-Peón, 1965;

Jouvet, 1972; Mignot, 2008), glutamato (Clément et al., 2011; Datta et al., 1998, 2001; Kodama et al., 1998; Lu et al., 2006; Luppi et al. 2012; Sakai y Koyama, 1996) y GABA (Boissard et al., 2002; Luppi et al., 2013; Xi et al., 1999). Se sabe bien que los mecanismos colinérgicos tienen un papel fundamental en la generación y mantenimiento del sueño REM (Baghdoyan et al., 1987, 1989; Datta et al., 1991; Márquez-Ruiz y Escudero, 2010; Murillo-Rodriguez et al., 2012; Pal y Mallick, 2007). Específicamente, se ha demostrado que la activación de regiones celulares colinérgicas del núcleo pedunculo-pontino tegmental (PPT) y del núcleo laterodorsal tegmental (LDT) que se encuentran dentro de la región C-PBL se asocia con la regulación del sueño REM, de hecho esta activación es facilitada por receptores de glutamato de tipo kainato (Datta et al., 1991; Quattrochi et al., 1989; Sakai et al., 1990).

Por otra parte, cabe mencionar que la liberación de glutamato en la formación reticular pontina medial (FRPm) se ve aumentada durante el sueño REM en condiciones normales, así como después de su estimulación colinérgica. Específicamente, el PPT participa en la generación del sueño REM, a través de la activación de células colinérgicas que a su vez son reguladas por glutamato (Datta et al., 2001; Datta y Maclean, 2007), sin embargo aún queda por determinar el papel del glutamato en otras regiones pontinas sobre la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Uno de los signos fisiológicos más claros del sueño REM, son los potenciales PGO, estos aparecen tanto en los estados sincronizados de transición que preceden al sueño REM, como durante los episodios de sueño REM. Entre los muchos grupos celulares activos durante el REM (REM-on), la activación de neuronas del C-PBL en

animales predadores como el gato genera a los potenciales PGO (Brooks y Bizzi, 1963; Datta y Hobson, 1994; Jouvet, 1965), mientras que en animales presa los potenciales equivalentes (Ondas-P) son generados en la parte dorsal del núcleo subcoeruleus (Sub-CD) (Datta., 1998; Datta et al., 1999).

Se ha identificado que la células generadoras de las ondas P en ratas son de origen glutamatérgico (Datta., 2006) mientras que las ondas PGO en el gato son inducidas de manera colinérgica (Datta., 1992; Datta y Maclean, 2007; Henrisken et al., 1972; Hobson y Friston, 2012; Márquez-Ruiz y Escudero, 2010). Sin embargo, una variedad de poblaciones neuronales involucradas en la regulación del sueño coexisten con la región C-PBL. Mediante estudios neuroanatómicos en gatos restringidos de movimiento, se ha demostrado que el 50% de las neuronas del C-PBL en realidad son de origen GABAérgico y que estas son activadas principalmente durante el sueño de ondas lentas (Torterolo et al., 2011). Torterolo y sus colaboradores sugieren de manera específica, que estas neuronas desempeñan o cumplen un rol fundamental en el control pontino de los procesos respiratorios y autónomos durante el SWS y durante los periodos de transición al sueño REM. Sin embargo, el rol de las neuronas restantes de la región C-PBL durante el REM y específicamente sobre sus componentes fásicos se desconoce actualmente.

La participación de mecanismos GABAérgicos en la instalación y mantenimiento del sueño REM en otros núcleos pontinos ha sido bien descrita, especialmente, se ha demostrado que la activación del núcleo sublaterodorsal (SLD) en ratas (equivalente al peri-locus coeruleus alpha de gatos), se relaciona con la



generación del sueño REM, de manera notable esta facilitación es más intensa cuando es excitada por antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> tales como la bicuculina o “gabazine”. Por otra parte, la inyección de bicuculina y faclofen (antagonista de los receptores GABA<sub>B</sub>) en el peri-locus coeruleus de gatos aumenta las cantidades de sueño REM y disminuye su latencia de aparición, mientras que la inyección de muscimol o baclofen (agonista de los receptores GABA<sub>B</sub>) induce vigilia (Xi et al., 1999, 2004). En ratas con la cabeza restringida de movimiento, se ha demostrado que las neuronas del rafe dorsal (RD) así como aquellas del locus coeruleus (LC) inhiben la actividad de las neuronas serotoninérgicas del RD (células REM-off), facilitando de este modo la instalación del sueño REM (Gervasoni et al., 1998, 2000). Por lo tanto, una conexión recíproca en diferentes áreas pontinas, la cual involucra mecanismos GABAérgicos de hecho, podría asociarse con la inhibición o con la instalación y mantenimiento del sueño REM.

Sin embargo, con respecto a la regulación de los fenómenos fásicos del sueño REM (PGOs) y a los periodos de transición del sueño en ondas lentas al REM, puede ser que ambos fenómenos sean regulados por una diferente interacción entre GABA, acetilcolina y glutamato. Nosotros proponemos que esta regulación puede estar teniendo lugar específicamente en la región C-PBL. De acuerdo con lo antes mencionado, el propósito de este estudio es analizar de qué manera la estimulación GABAérgica y glutamatérgica de la región C-PBL puede influir sobre los mecanismos de regulación del ciclo sueño-vigilia, sobre los estados relacionados con los potenciales PGO y directamente sobre la actividad PGO.

### 3. Estado de vigilia y fases del sueño en el humano

El descubrimiento y la descripción electrofisiológica del sueño REM permitieron completar la clasificación de los estadios del sueño en humanos, en un comité internacional encabezado por Rechtschaffen y Kales en 1968, se logró establecer un criterio común. Esta clasificación fue hecha a partir de la relación temporal que guardan los cambios del EEG, del electrooculograma (EOG) y del electromiograma (EMG) durante el dormir (Rechtschaffen y Kales, 1968). Sin embargo, esta clasificación ya no es utilizada y en el año de 2007 la Academia Americana de Medicina del Sueño (AASM) estableció un nuevo criterio para la valoración del sueño y de los eventos asociados a dicho fenómeno. A continuación se describen las fases del sueño en el hombre según la clasificación de dicho manual:

**VIGILIA.** El EEG de un sujeto relajado y con los ojos cerrados pero que aún se encuentra en estado de vigilia muestra la presencia de ritmo alfa (8-13 Hz)  $\geq 50\%$  de la época (una época equivale a 30 segundos), en las regiones parietooccipitales, que puede alternar con ritmos beta (14-26 Hz). El EOG puede o no mostrar movimientos oculares y la actividad EMG muestra la presencia de tono muscular con variaciones de alto voltaje.

**N1 (NREM1).** EEG con actividad de baja amplitud y frecuencias mixtas predominantemente de 4 a 7 Hz o ritmo theta. Posibles ondas agudas del vertex (onda puntiaguda negativa con duración  $< 0.5$  segundos predominantemente central); movimientos oculares lentos (SEMs) con deflexión profunda  $> 500$ mseg. Actividad alfa

≤50 % de la época y ausencia de husos de sueño así como de complejos K. Actividad muscular de moderada a baja. El ritmo alfa se atenúa y es remplazado por actividad theta en más del 50% de la época.

**N2 (NREM2).** Aparecen brotes de actividad fusiforme de amplio voltaje (12-14 Hz), denominados “husos de sueño”. Los husos de sueño son ondas sinusoidales de baja amplitud, son breves e intermitentes (0.5 a 2 segundos) y se presentan con una densidad de 3 a 8 por minuto. Aparecen también los complejos K: onda aguda negativa seguida por un componente positivo, de gran amplitud  $\geq$  a 75  $\mu$ V, con una duración de 0.5 seg, se presentan con una densidad de 1 a 3 por minuto (predominantemente centrales). Concomitantemente el tono muscular disminuye.

**N3 (NREM3).** Actividad de alto voltaje y baja frecuencia en el EEG  $\geq$  50 %. Ondas de gran amplitud  $\geq$  75  $\mu$ V (varia con la edad), el rango de frecuencia es de 0.5 a 3 Hz, mayor voltaje en la región Frontal pero se observan en todas las derivaciones EEG.

**REM.** Aproximadamente de 80 a 110 minutos de conciliado el sueño aparece el primer episodio de sueño REM, que dura entre 15 y 20 minutos. Posteriormente el sueño REM aparece a intervalos de 90 minutos y su duración aumenta progresivamente, pudiendo durar hasta 40 minutos. Presencia de frecuencias mixtas y EEG desincronizado de relativo bajo voltaje. Ritmo theta, beta y ondas mu en forma de dientes de sierra. Comprende al REM fásico en el cual se presentan los movimientos oculares rápidos (REMs) y al REM tónico en el que los REMs no están presentes.

El EOG muestra la aparición de REMs de manera aislada o bien, organizados en salvas de hasta 50 movimientos (Aserinsky y Kleitman, 1953). Los REMs son

conjugados, irregulares y con una deflexión < 500ms.

Hay atonía muscular en ocasiones interrumpida por breves contracciones fásicas que pueden coincidir con los REMs (Jouvet et al., 1959). El EMG del mentón disminuido (atonía muscular), sin embargo, puede haber actividad muscular transitoria. Esta actividad consiste en brotes cortos, irregulares de actividad muscular con una duración menor a 25 milisegundos “twitches”.

#### **4. FASES DEL SUEÑO EN EL GATO**

El gato es un mamífero que presenta de manera cíclica tanto los estados de vigilia y sueño, como los estados de sueño en ondas lentas y el sueño REM. Además, es un animal en el cual se ha llevado a cabo la mayor parte de la investigación sobre los mecanismos neurobiológicos del sueño. Debido a que el presente estudio experimental fue realizado en el gato, a continuación se describen las propiedades poligráficas y los mecanismos del sueño en esta especie.

Las características poligráficas y el método para valorar la organización temporal del sueño en el gato, también han sido compilados en un manual para valorar el sueño de este animal (Ursin y Sterman, 1981).

## **4.1. Vigilia**

### **Aspectos Conductuales.**

En un animal despierto se pueden observar gran variedad de conductas, desde simples (reacción de orientación), hasta conductas elaboradas en respuesta a la estimulación ambiental. Por ejemplo, cuando está quieto, mantiene la cabeza levantada, lo que le permite responder rápidamente a los estímulos del medio ambiente: tiene los ojos abiertos, el diámetro pupilar variable de acuerdo con la naturaleza e intensidad luminosa, así como de los estímulos que percibe además de una ventilación rápida e irregular (Ayala, 1976; Ayala, 1983).

### **Aspectos Poligráficos.**

En el estado de alerta se aprecia una actividad electroencefalográfica, y subcortical con frecuencias rápidas (20 a 30 Hz) de bajo voltaje (20 a 30  $\mu$ V) y una actividad más lenta (5 a 7 Hz) en la porción rostral del hipocampo. Durante la vigilia atenta, el tono muscular es elevado y existe un gran número de movimientos oculares. Mientras que en la vigilia tranquila, la actividad cortical alcanza una frecuencia entre 5 y 8 Hz y en las regiones subcorticales la actividad permanece elevada (Jouvet, 1967). Cuando el animal se encuentra atento y mueve los ojos en función de la estimulación externa, se registra una actividad eléctrica fásica en el cuerpo geniculado lateral (LGB, por sus siglas en inglés) y en la corteza occipital que recibe el nombre de “potenciales de movimiento ocular” (Brooks, 1968); cabe destacar que dichos potenciales se presentan después del movimiento ocular y su amplitud depende de la velocidad del

movimiento ocular, así como de la intensidad del estímulo luminoso (Jouvet, 1972).

Figura 1.

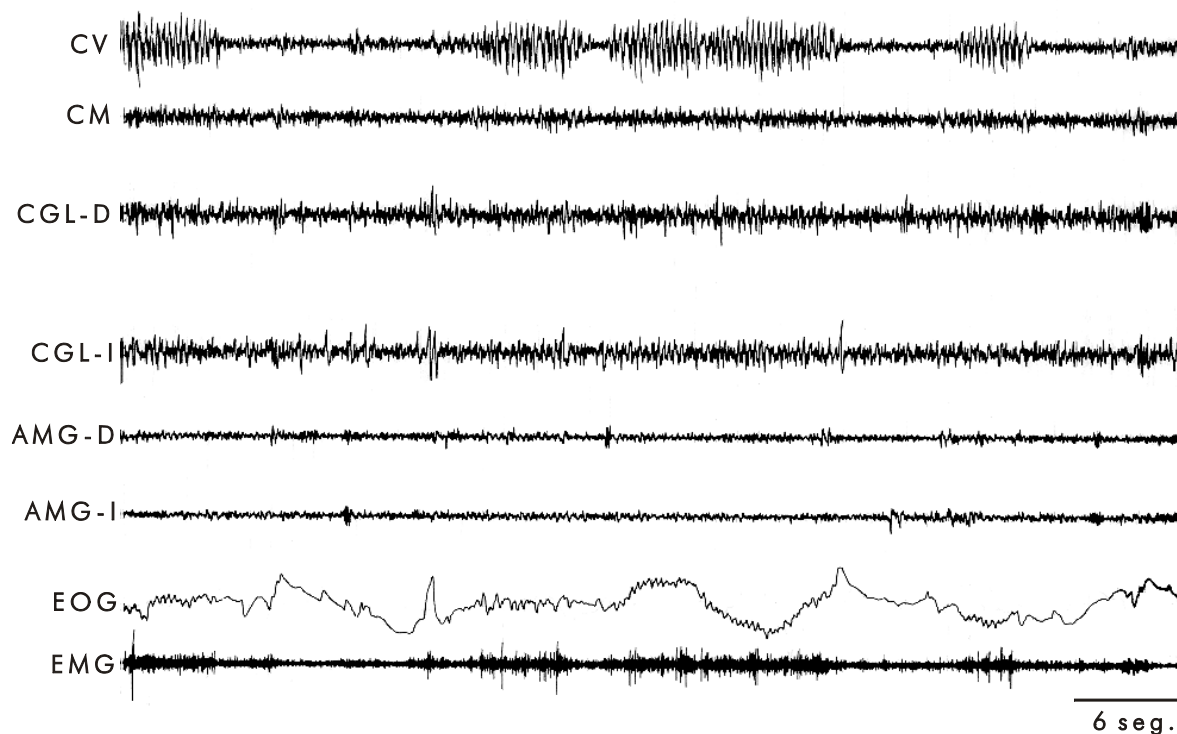


Figura 1. Trazo poligráfico del estado de vigilia del gato. Nótese, la presencia de tono muscular, movimientos oculares y desincronización EEG. Abreviaciones: CV, corteza visual; CM, corteza motora; CGL, cuerpo geniculado lateral derecho e izquierdo; AMG, amígdala del lóbulo temporal derecha e izquierda; EOG, electrooculograma; EMG, electromiograma.

## **4.2. Sueño en ondas lentas.**

### **Aspectos conductuales.**

Durante la fase SWS1, el gato adopta la posición de “esfinge”, manteniendo inicialmente la cabeza erguida dejandola caer progresivamente y se presenta el cierre palpebral y la relajación de las membranas nictitantes. En la fase SWS2, el animal apoya la cabeza en sus patas anteriores y la actividad muscular disminuye progresivamente. Por otra parte, se aprecia la lentificación de la frecuencia respiratoria (Jouvet, 1967).

### **Aspectos poligráficos.**

Electrofisiológicamente, el SWS1 se caracteriza por la aparición de ondas lentas (3-4 Hz) de alto voltaje mezclados con frecuencias rápidas (13-26 Hz), además de una estabilización y disminución del tono muscular con relación a la vigilia. Figura 2-A. La fase de SWS2 se caracteriza por la aparición de la actividad Delta (0.5-4 Hz) sostenida y de alto voltaje, que en ocasiones alterna con la aparición de husos de sueño (15-16 Hz), Figura 2-B.

## **4.3. Sueño fásico en ondas lentas (SP)**

Después de algunos minutos de iniciada esta fase del sueño, comienzan a aparecer los potenciales ponto-geniculo-occipitales (PGO), que siempre preceden al sueño REM (20 a 30 segundos). A estos periodos de transición entre el SWS y el sueño REM, se les ha denominado sueño fásico en ondas lentas SPHOL, del francés *sommeil phasique a ondes lentes* (Thomas y Benoit, 1967). Figura 3

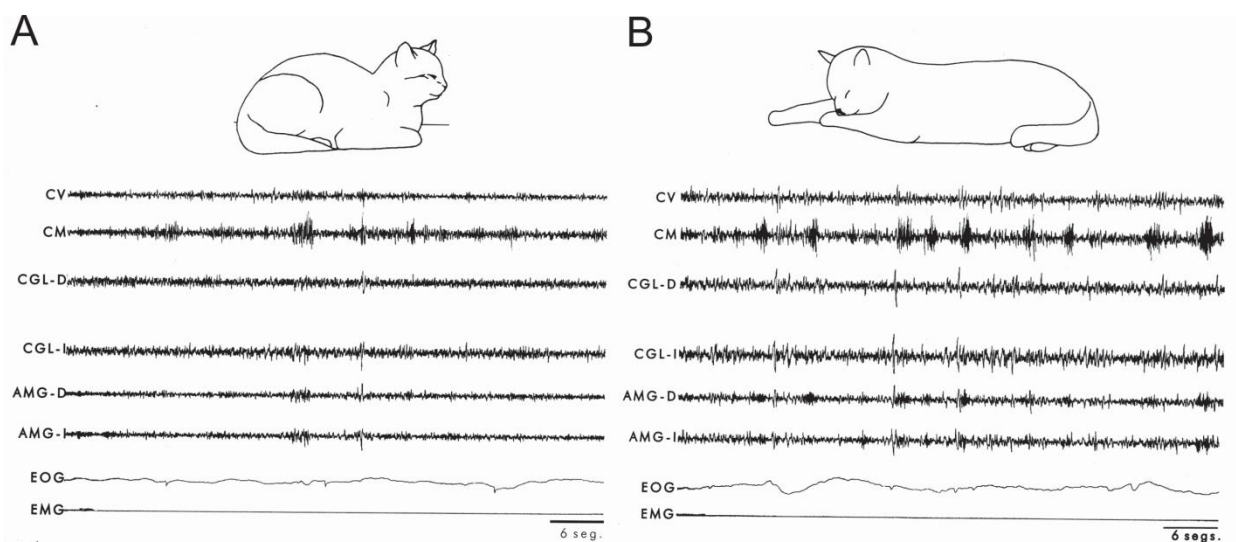


Figura 2. **A.** Fase 1 del sueño. Nótese la ausencia de tono muscular y de REMs y la aparición de actividad EEG lenta y de alto voltaje. **B.** Fase 2 del sueño. Nótese, la aparición sostenida de husos del sueño. Abreviaciones como en la figura 1.

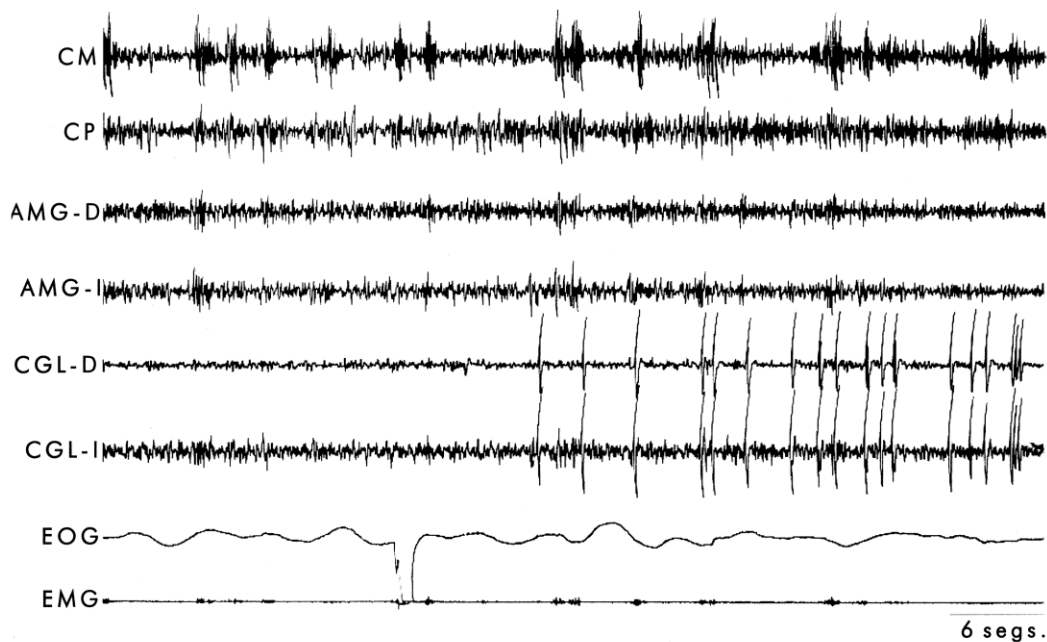


Figura 3. Sueño sincronizado con potenciales PGO (SP). Nótese la aparición de potenciales PGO simples y de alto voltaje y la presencia de husos del sueño. Abreviaciones como en la Figura 1.



#### **4.4. Sueño REM**

##### **Aspectos conductuales.**

Durante el sueño REM, los gatos toman la posición de ovillo y se puede observar la aparición de los movimientos oculares rápidos en sentido horizontal, vertical u oblicuo, los cuales se acompañan de miosis acentuada ininterrumpida fásicamente por breves midriasis y de retracciones fásicas de las membranas nictitantes (Berlucchi et al., 1964). Aparecen movimientos fásicos rápidos de las orejas, las vibrisas y de las extremidades. La ventilación se vuelve irregular y con periodos cortos de apnea.

##### **Aspectos poligráficos.**

El sueño MOR ocurre de una manera cíclica y siempre después de un periodo de SOL y su duración promedio es de 4 minutos. Poligráficamente, se caracteriza por la desincronización EEG, atonía muscular, los MORs y los potenciales PGO. Figura 4

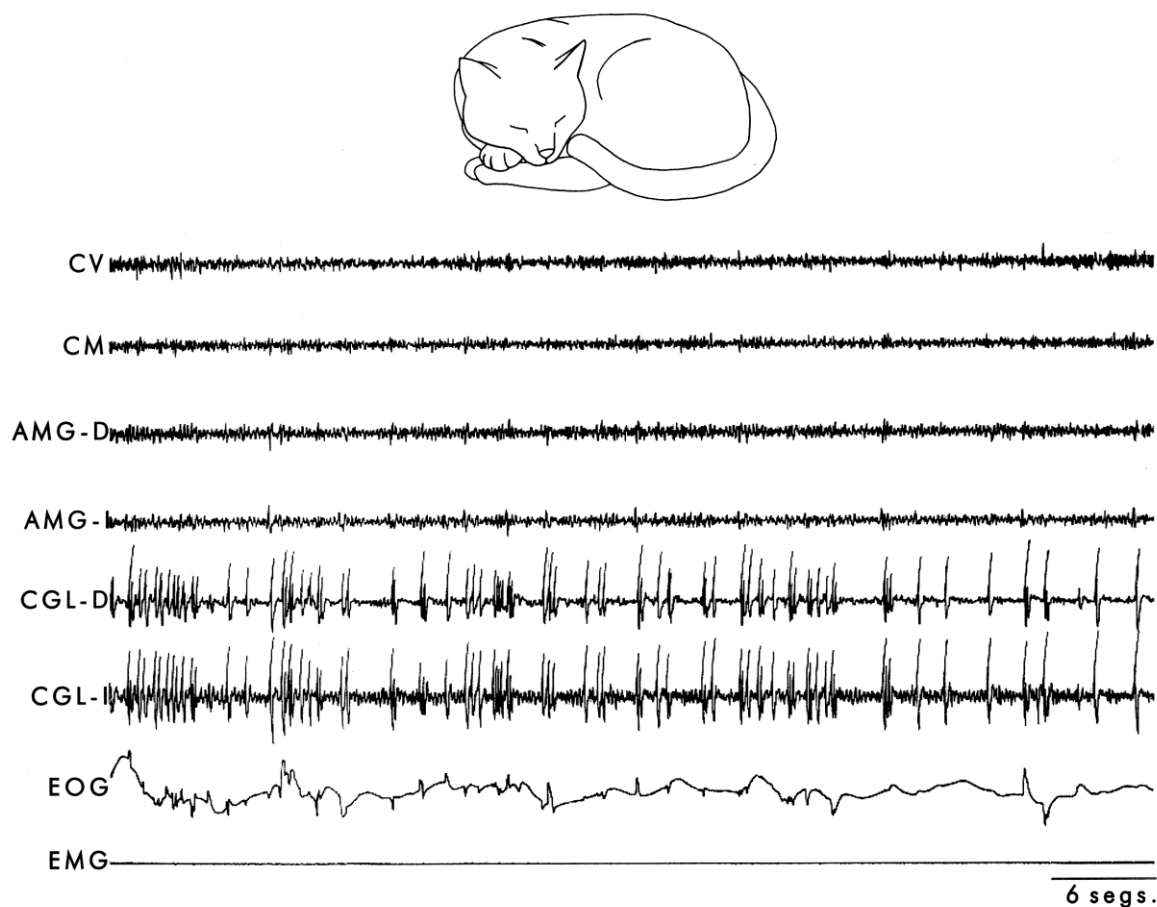


Figura 4. Sueño con movimientos oculares rápidos (REM). Nótese, la aparición sostenida de salvas de potenciales PGO, la aparición de movimientos oculares rápidos (REMs), la ausencia de tono muscular y la desincronización EEG. Abreviaciones como en la figura 1.

## 5. MECANISMOS DEL SUEÑO

### 5.1. Estado de Vigilia

Los estudios iniciales sobre los mecanismos de los estados del sueño y la vigilia fueron llevados a cabo por Constantine Von Economo en 1918; cuando hubo una gran epidemia de “influenza” que invadió prácticamente todo el mundo, este virus infectaba al cerebro y destruía a las neuronas, el síndrome neurológico que seguía a la infección cerebral por el virus se denominó “encefalitis letárgica” porque los sujetos afectados eran incapaces de mantenerse en estado de vigilia activa, que algunas veces llegó a ser irreversible. Constantine Von Economo descubrió que las células muertas se localizaban en las regiones subcorticales del cerebro, principalmente en el tallo cerebral, en el área llamada *substantia nigra* (Von Economo, 1930). El complemento de estas observaciones fue el trabajo de Frederic Bremer mediante el uso del EEG. Bremer registró el EEG en gatos, después de realizar un corte transversal completo del tallo cerebral superior y observó que los animales quedaban perpetuamente somnolientos y su EEG era típico de sueño. En su siguiente experimento dividió el tallo cerebral en un nivel inferior (entre la médula y la espina dorsal) y observó (en vez del sueño que él esperaba) signos conductuales y eléctricos del estado de alerta que alternaban con estados de sueño, de manera espontánea (Bremer, 1935).

Más tarde, a fines de los años cuarenta, después de la segunda guerra mundial, un investigador llamado Moruzzi, viajó a Estados Unidos para continuar trabajos de investigación que no podía realizar en Europa, ahí colaboró con Horace Magoun. Al colocar electrodos en el tracto piramidal del tallo cerebral para estimular las células de

la corteza motora, su interés era estudiar las funciones del sistema motor, sobre todo del sistema neuronal que vincula a la corteza, donde se generan los movimientos voluntarios, con las astas ventrales de la médula, de donde se originan los impulsos nerviosos que activan a los músculos. Al cambiar el sitio de estimulación a la formación reticular del tallo cerebral, Moruzzi y Magoun encontraron que la actividad EEG de sueño cambia a un patrón EEG de vigilia. Este efecto se acompañó de un despertar conductual. Ambos efectos duraban más que la misma estimulación, lo cual indicaba que en el tallo cerebral había estructuras cuya activación podía producir simultáneamente un despertar EEG y conductual duradero. Moruzzi y Magoun establecieron que el principal sustrato morfológico para la generación y mantenimiento de la fase de vigilia era la formación reticular del tallo cerebral y lo denominaron como, sistema reticular activador ascendente (Moruzzi y Magoun, 1949).

En estudios posteriores se demostró, que los impulsos ascendentes del tallo cerebral hacia la corteza, para generar un EEG activado, pueden seguir una vía a través del tálamo o bien por una vía extratalámica a través del subtálamo y el prosencefalo basal (Jones, 1991). La ruta extratalámica para la activación del EEG, por el sistema reticular, es ventral al tálamo, a través del subtálamo, hipotálamo y prosencefalo basal. Al igual que en la vía dorsal a través del tálamo, las neuronas donde se origina la vía ventral se encuentran en el mesencéfalo y en el puente oral, o bien pueden situarse en el prosencefalo basal, como es el caso de las células colinérgicas de esta región, que inervan de manera difusa la corteza cerebral. Las células colinérgicas del prosencefalo basal reciben aferencias ascendentes desde

algunas células colinérgicas, pero sobre todo desde células no colinérgicas de la formación reticular.

## **5.2. Sueño de Ondas Lentas**

Pieron en 1913 realizó experimentos, en los cuales mantenía a perros despiertos, los perros eran sacados a pasear por las noches en las calles de Paris, además, eran sujetados a la pared con un pequeño collar de manera que no pudieran relajarse para dormir. Este procedimiento suprimía del todo el sueño. La inyección del fluido cerebroespinal de perros privados de sueño en la cisterna magna de animales no privados de sueño, inducía el sueño durante 2-6 horas después de la inyección (Pieron, 1913). Pappenheimer y sus colaboradores en 1967 realizaron una nueva investigación del fenómeno de Pieron. Ellos obtenían el fluido cerebral de cabras privadas de sueño a las cuales se les canalizaba el sistema ventricular y cuando este fluido lo inyectaban en el sistema ventricular de gatos y ratas, el fluido inducía signos clínicos de sueño, al menos por 18 horas, mientras que no había cambios conductuales en animales inyectados con fluido de cabras no privadas de sueño (Pappenheimer et al., 1967). Mas tarde Jouvet y Renault en 1966 reportaron que la destrucción total del sistema del rafe, desde la médula superior hasta la unión ponto-mesencefálica, era seguida por un insomnio total que persistía durante 3 o 4 días (Jouvet y Renault ,1966).

El estudio clásico de los mecanismos neurofisiológicos del sueño, es el de Bremer en 1935. Él observó la relación que existe entre las secciones transversales

del tallo cerebral sobre el EEG cortical del gato. La sección total del tallo realizada al nivel de la unión mesodiencefálica, seccionando todas las aferencias de los nervios craneales, a excepción de los pares I y II y las eferencias motoras del cerebro, con excepción de las responsables de los movimientos oculares verticales, provoca signos EEG y vegetativos semejantes a los del sueño de ondas lentas. La actividad EEG lenta es permanente, con breves periodos de alertamiento que solo se logran por medio de una estimulación sensorial muy intensa. Bremer denominó a esta preparación cerebro aislado (del francés "*cerveau isolé*").

Con el fin de verificar la importancia de la formación reticular en el control del sueño, Bremer practicó una sección total al nivel de la unión medular con el tallo cerebral. La sección en este nivel elimina toda la entrada somato-sensorial, dejando intactas las aferencias de los nervios craneales. Bremer denominó a esta preparación *encéfalo aislado* (del francés "*encephalé isolé*"), con la que mostró que cuando el EEG está sincronizado, la estimulación sensorial produce el despertar electroencefalográfico y conductual de larga duración así como dilatación pupilar. También, encontró que en ausencia de estímulos sensoriales, el animal presentaba periodos espontáneos y alternantes de despertar y sueño, similares a los que aparecen en el animal intacto (Bremer, 1935).

El sueño de ondas lentas se caracteriza por la aparición de husos de sueño en el EEG. Éstos, consisten en una actividad sincronizada de 8 a 14 Hz, de 1 a 2 segundos de duración, cuyo voltaje va aumentando gradualmente y luego disminuye dándole la forma característica de huso.

Por otra parte, Hess en 1944 exploró el tallo cerebral mediante estimulación eléctrica a bajas frecuencias para entender el control de funciones como la presión sanguínea, la respiración y el ritmo cardíaco, al mismo tiempo descubrió que la estimulación rítmica del tálamo, una estación de relevo del cerebro entre el tallo cerebral y la corteza, podía producir ondas lentas en el EEG y sueño conductual (Hess, 1944).

La estructura responsable de la aparición de los husos de sueño, es el núcleo reticular del tálamo. Esto ha podido comprobarse mediante, la lesión de este núcleo, la cual provoca la desaparición de los husos de sueño. El núcleo reticular del tálamo, actúa como marcapasos, haciendo que los sistemas tálamo corticales oscilen a la frecuencia de 8 a 14 Hz. (Steriade et al., 1984; Steriade et al., 1990). Este fenómeno está apoyado por el hecho de que la actividad EEG a la frecuencia de los husos de sueño, puede registrarse en neuronas del núcleo reticular del tálamo, aisladas de sus aferencias talámicas y corticales (Steriade, 1987).

Además, las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo son las que descargan de forma espontánea a la frecuencia de los husos de sueño. Esta descarga produce en los núcleos de relevo talámicos hiperpolarizaciones rítmicas. La hiperpolarización produce activación de una corriente de calcio, que a su vez genera una espiga y una salva de potenciales de acción. Los núcleos talámicos paralaminares, transmiten hacia la capa uno de la corteza esta actividad. La salva de potenciales de acción en la célula de relevo talámica excita las neuronas del núcleo

reticular del tálamo y comienza de nuevo el ciclo (Steriade et al., 1993a; Steriade et al., 1993b).

Las estructuras facilitadoras del sueño de ondas lentas han sido encontradas en la parte caudal del tallo cerebral, la principal zona hipnogénica a este nivel es la región del tracto solitario, cuya estimulación eléctrica a baja frecuencia produce sincronización en el EEG y conducta de sueño (Magnes et al., 1967). La existencia de estructuras del tallo implicadas en la generación del sueño en ondas lentas no se limita al bulbo raquídeo, sino que en el puente caudal también se han encontrado estructuras cuya lesión produce tanto disminución en la sincronización del EEG, como la aparición de vigilia.

La región preóptica situada en el cerebro anterior es otra zona directamente implicada en la generación del sueño de ondas lentas. El área preóptica va desde el hipotálamo anterior hasta por delante del quiasma óptico, en esta área hay subpoblaciones de neuronas colinérgicas (mayor número) que disparan durante la vigilia y el sueño REM y una población menor de neuronas GABAérgicas (25% del total) que aumentan su frecuencia de descarga durante la somnolencia y alcanzan su frecuencia máxima durante el SWS (McGinty y Szymusiak, 1998; Gritti et al., 1998; Gallopin et al., 2000; Eggermann et al., 2001).

### **5.3. Sueño con movimientos oculares rápidos (REM)**

Además del descubrimiento del sueño REM en el ser humano (Aserinsky y Kleitman 1953), se demostró que esta fase del sueño también aparece en el gato y en



varias especies de aves y mamíferos (Jouvet, 1965). Este hallazgo ha permitido avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos neurobiológicos responsables de la instalación y mantenimiento del sueño REM, debido a que en animales experimentales, es posible explorar las regiones subcorticales y los cambios bioquímicos responsables de la generación de esta fase del sueño, en regiones específicas del cerebro.

El sueño REM es un estado fisiológico regulado a largo plazo por neurotransmisores como la serotonina y la acetilcolina (Hernández Peón, 1965; Jouvet, 1972; Calvo et al., 1992) entre otros. El sueño REM alterna con episodios de sueño en ondas lentas (SWS) y siempre está precedido y acompañado por la aparición de potenciales PGO (Jouvet, 1967; Thomas y Benoit, 1967).

Una red neuronal pontina ha sido postulada como la generadora del sueño REM. La zona paramedial de tegmento pontino anterodorsal y el núcleo tegmental pontino (el cual juega un papel importante en la generación de los potenciales PGO) han sido considerados como componentes importantes de dicha red neuronal para la inducción del sueño REM (Sakai, 1979).

Debido a que los potenciales PGO siempre preceden el establecimiento del sueño REM y debido a que su frecuencia aumenta durante este estado, existe un consenso general de que los mecanismos generadores de los potenciales PGO, constituyen un componente clave para la generación y mantenimiento del sueño REM (Jouvet, 1972; Jouvet, 1984; Callaway et al., 1987).

Los primeros intentos por describir los mecanismos neurofisiológicos del sueño

REM fueron realizados por Jouvet en 1962. Con el fin de delimitar las zonas responsables de su generación, este autor realizó decorticaciones totales o parciales, secciones a diferentes niveles del tallo cerebral y lesiones talámicas en gatos. Con la decorticación total o parcial, los animales continúan presentando el sueño REM con una periodicidad normal aunque no está precedido por el SWS (Jouvet, 1962). Con las secciones del tallo cerebral para separar el cerebro del tallo (sección mesodiencefálica), el sueño REM también aparece periódicamente. Por otro lado, la sección ponto-mecencefálica, provoca una disminución en la frecuencia de aparición del sueño REM, sin embargo cuando esta fase se presenta la duración de los episodios tiene una duración normal. En cambio, una sección al nivel de la parte posterior del núcleo reticularis pontis caudalis (RPC) suprime al sueño REM (Jouvet, 1962; Jouvet, 1972).

Estos resultados mostraron que los mecanismos generadores del sueño REM se encuentran en la región pontina del tallo cerebral. Posteriormente, con el fin de delimitar las estructuras de la región pontina involucradas en la generación del sueño REM, Michel Jouvet entre los años 1962 y 1963 llevó a cabo lesiones bilaterales del núcleo RPC y demostró que esta lesión provoca la desaparición total de los fenómenos electroencefalográficos y periféricos característicos del sueño REM (Jouvet, 1962, 1963). Más tarde en 1965 y en 1967 encontró que la lesión bilateral pero solamente de la parte medial del núcleo *reticularis pontis oralis* (RPO) y RPC no provoca ningún efecto sobre la aparición del sueño REM; mientras que la destrucción de la parte mediolateral y caudal o rostral de dichas estructuras suprime al sueño REM (Jouvet,

1965, 1967). Dada la heterogeneidad funcional y anatómica del tegmento pontino, pronto surgió el interés por determinar que zona y que neurotransmisores de éste serían los responsables de la aparición del sueño REM. Jouvét en 1965 con su teoría monoaminérgica propuso a la zona dorsolateral del puente como la región generadora del sueño REM, concretamente a las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (Jouvét, et al., 1965; Jouvét et al., 1965). Por otra parte, se mostró que la acetilcolina está implicada en la generación del sueño REM, desde los trabajos pioneros de Hernández Peón en 1965 con aplicación de cristales de acetilcolina en distintas regiones del encéfalo del gato. Esta hipótesis ha sido apoyada tanto por técnicas de registro unitario (Hobson et al., 1973; Hobson et al., 1974; Hobson et al., 1975), como por lesiones selectivas de la zona dorsolateral del puente (locus coeruleus) (Caballero y de Andres, 1986). Dicha hipótesis también ha sido apoyada con experimentos de microestimulación colinérgica en el tallo cerebral.

Una de las características del sueño REM es la pérdida de la actividad muscular (Jouvét, 1965) particularmente de los músculos antigravitatorios, que se produce por un cese en la descarga de las motoneuronas que inervan a estos músculos. Este fenómeno se debe a una hiperpolarización sostenida de la membrana de las motoneuronas (Morales et al., 1987). De manera intermitentemente pueden ocurrir despolarizaciones provocadas por un aumento de la actividad excitatoria descendente desde sistemas supraespinales, y entonces se producen las típicas sacudidas del sueño REM. La región crítica para la expresión de la atonía muscular durante el sueño REM parece ser la parte dorsolateral del puente, más concretamente los núcleos del

locus coeruleus alpha y del perilocus coeruleus alpha (Jouvet y Delorme 1965; Sakai et al., 1977). La lesión bilateral de estas estructuras en el gato produce la desaparición de la atonía durante el REM, exhibiendo los animales una conducta motora denominada “conducta onírica” del gato, durante estos episodios los animales despliegan conductas de orden instintivo, permaneciendo con los ojos cerrados (Sastre y Jouvet, 1979).

Durante el sueño REM el sistema motor muestra una gran activación, pero su efector final, la motoneurona, esta inhibida. Las neuronas del puente dorsolateral actúan excitando a la formación reticular bulbar magnocelular (Frmc) a través del fascículo tegmental reticular lateral, el cual a su vez inhibe las motoneuronas espinales, a través de sus interneuronas (Sakai et al., 1977). De este modo las neuronas del núcleo locus coeruleus alfa y las del perilocus coeruleus alfa resultan ser neuronas ejecutoras, mientras que las neuronas de la formación reticular bulbar magnocelular son neuronas de relevo para transmitir la señal a la medula espinal. Por otra parte, la atonía es el evento del sueño REM mas fácilmente observable tras la inyección de agonistas colinérgicos como el cloruro de carbamilcolina (Carbacol) en el puente.

Puesto que la liberación de acetilcolina aumenta en la corteza durante el sueño REM, mientras que la de noradrenalina y la de serotonina disminuyen (Hobson, 1990), la desincronización del EEG que caracteriza a este estado como tal, muy probablemente tenga su origen en las estructuras colinérgicas del istmo pontomesencefálico como el núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT) y el núcleo

laterodorsal del tegmento pontino (LDT). Estos núcleos ejercen una acción inhibitoria sobre la actividad sincrónica del tálamo y por lo tanto, tiene lugar la desincronización cortical.

Finalmente, cabe mencionar que la formación reticular pontina medial es la estructura preoculomotora encargada de activar a los núcleos del sexto par craneal, esta activación genera los movimientos oculares conjugados, elemento característico del sueño REM.

#### **5.4. Regulación colinérgica del sueño REM**

La hipótesis de que la acetilcolina juega un papel importante en la instalación del sueño REM fue propuesta por Jouvet en 1962 y por Hernández Peón en 1965. Actualmente la microestimulación colinérgica ha sido usada para activar poblaciones neuronales específicas en el tallo cerebral. Esto ha permitido la inducción de episodios de sueño REM duraderos y con una latencia de aparición acortada, mediante la microinyección de sustancias colinérgicas en una región delimitada en la zona paramedial del tegmento pontino anterodorsal (Vivaldi et al., 1980; Yamamoto et al., 1990a; Yamamoto, et al., 1990b)

Existen núcleos colinérgicos como el núcleo laterodorsal del tegmento pontino (LDT) y el núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT), en los cuales muchas de sus neuronas muestran aumentos de su actividad específicamente durante el sueño REM (Datta et al.,1989; Sakai et al.,1990). Además, las neuronas del LDT y del PPT proyectan fibras a los sitios reticulares pontinos más efectivos para la inducción del

sueño REM por la microinyección de carbacol (Quatrochi et al., 1989). La estimulación eléctrica de los núcleos LDT y PPT producen liberación de acetilcolina en la formación reticular pontina medial. Además, los núcleos LDT y PPT han sido identificados como parte de la red neuronal donde las PGOs son generadas (Sakai et al.,1990; Datta,1994; Saito et al.,1977).

Todo lo anterior muestra que la instalación del sueño REM es un fenómeno complejo en el que interviene principalmente la acetilcolina. Sin embargo, en dicho fenómeno también resultan estar involucrados otros neurotransmisores los cuales han sido menos estudiados. Es importante mencionar que aún queda por determinar la interacción entre dichas sustancias (ACh, GABA, glutamato, serotonina, etc) para lograr un mejor entendimiento de los mecanismos de instalación, así como de los mecanismos encargados del mantenimiento del sueño REM.

Es importante señalar que el sueño REM se caracteriza por fenómenos electrofisiológicos que se clasifican por su ocurrencia temporal en dos tipos: los fenómenos tónicos y los fenómenos fásicos. Los fenómenos tónicos son aquellos que se presentan de manera continua durante esta fase del sueño, tales como la activación EEG rápida, la atonía muscular y la actividad de ritmo theta hipocámpico (actividad observada principalmente en roedores). Se definen como fenómenos fásicos, aquellos que se presentan en episodios que se repiten durante el sueño REM y ejemplo de estos son: los movimientos oculares rápidos (del inglés Rapid Eye Movements; REMs), los potenciales PGO y las sacudidas musculares breves (mioclonias).

### **5.5. Mecanismos corticales de desincronización EEG**

La actividad eléctrica rápida de entre 20-30 Hz y de bajo voltaje se presenta en regiones diencefálicas, mesencefálicas y corticales. Esta actividad es semejante a la activación cortical que ocurre durante el estado de hiper-alerta o de atención. Se ha propuesto que la activación cortical durante el sueño REM, se inicia en el núcleo RPC e involucra al núcleo RPO, ya que la lesión de esta región suprime dicha activación durante la vigilia y durante el sueño REM (Jouvet, 1962). Existen vías ascendentes responsables de la desincronización EEG del sueño REM, que cruzan difusamente por el tegmento mesencefálico a través de los núcleos RPC y RPO, que hacen relevo en los sistemas de proyección tálamo-corticales e hipotálamo-corticales para provocar la desincronización EEG (Sakai, 1985).

### **5.6. Atonía muscular**

Jouvet y Delorme demostraron que al lesionar la región caudal del LC y el tegmento pontino en el gato, desaparece la atonía muscular durante el sueño MOR (Jouvet y Delorme 1965). En estudios mas recientes, se ha logrado delimitar con mayor precisión dos regiones del LC responsables de la atonía muscular: el peri-LC-alpha y la parte medial del LC-alpha en la región pontina, además se ha demostrado que también el núcleo reticular magnocelular (NRM) de la región bulbar del tallo cerebral está involucrado en este fenómeno (Sakai, 1985; Sakai et al.,1986). Las neuronas pontinas son las generadoras de la atonía y las bulbares son neuronas de relevo. Ambas regiones, están comunicadas anatómicamente a través del tracto

lateral del tegmento reticular. A su vez, a través del tracto ventrolateral reticuloespinal las neuronas pontinas y bulbares activan a las interneuronas del asta ventral de la médula espinal, las que inhiben a las motoneuronas para provocar la atonía muscular de los músculos antigravitatorios. Ambos grupos neuronales involucran mecanismos colinérgicos o colinoceptivos, en este fenómeno.

### **5.7. Movimientos oculares rápidos (REMs)**

Los REMs aparecen desde el inicio del sueño REM de manera aislada o en salvas de hasta 50 movimientos, con una frecuencia de 60-70 movimientos por minuto. Es importante señalar que son diferentes a los que ocurren durante la vigilia, ya que los mecanismos que los generan, su distribución temporal y patrón de ocurrencia son diferentes (Mouret et. al., 1963). Los REMs que ocurren durante el sueño MOR, son originados a nivel pontino y regulados de una manera compleja a nivel mesencefálico y del colículo superior (Valatx et al., 1964; Jeannerod, 1965; Perenin et al., 1971), regiones donde los procesos de integración cortical ejercen su efecto. En estudios posteriores se han logrado identificar diferentes grupos neuronales de la región pontina, que son los responsables de la generación de los potenciales PGO.

Estos potenciales se propagan a los núcleos del VI, IV y III pares craneales, que forman el sistema oculomotor, para provocar los REMs del sueño REM (Cespuglio y Laurente, 1975; Cespuglio et al., 1977).



## **6. POTENCIALES PONTO-GENICULO-OCCIPITALES (PGO)**

Estos potenciales bioeléctricos monofásicos, que aparecen de manera fásica durante el sueño REM con una amplitud de 300  $\mu\text{V}$  y una duración de 150 milisegundos, fueron registrados por primera vez en la región pontina del tallo cerebral (Jouvet y Michel, 1959). Posteriormente, también fueron registrados en el cuerpo geniculado lateral (LGB, del inglés Lateral Geniculate Body) (Mikiten et. al., 1961) y en la corteza occipital (Mouret et. al., 1963). Debido a las regiones cerebrales donde fueron registrados inicialmente, se les denominó como, potenciales Ponto-Geniculo-Occipitales (PGO) (Jeannerod, 1965).

En estudios posteriores se demostró que los potenciales PGO no aparecen de manera aleatoria en la región pontina, el LGB y la corteza occipital, sino que se generan en la región pontina y se propagan hacia el LGB y después hacia la corteza occipital (Bizzi y Brooks, 1963; Brooks y Bizzi 1963). Es importante destacar este hallazgo, pues dio origen a la investigación sobre la localización de las redes neuronales responsables de generar a los potenciales PGO, que a su vez, son fenómenos electrofisiológicos que forman parte de los mecanismos de instalación y mantenimiento del sueño REM. Además, este hallazgo permitió identificar a dichas redes neuronales, como parte de los núcleos pontinos donde se integran diversas funciones autonómicas. Esta localización le confiere a los mecanismos generadores de los potenciales PGO, un carácter fisiológico de orden vital. Por otra parte, este hallazgo dio origen a numerosas investigaciones sobre la propagación de los potenciales PGO hacia diferentes regiones cerebrales.

Los potenciales PGO siempre preceden por 20 a 30 segundos la instalación del sueño REM, cuando todavía hay una actividad lenta electroencefalográfica. A estos periodos de transición del sueño de ondas lentas al sueño REM, se les denomina sueño fásico en ondas lentas (SFOL) (Thomas y Benoit, 1967).

Para fines de este trabajo, de aquí en adelante nos referiremos a estos periodos como: *sueño sincronizado con potenciales PGO* (SP). En estos periodos, los potenciales PGO comúnmente ocurren de manera aislada, denominándoseles potenciales simples y en ocasiones ocurren como potenciales dobles. Cuando comienzan a ocurrir con unas frecuencias mayores y organizadas en salvas de tres o más potenciales, tiene lugar la instalación del sueño REM. Este fenómeno ha permitido considerar a los mecanismos generadores de los potenciales PGO, como el componente central de los mecanismos de instalación y mantenimiento del sueño REM.

Con el análisis de las características intrínsecas de los potenciales PGO, en el gato se ha encontrado que son una constante biológica ya que su número de  $13,000 \pm 1,500$  potenciales es igual cada 24 horas. Además, estos potenciales son regulados a largo plazo, ya que la privación de sueño REM, que implica la privación de potenciales PGO es seguida del aumento de estos potenciales, recuperándose hasta el 95% de ellos en los siguientes dos días. En condiciones normales, durante el sueño REM, ocurren como potenciales simples o dobles, organizados en salvas de tres, cuatro cinco, seis y hasta de 50 potenciales. Su amplitud puede variar entre 300 y 400  $\mu\text{V}$  cuando son simples y cuando aparecen en salvas su amplitud varía entre 150 y 250  $\mu\text{V}$

(Mouret et al., 1968; Jouvet, 1972). Los potenciales PGO fueron descubiertos en el gato y más tarde, se demostró que también pueden ser registrados en la rata (Cespuglio et al., 1977) y en diferentes especies de monos (Balzamo, 1980). En el humano, se ha logrado registrar potenciales electroencefalográficos equivalentes a los potenciales PGO (Miyachi et al., 1987) y recientemente, las imágenes cerebrales obtenidas mediante tomografía por emisión de positrones, muestran el aumento de la actividad metabólica del LGB y de la corteza occipital durante el sueño REM (Peigneux et al., 2001).

### **6.1. Generación pontina de los potenciales PGO**

A partir de lesiones electrolíticas, transecciones y estimulaciones eléctricas de diferentes áreas del tallo cerebral, se ha mostrado que el tegmento pontino es el sitio donde se generan los potenciales PGO. Las neuronas responsables de la generación de los potenciales PGO están distribuidas en diferentes núcleos del tegmento caudal mesencefálico y del tegmento rostral pontino. El área “x”, la parte rostral del núcleo parabraquial lateral, el núcleo tegmental laterodorsal y la parte rostral del núcleo locus coeruleus alpha.

En estudios sobre la actividad unitaria neuronal, se ha mostrado que las neuronas tegmentales están involucradas en la generación de los potenciales PGO, pues solamente se activan en forma de salvas (3 a 5 potenciales) con una frecuencia de entre 600 y 800 Hz, precediendo (5 a 25 mseg) a cada potencial PGO registrado en el LGB. Estas neuronas reciben el nombre de neuronas “PGO-on.” Este tipo de

neuronas se localizan en el área “x”, en el LDT, en la parte rostral del LC alfa y en la región parabraquial (PBL). Además, la estimulación eléctrica del LGB y la del núcleo centralis lateralis del tálamo producen una excitación antidrómica de estas neuronas PGO-on. La estimulación eléctrica de estructuras tegmentales dorsales que contienen células PGO-on, provoca la aparición de potenciales PGO en el LGB y en la corteza cerebral, mientras que la destrucción de estos elementos produce la abolición de los potenciales PGO tálamo-corticales (Sakai y Jouvet, 1980; Sakai, 1985).

En otra serie de estudios neurofisiológicos sobre la actividad neuronal de la región PBL, se ha mostrado que esta región contiene neuronas que están activas durante la vigilia, que disminuyen su frecuencia de descarga durante el SWS, llegando a su frecuencia más baja durante el sueño REM, pero que además descargan en salvas de 600 a 800 Hz, de 10 a 15 milisegundos antes de cada potencial PGO del LGB (Datta y Hobson, 1994; Datta, 1995).

También se ha mostrado que la lesión unilateral de la región PBL, mediante la aplicación tópica de ácido kaínico, provoca la disminución significativa del número de potenciales PGO, particularmente en el LGB ipsilateral a la lesión, donde disminuyen hasta en un 85%. En este estudio, también se encontró que la disminución de los potenciales PGO, no altera la tasa diaria de las diferentes fases del ciclo sueño-vigilia. (Datta y Hobson, 1995). Por lo tanto, los resultados de esta serie de estudios hacen evidente que la región PBL juega un papel exclusivo e importante, dentro de los mecanismos de generación de los potenciales PGO.

En la generación de los potenciales PGO, también participan algunos

neurotransmisores que actuando sobre las regiones pontinas mencionadas, pueden inhibir o facilitar la ocurrencia de estos potenciales. A partir de estudios neurofisiológicos y farmacológicos, se ha concluido que las monoaminas cerebrales inhiben la aparición de los potenciales PGO. La administración de reserpina, fármaco que disminuye tanto los niveles cerebrales de serotonina (5-HT) y norepinefrina (NE), induce la instalación y ocurrencia de potenciales PGO independientes de los estados del sueño, durante 24 horas (Matsumoto y Jouvet, 1964; Delorme et al., 1965; Brooks y Gershon, 1971; Brooks y Gershon, 1972). Este fenómeno también se ha mostrado con la depleción selectiva de serotonina, mediante la aplicación de para-clorofenilalanina (PCPA) (Delorme et al., 1966; Ruch-Monachon et al., 1976). Por otra parte, la administración tópica de 6-hidroxi-dopamina (agonista monoaminérgico) (Matsumoto y Jouvet, 1964; Buguet et al., 1970) o de serotonina en el tegmento pontino (Horner et al., 1997), provoca la inhibición de los potenciales PGO. Asimismo, la administración sistémica de eltoprozina (Luebke et al., 1992) un agonista serotoninérgico, disminuye significativamente el número de potenciales PGO (Quattrochi et al., 1992; Quattrochi et al., 1993). Además, en estudios *in vitro* con rebanadas del tallo cerebral, se ha mostrado que la perfusión de serotonina en el núcleo LDT, provoca la hiperpolarización de las neuronas PGO-on (Luebke et al., 1992). En otra serie de estudios experimentales se ha mostrado que el neurotransmisor, que por excelencia participa en la generación de los potenciales PGO, es la acetilcolina. Las neuronas colinérgicas ubicadas en el tegmento pontino, en los núcleos LDT, PPT y en el núcleo lateral marginal de la región PBL, juegan un

papel determinante en la producción de PGOs (Henriksen et al., 1972; Jouvet, 1972; Shouse y Siegel, 1992; Steriade, 1992). El papel de la acetilcolina en la generación de los potenciales PGO, también ha sido demostrado por la administración tópica de agonistas colinérgicos. La microinyección de carbacol en el área peribraquial caudo-lateral (C-PBL), induce la instalación de potenciales PGO independientes de los estados del sueño durante 8 a 10 horas. Además, se incrementa el número de estos potenciales durante los episodios de SP y de sueño REM en un periodo de hasta seis días posteriores a la microinyección (Datta et al., 1991; Datta et al., 1992). Por otra parte, se ha logrado determinar que los receptores muscarínicos del tipo M2, son los que están involucrados en este fenómeno (Datta et al., 1993).

## **6.2. Propagación de los potenciales PGO**

La propagación de los potenciales PGO hacia diversas regiones cerebrales y medulares, indica que estos potenciales provocan la activación fásica o intermitente, de circuitos y sistemas cerebrales encargados de funciones sensoriales, motoras, autonómicas y cognitivas (Jouvet, 1972; Callaway et al., 1987). Es de interés mencionar, que la activación de estos sistemas por los potenciales PGO durante el sueño REM, en ocasiones es de mayor intensidad que la provocada por los estímulos ambientales durante el estado de vigilia. Estos fenómenos han sido motivo de numerosas investigaciones, estos trabajos han tratado de analizar cuáles son las regiones cerebrales activadas por los potenciales PGO, cual es el resultado de esta activación y que función tiene la activación fásica del cerebro durante el sueño REM.

El descubrimiento inicial de la propagación de potenciales PGO hacia el LGB y la corteza occipital (Bizzi y Brooks, 1963; Brooks y Bizzi, 1963), dio origen a estudios neurofisiológicos donde se logró delimitar las vías anatómicas y el modo de propagación de estos potenciales. Los potenciales PGO se propagan desde su origen pontino hacia el LGB, a través del fascículo longitudinal medio del cerebro anterior. Su propagación es predominantemente hacia el LGB ipsilateral y cuando se presentan en salvas de dos o más potenciales, también se propagan hacia el LGB contralateral, a través de las fibras de la comisura anterior (Laurent et al., 1974a).

Por otra parte, la activación fásica del sistema visual por los potenciales PGO, inició la búsqueda de la probable función de este fenómeno. El análisis de la actividad neuronal del LGB durante la estimulación luminosa o eléctrica del quiasma óptico, mostró que los potenciales PGO bloquean el paso de la información aferente hacia la corteza visual. Este fenómeno a su vez implica la elevación del umbral al despertar, por impedir el paso de estímulos sensoriales aferentes. Por lo tanto, se ha propuesto que una función de los potenciales PGO es la de preservar el curso del sueño REM (Laurent et al., 1974b; Laurent et al., 1977).

En otros estudios con gatos recién nacidos, se encontró que el bloqueo de la propagación de los potenciales PGO durante el crecimiento, deteriora el desarrollo anatómico y funcional del LGB. Cuando estos animales llegan a la edad adulta, las neuronas de sus LGBs no están organizadas en capas bien diferenciadas, su número y tamaño es menor que en los gatos control y además estas neuronas responden con una latencia mayor y frecuencia menor ante estímulos luminosos o eléctricos en el

quiasma óptico (Davenne y Adrien, 1984; Davenne y Adrien, 1987; Davenne et al., 1989). Estos hallazgos apoyan sólidamente la hipótesis de que la activación fásica cerebral, debida a la propagación de los potenciales PGO, tiene una función importante en el desarrollo del sistema nervioso.

Otros investigadores han hecho evidente que además de propagarse al sistema visual, los potenciales PGO se propagan hacia diversos sistemas y regiones cerebrales. Estos potenciales también han sido registrados en el núcleo coclear y la corteza auditiva (Roffwarg et al., 1979). Es importante mencionar que en las regiones cerebrales donde no se registran potenciales de campo semejantes a los PGO, el registro unitario de la actividad neuronal, muestra que el 75% de las neuronas corticales presentan cambios en su frecuencia de descarga, que están directamente relacionados con la ocurrencia de los potenciales PGO (Callaway et al., 1987).

Por otro lado, la evidente relación entre la ocurrencia de los movimientos oculares rápidos del sueño REM y los potenciales PGO, propició el estudio de las relaciones fisiológicas entre estos potenciales y el sistema oculomotor. Actualmente está demostrado que los potenciales PGO se propagan hacia los núcleos del VI, IV y III pares craneales, que dan origen a las fibras que inervan a los músculos intrínsecos de los globos oculares. Cada potencial PGO que se propaga a estos núcleos, provoca la contracción contralateral y la inhibición ipsilateral de los músculos intrínsecos del ojo, dando como resultado movimientos conjugados de los ojos durante el sueño REM (Cespuglio et al., 1975; Cespuglio et al., 1976).



Otro aspecto importante de los potenciales PGO, es su propagación hacia las astas ventrales de la médula espinal, para inducir y mantener la atonía muscular del sueño REM. En estudios electrofisiológicos sobre la actividad de las motoneuronas, se ha encontrado que éstas presentan potenciales postsinápticos inhibitorios, que coinciden con la ocurrencia de los potenciales PGO durante el sueño REM. También se ha demostrado que los potenciales postsinápticos inhibitorios, comienzan a presentarse desde los episodios de SP, estados transicionales entre el SWS y el sueño REM, coincidiendo con los potenciales PGO que preceden a la instalación de esta fase del sueño (Chase y Morales, 1990; López-Rodríguez et al., 1992; Morales et al., 1987).

Además de los movimientos oculares, fenómenos visuales y auditivos, que suceden fasicamente durante el sueño MOR, las funciones autonómicas también tienen variaciones fasicas (Baust et al., 1972; Orem, 1998; Orem, 1980; Dunin-Barkowski y Orem, 1998; Taylor et al., 1985).

Asimismo, en cada episodio de sueño REM se presentan diferentes tipos de emoción, reminiscencias personales variadas y fenómenos mentales “alucinatorios” incoherentes e incongruentes (Hobson y Pace-Schott, 2002).

En el sistema límbico se integran funciones relacionadas con las emociones y los cambios vegetativos asociados a éstas, con los procesos de la memoria y en condiciones patológicas, genera fenómenos alucinatorios. Estas propiedades del sistema límbico dieron origen al análisis de su actividad electrofisiológica durante el sueño REM y su relación con la ocurrencia de los potenciales PGO. Los resultados de este análisis muestran que los potenciales PGO también se propagan hacia la

amígdala del lóbulo temporal, el hipocampo dorsal y las regiones anterior y posterior del cíngulo. En estas estructuras se registran potenciales de campo, bifásicos y lentos (250 a 300 mseg), con latencias mayores a los potenciales PGO del LGB que son de 25 mseg más en el hipocampo, de 30 mseg más en el cíngulo y de 40 mseg más en la amígdala (Calvo y Fernández-Guardiola, 1984). El análisis de la actividad neuronal unitaria de los núcleos central, basal y basolateral de la amígdala, mostró que las neuronas amigdalinas alcanzan su máxima frecuencia cuando ocurren los potenciales PGO en el sueño REM, siendo el núcleo central el más representativo de este fenómeno (Calvo y Simón-Arceo, 1999).

### **6.3. Regulación y control de los potenciales PGO**

El número y patrón de ocurrencia de los potenciales PGO son constantes biológicas reguladas por los núcleos pontinos que los generan y a su vez otras regiones cerebrales pueden ejercer un control sobre ellas. Se ha mostrado que la estimulación eléctrica de los núcleos del rafe, del cerebelo y de la corteza frontal durante el sueño REM, disminuye el número de los potenciales PGO (Simon et al., 1973) y la lesión o ablación de estas estructuras, facilita la ocurrencia de los potenciales PGO (Gade-Ciria, 1972; Gadea-Ciria y Fuentes, 1976; Gadea-Ciria, 1976).

Dentro de los sistemas sensoriales, se ha demostrado que la vía visual y la auditiva, tienen un efecto facilitatorio sobre los potenciales PGO. La estimulación eléctrica del LGB aumenta el número de potenciales PGO (Nelson et al., 1983). La

estimulación auditiva durante el sueño REM también incrementa el número de potenciales PGO (Drucker-Colin et al., 1983; Roffwarg et al., 1979; Sanford et al., 1992).

En relación con el sistema límbico, existen evidencias de que la amígdala del lóbulo temporal, juega un papel facilitatorio en la generación de los potenciales PGO. La estimulación eléctrica de la amígdala durante el sueño REM provoca un aumento significativo en el número de potenciales PGO, también provoca un aumento significativo en su amplitud y además provoca un aumento significativo en el número de salvas de estos potenciales (Calvo et al., 1987). El control facilitatorio de la amígdala sobre los potenciales PGO también se ha hecho evidente mediante la aplicación tópica de agentes colinomiméticos y del péptido vasoactivo intestinal (VIP) en la amígdala. La microinyección de estas sustancias particularmente en el núcleo central amigdalino, induce el incremento significativo del número total de PGOs, del número de salvas y de la amplitud de los potenciales PGO (Calvo et al., 1996; Calvo y Simón-Arceo, 1999; Simón-Arceo et al., 2003).

Los resultados obtenidos de los estudios mencionados, indican que los potenciales PGO son una constante biológica regulada a largo plazo, y que son generados por regiones pontinas donde se integran funciones vegetativas de orden vital. Por otro lado, existe un consenso general de que los mecanismos generadores de los potenciales PGO, son el componente central de los mecanismos de instalación y mantenimiento del sueño REM. Su ocurrencia precediendo a cada episodio de sueño REM y el hecho de que elevan el umbral al despertar, por impedir el paso de estímulos

sensoriales, apoyan esta idea.

Un aspecto que indica la importancia de los potenciales PGO, es el de activar de manera fásica a prácticamente todas las regiones cerebrales durante el sueño REM, el cual a su vez es un estado fisiológico de activación cerebral en ausencia de estímulos del medio ambiente. Al sueño REM se le han propuesto diversas funciones, que no son excluyentes entre sí, entre ellas está la función de participar en la consolidación de la memoria y la de preservar las funciones genéticamente determinadas, en la eliminación de radicales libres, en el restablecimiento de las membranas neuronales y en el establecimiento de nuevos contactos dendríticos. Para ello, las neuronas necesitan ser activadas, es probable que la activación fásica cerebral provocada por los potenciales PGO cumpla con tal propósito. El hecho de que durante el sueño REM haya un aumento de la síntesis proteínica apoya estas funciones.

## **7. Región peribraquial caudo-lateral (C-PBL)**

El núcleo parabraquial (PBN) está constituido por un grupo de neuronas que rodean al pedúnculo cerebelar superior en la porción dorso lateral de la región pontina. El PBN está involucrado en funciones sensoriales, viscerales, conductuales y neuroendocrinas, como el gusto (Norgren, 1976), la respiración (Bertrand y Hugelin, 1971), el control cardiovascular (Mraovitch et al., 1982), la secreción de adrenocorticotrofina (ACTH) (Ward et al., 1976) y en la regulación del sueño (Saito et al., 1977). Por otra parte, se ha demostrado la participación del sistema colinérgico del tallo cerebral en la generación del sueño REM y en la génesis de los potenciales PGO.

Existen grupos de neuronas que también rodean al pedúnculo cerebelar superior, al nivel de la formación reticular pontomesencefálica, denominada región parabraquial (PBL), esta región juega un papel predominante en la generación de los potenciales PGO. Esta región se extiende desde el borde caudal del núcleo rojo, hasta el polo rostral del PBN. Los núcleos mayores de la región PBL son: el núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPT), el núcleo tegmental laterodorsal (LDT) y el núcleo cuneiforme (NCF) (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984). La región parabraquial en el gato incluye tanto núcleos colinérgicos como núcleos no colinérgicos y estos se localizan entre el nivel estereotáxico anterior 1 y posterior 5.

La parte rostral de la región peribraquial (R-PBL) es más medial y ventral si se compara con la región peribraquial caudo-lateral (C-PBL) (Datta y Hobson, 1994). Con base en la localización, densidad y respuestas fisiológicas de estas células colinérgicas, la región PBL puede ser dividida en R-PBL y C-PBL. El C-PBL se extiende

desde el plano estereotáxico posterior 2 hasta el 5 y el área comprendida entre los planos posteriores 3.5 y 4.5 es donde se generan los potenciales PGO (Datta et al., 1992).

Desde el estudio realizado por Saito en 1977, en el cual registró las neuronas de la región parabraquial del gato, se mostró la participación de esta región sobre la actividad PGO (Saito et al., 1977). En estos registros él observó que las neuronas disparaban en salvas de 3 a 5 potenciales de acción que duran aproximadamente 20 mseg y aparecen de 5 a 25 mseg antes de los potenciales PGO registrados en el LGB. Estos resultados muestran que la región PBL juega un papel central en la generación de los potenciales PGO. En otros estudios, Sakai y Jouvét en 1980 también encontraron otros grupos neuronales pontinos que pueden ser excitados antidrómicamente por la estimulación del LGB (Sakai y Jouvét 1980), estas neuronas también muestran salvas de disparo que preceden a los potenciales PGO registrados en el LGB. Estas neuronas se localizaron principalmente en el tegmento pontino dorso lateral, en el locus coeruleus rostral y en una área denominada el área "x". Esta área "x" contiene células medianas y grandes localizadas dorsolateralmente al borde lateral del brachium conjunctivum (BC) y se extienden desde el extremo caudal del núcleo oculomotor hasta el polo rostral del núcleo PBL (Koyama y Sakai, 2000).

En estudios neuroanatómicos donde se utilizaron marcadores de transporte retrogrado y anterógrado, se mostró que el PBL está conectado con otras estructuras pontinas relacionadas con la generación de los potenciales PGO y con la generación del sueño REM. Los axones de las neuronas del PBL terminan en el campo tegmental

giganto celular (FTG), en el rafe y en el locus coeruleus. La región PBL también recibe proyecciones desde el rafe y desde el LC. Asimismo, tiene conexiones recíprocas con el núcleo central amigdalino, a través del haz amigdalofugal ventral.

## 8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque a partir de numerosos estudios experimentales se ha demostrado que el sueño REM se integra en diferentes regiones del tallo cerebral y prosencefálicas, aún no es del todo claro cómo es que actúan los diferentes neurotransmisores y factores neurohumorales en dichas estructuras. Para avanzar en el conocimiento de la regulación del sueño REM, es necesario considerar que éste es un estado fisiológico complejo, generado por diversos procesos electrofisiológicos y neuroquímicos. Actualmente en el gato, aún queda por conocer la participación e influencia del ácido gamma-aminobutírico (GABA) y del glutamato en regiones pontinas sobre los mecanismos de generación de sueño REM y sobre los potenciales PGO. Nosotros proponemos que durante el sueño lento, el GABA puede estar inhibiendo las regiones colinérgicas del tallo cerebral y por el contrario durante el sueño REM el glutamato puede estar promoviendo la activación de estas mismas estructuras. En un estudio previo realizado por Datta y colaboradores sobre los mecanismos generadores de los potenciales PGO, se demostró que la aplicación tópica de carbacol (agonista muscarínico no selectivo, Sigma) en la región C-PBL del tegmento pontino, provocó la aparición ininterrumpida de potenciales PGO, independientes de los episodios de SP y de sueño REM, durante 4 a 6 horas y que este fenómeno va seguido de la instalación de un número elevado de episodios de sueño REM (Datta et al., 1992). Este efecto será comparado con los efectos de microinyecciones de muscimol (agonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, Sigma) y por otra parte, con las microinyecciones del aminoácido excitatorio L-Glutamato (agonista de todos los tipos de receptores a glutamato; ácido



L-glutámico, Sigma). Durante el desarrollo de este protocolo experimental, se estimulara químicamente la región C-PBL y se obtendrán registros de 23 horas. A la fecha, se desconocen los efectos del GABA y del glutamato sobre la actividad PGO y el sueño REM.

## **9. HIPÓTESIS**

*La administración de agonistas GABAérgicos disminuirá la ocurrencia del sueño REM y la aparición de potenciales PGO, por el contrario los agonistas glutamatérgicos y colinérgicos promoverán la aparición de ambos fenómenos.*

### **9.1. OBJETIVO GENERAL**

Conocer, describir y analizar los efectos de la administración local de agonistas GABAérgicos, glutamatérgicos y colinérgicos en la región C-PBL sobre la regulación del sueño REM y la actividad PGO.

### **9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Realizar microinyecciones de agonistas colinérgicos, GABAérgicos y glutamatérgicos en la región C-PBL para determinar sus efectos sobre la arquitectura del sueño en el gato.
- b) Determinar la latencia de aparición al primer episodio de sueño REM y de los potenciales PGO a partir del momento de la microinyección de las sustancias.

- c) Determinar la arquitectura y la organización temporal del sueño, a partir de registros poligráficos de 23 horas, llevados a cabo en condiciones control (salina) y después de la administración de las sustancias (administración bilateral).
- d) Analizar el número, duración promedio y porcentaje total de cada fase del sueño y de la vigilia (W). También se analizará, la latencia para cada una de las fases del sueño lento (SWS1, SWS2, SP).
- e) Determinar el efecto de las tres sustancias sobre la frecuencia y patrón de ocurrencia de los potenciales PGO.

## **10. MATERIAL Y MÉTODO**

### **10.1. Sujetos experimentales**

Se utilizaron 14 gatos adultos machos (*Felix domésticus*), con un peso de entre 3 y 3.8 Kgs. en preparación crónica, con electrodos para el registro del sueño y con cánulas para la administración de sustancias. Los gatos fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Los gatos utilizados se encontraron en perfectas condiciones de salud al momento de la operación y durante toda la fase experimental, en el bioterio se encargaron de desparasitar y de vacunar a los animales, tratando así de evitar la presencia de cualquier variable extraña, como temperatura o infecciones que pudieran modificar la arquitectura del sueño, de manera que estas variables nunca afectaron nuestros resultados. Se cumplió con todos y cada uno de los criterios internacionales para el

uso de animales de experimentación. Todos los experimentos, se realizaron siguiendo los lineamientos técnicos y éticos para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio emitidos por SAGARPA (NOM-062-ZOO-1999, México) y fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” Proyecto NC123340.0.

## **10.2. Material**

3 cámaras sonoamortiguadas para registro polisomnográfico de gato  
Mesa para intervenciones quirúrgicas de animales experimentales  
Aparato estereotáxico para gato

### **Material quirúrgico**

Acrílico dental  
Cera para hueso  
Hilo para suturar 000  
Alambre de acero inoxidable (0.05 mm de diámetro, aislado con barniz)  
Electrodos epidurales de acero inoxidable en forma de clavo  
Cánulas calibre 32, 26, y 24  
Micro jeringa Hamilton (1ml, 10ml)  
Bomba de perfusión

### **Sustancias**

Antibióticos (Benzetazil 1 000 000, terramicina, Amoxivet)  
Antisépticos (agua oxigenada, alcohol, isodine, benzal)  
Carbacol (Sigma), 8µg/0.5µl de solución salina  
Muscimol (Sigma) 100µM/0.5µl de solución salina  
Ácido L-glutámico (Sigma) 30ng/0.5µl de solución salina  
Solución salina  
Rompun (0.5ml/dosis única)  
Propofol (administrado vía intavenosa durante toda la operación)  
Formaldehído al 37%

### **Aparatos**

3 polígrafos Grass modelo 78-D (8 canales)  
2 osciloscopios Tektronix Modelo TDS-210  
3 computadoras para procesamiento estadístico de los datos experimentales  
Cámara de video  
Criostato

### 10.3. Procedimiento quirúrgico

Las intervenciones quirúrgicas para la implantación crónica y estereotáxica (Snider y Niemer, 1961) de los electrodos y cánulas se realizaron bajo anestesia general con Propofol (200 mg/150 ml), precedido de un relajante muscular Rompun (0.5 ml administrado de manera intramuscular), para el fácil manejo del animal. Los animales fueron canalizados para administrarles suero durante la cirugía y para administrar el anestésico de manera simultánea.

Una vez expuesto el cráneo, el techo del seno frontal se abrió parcialmente y se colocaron los electrodos para el registro del electrooculograma (EOG) en los límites anterior y posterior de la órbita ocular. Se practicaron unas aberturas de 5 x 7 mm aproximadamente en el hueso del cráneo, las cuales permitieron la penetración de microelectrodos en diferentes planos horizontales y verticales. Se colocaron bilateralmente cánulas guía (calibre 24) en ambas regiones C-PBL (Angulo = 38°, Posterior = 4.0, Lateral = 4.5; Vertical = -2.5) para la microinyección de carbacol (8 µg/0.5 µl), muscimol (100 µM / 0.5 µl) y L-glutamato (30 ng/ 0.5 µl). Las cánulas se colocaron 3 mm arriba de la región C-PBL, con el fin de evitar daño tisular previo y realizar las microinyecciones en un sitio libre de lesión. En estas cánulas se colocó un mandril (calibre 36) de acero inoxidable para evitar que las cánulas se taparan, este mandril solo fue retirado al momento de hacer las microinyecciones e inmediatamente después se introdujo de nuevo.

Para la microinyección de los fármacos, se utilizó un inyector (cánula calibre 36) 3 mm más largo que las cánulas. Los electrodos para el registro del

electroencefalograma (EEG) se colocaron de manera superficial sobre la corteza sensoriomotora (sobre el hueso y para registrar predominantemente los husos del sueño) y sobre la corteza visual en donde hemos registrado la propagación de los potenciales PGO.

Para el registro de los potenciales PGO se colocaron estereotaxicamente electrodos constituidos por 5 alambres de acero inoxidable (de 0.25 mm de grueso y con 0.5 mm de separación vertical entre las puntas) en ambos cuerpos geniculados laterales (Anterior = 6.5, Lateral = 9.5, Vertical = +3.0).

También se colocaron bilateralmente electrodos monopolares en los músculos dorso cervicales de la nuca (cuello) para el registro del electromiograma (EMG) y un electrodo más sobre el seno frontal que fue utilizado como electrodo tierra. Los alambres provenientes de todos los electrodos fueron soldados a un conector de 25 puntas, finalmente los electrodos y cánulas fueron fijados al cráneo con acrílico dental. Todo este arreglo permitió hacer la valoración y análisis del ciclo sueño-vigilia durante y después de la realización de los registros polisomnográficos. En el cemento acrílico también se incluyeron 2 bujes de 3 mm de diámetro, que sirvieron para sujetar la cabeza del animal en ausencia de dolor al aparato estereotáxico, para llevar a cabo las microinyecciones.

Al finalizar las intervenciones quirúrgicas, se aplicaron antibióticos tópicamente en los bordes de las heridas (terramicina) y por vía intramuscular (Benzetazil 1 000 000 UI) una sola vez para evitar posibles infecciones. Además se le administro al animal suero (solución salina 9%), los 3 o 4 días posteriores para facilitar su recuperación.

### **Periodos de recuperación y habituación a las situaciones experimentales.**

Inmediatamente después de las intervenciones quirúrgicas los animales fueron sometidos a un periodo de recuperación de 8 a 10 días. Durante este periodo los gatos permanecieron en la cámara de registro (sonoamortiguada) con libre acceso de agua y alimento; bajo un ciclo de luz-oscuridad constante (12:12 hrs) a temperatura ambiente. Su periodo de luz fue de 8 am a 8 pm, siendo el de oscuridad de 8 pm a 8 am, aproximadamente. Los gatos fueron alimentados y “aseados” entre las 8 y 9 de la mañana. Antes de comenzar las series experimentales y los registros control, los animales fueron habituados a los cables y a las condiciones de registro, los animales fueron conectados durante las 24 horas del día en ausencia de registro durante una semana.

#### **10.4. Registros polisomnográficos.**

Los animales fueron registrados y mantenidos en cajas sonoamortiguadas para registro poligráfico de sueño (2.5 m x 90 cm). Ya habituados los gatos comenzaron los registros control (microinyección de 0.25 µl de solución salina en la región C-PBL) y después las series experimentales, los animales fueron registrados siempre durante 23 horas, de nueve de la mañana a ocho de la mañana del día siguiente dejando una hora para limpiar las cajas y alimentar a los animales.

Estos registros fueron valorados y calificados visualmente, se registraron dos cortezas, dos cuerpos geniculados laterales, el EOG y el EMG. Estos registros fueron analizados tomando en cuenta la duración promedio, el porcentaje, la latencia y el

número total de todas y cada una las fases del ciclo sueño-vigilia. Los valores obtenidos en cada una de las situaciones experimentales fueron los que se compararon con los valores de los registros control.

### **PROCEDIMIENTO**

- Todos los gatos fueron registrados durante 23 horas (un registro de línea base y un registro por cada dosis).
- 14 gatos fueron preparados para las microinyecciones de la región C-PBL.
- Durante la primera semana post línea base (registro control), todos los animales recibieron una dosis bilateral de carbacol (un registro de 23 horas).
- Tras la estimulación colinérgica y de manera aleatoria se administró muscimol o L-glutamato y se realizó un registro de 23 horas.
- Cada fármaco fue administrado con un intervalo de una semana. De esta manera, cada animal recibió cada uno de los fármacos con una semana de separación.

#### **10.5. Administración de sustancias**

Las microinyecciones de carbacol, de muscimol y de L-glutamato se realizaron una vez a la semana, siempre a la misma hora (nueve de la mañana). El procedimiento de las microinyecciones fue el siguiente: todas las sustancias fueron pesadas y diluidas el mismo día de la microinyección, para obtener las concentraciones y volúmenes deseados. Los inyectores contruidos con una cánula (calibre 36) fueron

conectados a un catéter (calibre 34) y este a la vez se conectó a una jeringa Hamilton de 1 µl, se comprobó el flujo de la sustancia a través del sistema de inyección. Las microinyecciones fueron siempre de manera bilateral en la región C-PBL. Para administrar las sustancias, se retiró el “mandril” e inmediatamente después el inyector fue insertado en la cánula guía. El tiempo de administración de las sustancias fue de 2 minutos y siempre se utilizó una bomba de perfusión continua. Al término de la administración de la sustancia, el inyector se mantuvo en el sitio de inyección dos minutos más. Después, se retiró el inyector y se verificó el flujo de la sustancia, inmediatamente después se inserto nuevamente el “mandril”. Este procedimiento tomó entre 6 y 8 minutos.

La dosis de carbacol utilizada (4.0 µg/0.25 µl) fue elegida a partir de resultados obtenidos en estudios previos (Baghdoyan et al., 1989). Un sitio efectivo de estimulación colinérgica en cada gato, fue definido como aquel que produjo actividad PGO con una latencia menor a cuatro minutos. La dosis de muscimol fue de 100 µM/0.25 µl, esta dosis fue seleccionada a partir de reportes previos (Xi et al., 2004). Finalmente, de acuerdo a trabajos de Datta y colaboradores fueron inyectados 30 ng/0.25 µl de L-glutamato (Datta et al., 2001). Todas las microinyecciones se realizaron a las nueve de la mañana y siempre con los animales en estado de alerta (animales despiertos). Los efectos farmacológicos fueron evaluados visualmente a partir de los registros, de acuerdo con los criterios de Sterman et al., 1965 y de Ursin y Sterman, 1981. La actividad PGO fue cuantificada contando todos y cada uno de los potenciales PGO



### 10.6. Verificación Histológica

Al finalizar las series experimentales, la localización de la cánula guía así como la del microinyector fue verificada utilizando el procedimiento rápido desarrollado por Guzmán-Flores et al., 1958. Esta técnica consiste, en realizar cortes histológicos seriados cada 60 micras como negativos para obtener impresiones en papel fotográfico. Para ello, los gatos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico y fueron perfundidos intracardiamente con solución isotónica de cloruro de sodio y formaldehído al 20%. Al día siguiente sus cerebros fueron extraídos y colocados en formaldehído al 20% durante 15 días. Se verificaron de manera efectiva sitios de la región C-PBL en todos los animales incluidos en este trabajo. Figura 5

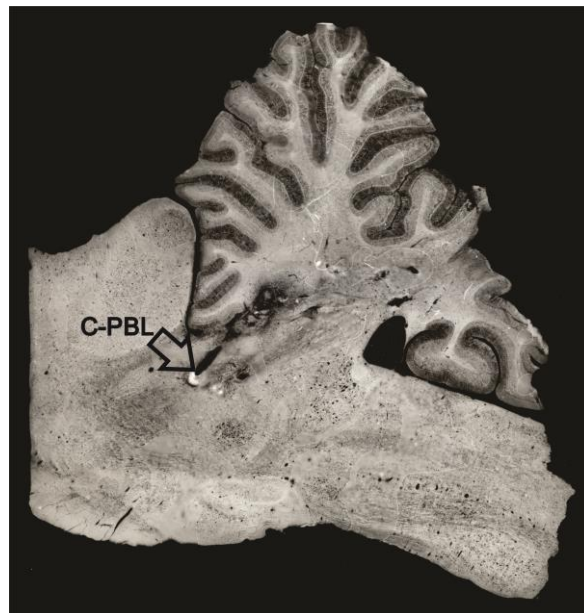


Figura 5. Impresión fotográfica obtenida mediante el procedimiento rápido (Guzmán-Flores et al., 1958), en ella se logran observar los rastros de la trayectoria de la cánula y la localización del microinyector dentro de la región C-PBL. La flecha indica el sitio de inyección (cánula calibre 36). La imagen representa el plano 4.0 posterior.

### **10.7. Valoración y análisis de los estados conductuales y de la actividad PGO**

Para el análisis de los estados del sueño y de la vigilia, se determinaron visualmente los periodos de vigilia (W), el sueño de ondas lentas 1 (SWS1), sueño de ondas lentas 2 (SWS2), los episodios de SP y lo de sueño REM según la clasificación realizada por Ursin y Sterman en 1981. La W, el SWS1, el SWS2, los episodios de SP y los episodios de sueño REM se determinaron visualmente después de cada registro de 23 horas para obtener un total de: 13 registros control (CON), 10 de carbacol (CARB), 14 de muscimol (MUSC) y 10 de L-glutamato (GLUT).

### **10.8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico del porcentaje, número, duración promedio, y latencia de cada una de las fases de vigilia y sueño, se calculó mediante un programa computacional especialmente diseñado en nuestro laboratorio para la valoración del sueño en el gato (Calvo y Fernández-Mas, 1994). Estas variables fueron promediadas para cada animal en la situación control y en cada una de las situaciones experimentales. Posteriormente, los valores fueron promediados para todos los animales y finalmente dichos datos fueron graficados. La latencia al primer episodio de SWS1 y de sueño REM fue analizada después de cada una de las diferentes condiciones experimentales.

El análisis de los potenciales PGO se realizó tanto en situaciones control como en las diferentes situaciones experimentales, esta actividad se analizó de manera visual. El análisis de las características de la actividad PGO consistió en: densidad

(número de potenciales PGO/minuto) y patrón de ocurrencia (frecuencia de aparición de potenciales simples, dobles, triples, cuádruples, quíntuples y salvas de seis o más potenciales).

En análisis estadístico se realizó y las diferencias entre las medias de los valores control y el de las medias de las situaciones experimentales fueron comparadas mediante el Análisis de la Varianza para medidas repetidas de una vía. Los efectos principales fueron analizados utilizando la prueba de comparación por pares (post-hoc) Bonferroni; todos los efectos principales cumplieron el criterio para nivel de significancia a un valor de  $P = 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SigmaPlot para Windows versión 11.0, Systat Software, Inc.

## **11. RESULTADOS**

### **11.1. Activación del generador pontino de potenciales PGO**

Después de que el carbacol fue inyectado en el C-PBL, se observaron ondas PGO en ambos cuerpos geniculados laterales en un tiempo de cuatro a 10 minutos. Estas ondas PGO se observaron de manera sostenida durante un periodo de 18 a 20 horas, las cuales mostraron un patrón constante de aparición el cual consistió en salvas de cuatro a seis potenciales, seguidas por un periodo de ausencia de potenciales de cuatro a seis segundos. Esta actividad ocurrió de manera independiente a los estados conductuales Figura 6.

Después de que cualquiera de los agonistas colinérgicos, GABAérgicos y/o glutamatérgicos fueran inyectados localmente y bilateralmente en la región C-PBL, sus efectos sobre los estadios del sueño y de la vigilia fueron examinados. Como se describió en material y métodos, tres grupos experimentales fueron estudiados: (1) CARB, (2) MUSC, y (3) GLUT. Los valores promedio del ciclo sueño-vigilia tras las sesiones experimentales fueron comparados con aquellos obtenidos durante los registros control (vehículo/salina). Los siguientes apartados describen los efectos cuantitativos de la inyección de las drogas sobre los estados de vigilia, de sueño en ondas lentas, de los episodios de SP y de sueño REM.

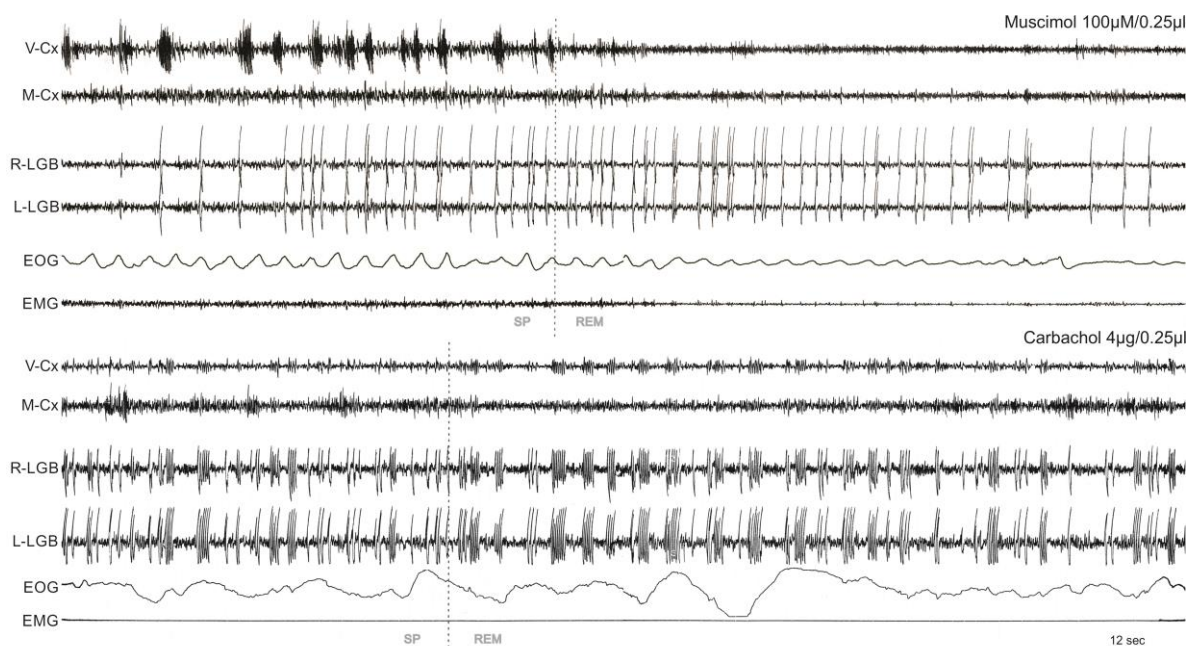


Figura 6. Trazos poligráficos que muestran la transición del sueño sincronizado con potenciales PGO (SP) hacia el sueño REM después de la microinyección de muscimol y carbacol. Trazos continuos de dos minutos que muestran ondas PGO tres horas después de la inyección de muscimol (trazo superior) y tres horas después de la inyección de carbacol (trazo inferior). Las líneas punteadas indican el cambio de fase. Nótese, el aumento de ondas y de salvas de PGO registradas en ambos cuerpos geniculados laterales durante la administración de carbacol, en contraste, con el muscimol las ondas PGO aparecen en menor número y las salvas pocas veces ocurren. Además, durante carbacol la activación del EEG fue prominente y los husos del sueño casi son eliminados, al contrario con el muscimol los husos del sueño son promovidos. Los trazos fueron obtenidos del mismo animal. Abreviaciones: V-Cx, corteza visual; M-Cx, corteza motora; R-LGB y L-LGB, cuerpo geniculado lateral derecho e izquierdo respectivamente; EOG, electrooculograma; EMG, electromiograma; SP, sueño sincronizado con ondas PGO; REM, sueño con movimientos oculares rápidos.

## 11.2. Organización del sueño después de las pruebas experimentales.

En la Figura 7 se presentan tres hipnogramas representativos de las distintas pruebas farmacológicas y un hipnograma control, todos del mismo animal. Los hipnogramas muestran los efectos de las diferentes drogas sobre los estados del

ciclo sueño-vigilia. Por otro lado, como ha sido reportado previamente la microinyección de carbacol en la región C-PBL promueve los episodios de SP y los de sueño REM, aunque prolonga la latencia de aparición al primer episodio de sueño REM. Durante la condición control la latencia al sueño REM fue de 48.57 min  $\pm$  SD 26.06 (n = 13), mientras que la latencia al sueño REM en REM<sub>CARB</sub> fue de 148.23 min  $\pm$  SD 59.29 (n = 10). Notablemente, esta latencia fue mayor que aquella del REM<sub>MUSC</sub> 126.74 min  $\pm$  SD 85.28 (n = 14) (Figura 8). Es importante mencionar, que después de la microinyección de muscimol se observó clínicamente una importante reducción de la actividad PGO. La latencia es el tiempo transcurrido (en minutos) para la aparición del primer episodio de sueño REM a partir de la administración de las sustancias.

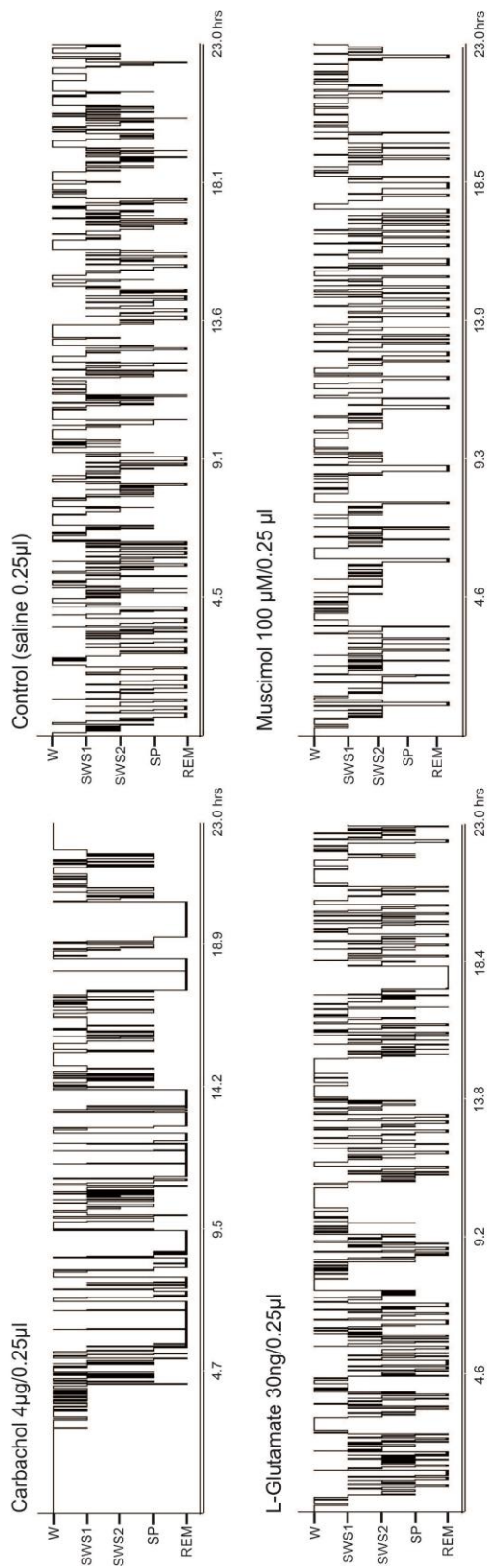


Figura 7. Hipnogramas que ilustran la organización del ciclo sueño-vigilia después de la microinyección de carbachol, salina (control), L-glutamato y muscimol durante 23 horas en un animal representativo. Los hipnogramas muestran la ocurrencia y la duración de la vigilia (W), del sueño en ondas lentas 1 (SWS1), del sueño en ondas lentas 2 (SWS2), sueño sincronizado con potenciales PGO (SP) y del sueño REM después de las microinyecciones. Nótese, el aumento en el número de episodios de SP y de REM así como el aumento en la duración de estas fases tras la microinyección de carbachol. Sin embargo, también se observa un periodo prolongado del estado de vigilia y un aumento en la latencia de instalación del sueño. En contraste, después del muscimol se observa una reducción importante de episodios de SP mientras que los del sueño REM no son modificados.

### 11.3. Estado de vigilia

El ANOVA mostró diferencias significativas en el porcentaje de vigilia (W) entre tratamientos ( $F = 16.383$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La comparación de la prueba de Bonferroni entre sujetos mostró diferencias para:  $W_{CON}$  ( $23.91\% \pm SD 4.68$ ) vs.  $W_{CARB}$  ( $37.10\% \pm SD 6.18$ ) ( $t = 5.744$ ,  $P = 0.001$ ). Figura 9

El muscimol y el L-glutamato no incrementaron el porcentaje de vigilia al compararse con el porcentaje de la microinyección de salina. No se encontraron diferencias al compararse con  $W_{MUSC}$  ( $22.72\% \pm 6.27 SD$ ) ni al compararse con  $W_{GLUT}$  ( $24.79\% \pm SD 3.61$ ). Figura 9. El número total de episodios de vigilia no mostró diferencias significativas. Figura 10

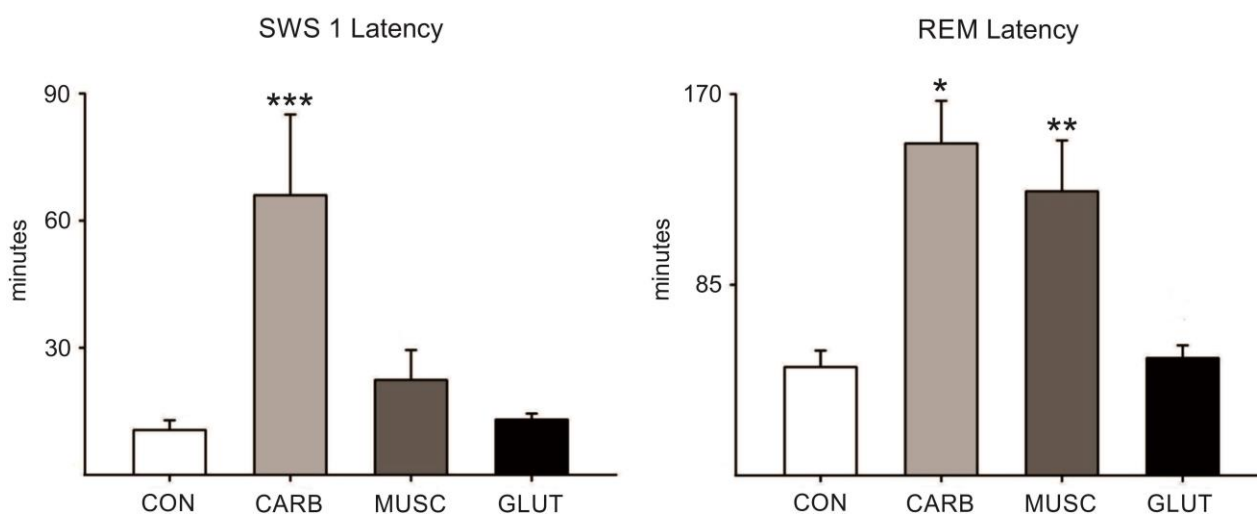


Figura 8. Latencia de aparición al primer episodio de sueño de ondas lentas 1 (SWS1) y al primer episodio de sueño REM. Nótese, como el muscimol solo incremento la latencia al sueño REM y no la del SWS1. Las pruebas t Post hoc indican los niveles de significancia de las diferencias entre las medias; \* $P < 0.010$ ; \*\* $P < 0.007$ ; \*\*\* $P < 0.001$  al ser comparadas con las medias de la situación control. Abreviaciones; CON, control; CARB, carbacol; MUSC, muscimol; GLUT, L-glutamato.



#### 11.4. Sueño de ondas lentas

El sueño de ondas lentas 1 (SWS1) no mostró diferencias significativas respecto al porcentaje del ciclo sueño-vigilia entre las diferentes condiciones experimentales. En contraste, el número total de episodios de SWS1 sí mostró diferencias significativas ( $F = 7.539$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La prueba de Bonferroni mostró diferencias para:  $SWS1_{CARB}$  ( $130.40 \pm SD 29.33$ ) vs.  $SWS1_{CON}$  ( $175.46 \pm SD 32.06$ ) ( $t = 4.302$ ,  $P = 0.001$ ).

El porcentaje de sueño en ondas lentas 2 (SWS2) mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $F = 26.468$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). Los contrastes Bonferroni revelaron diferencias para:  $SWS2_{CARB}$  ( $18.99\% \pm SD 8.59$ ) vs.  $SWS2_{CON}$  ( $37.16\% \pm SD 3.73$ ) ( $t = 7.730$ ,  $P = 0.001$ ). Cuando se comparó con  $SWS2_{MUSC}$  ( $35.61\% \pm SD 4.95$ ) y con  $SWS2_{GLUT}$  ( $35.63\% \pm SD 3.58$ ) no se encontraron diferencias significativas (Figura 9).

El ANOVA mostró diferencias significativas en el número total de episodios de SWS2 entre tratamientos ( $F = 11.244$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La prueba de Bonferroni indicó diferencias para:  $SWS2_{CON}$  ( $139.46 \pm SD 23.18$ ) vs.  $SWS2_{CARB}$  ( $91.20 \pm SD 30.73$ ) ( $t = 5.530$ ,  $P = 0.001$ ), mientras que vs.  $SWS2_{MUSC}$  ( $125.00 \pm SD 23.95$ ) y  $SWS2_{GLUT}$  ( $124.90 \pm SD 12.94$ ) no se observaron diferencias (Figura 10). Es importante señalar, que se observó una reducción significativa en el número de episodios de SWS2, la cual fue proporcional al aumento en el número de episodios de SP.

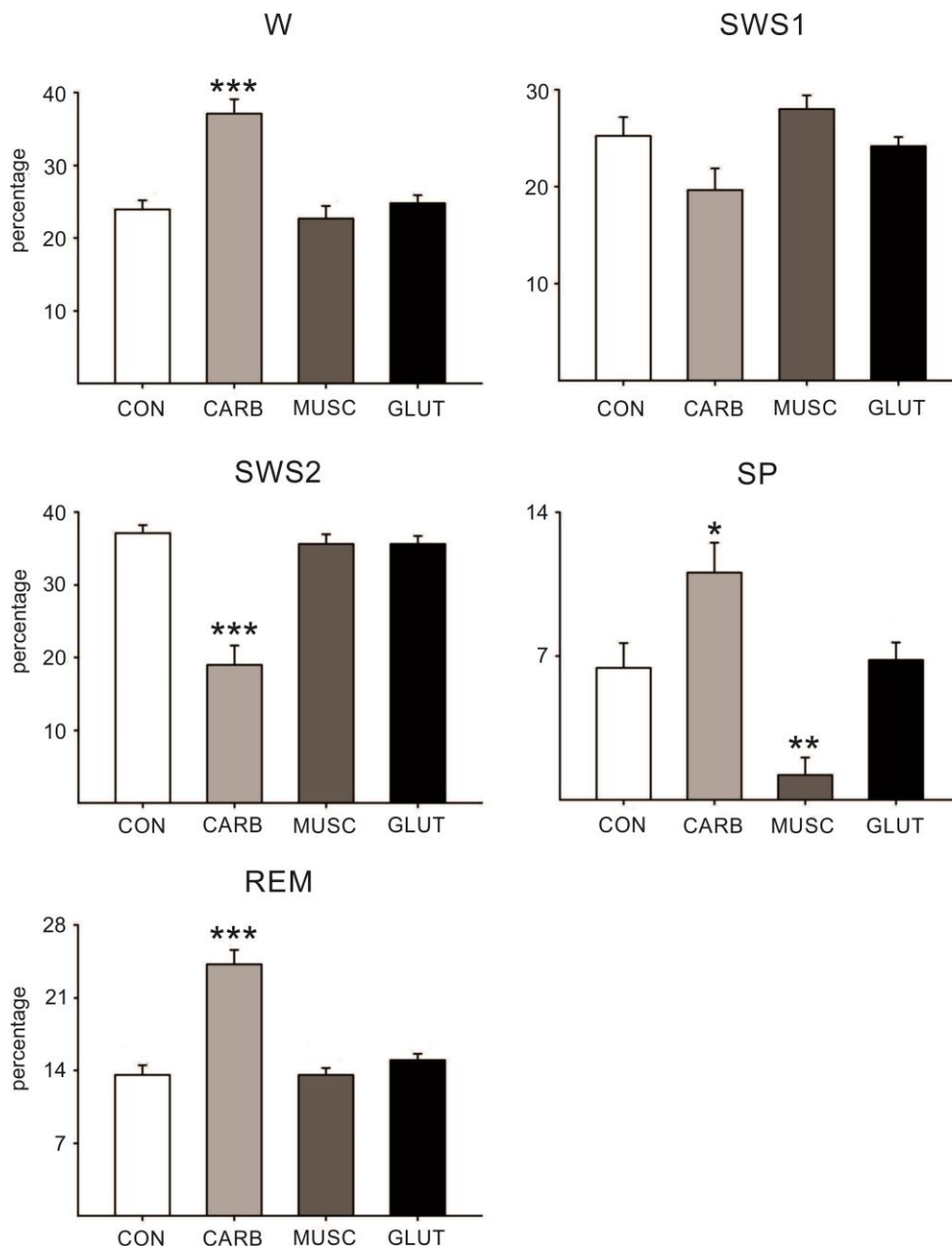


Figura 9. Efectos de las microinyecciones en la región C-PBL sobre el porcentaje del tiempo ocupado en vigilia, sueño de ondas lentas, SP y REM. El carbacol aumento el tiempo de vigilia, de SP y de sueño REM durante un periodo de 23 horas posteriores a la inyección. Nótese, el decremento significativo del SP tras la administración de muscimol comparado con la proporción del SP durante el control. No obstante, después de la inyección de glutamato no se observó ni la reducción, ni el aumento de SP. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM); los asteriscos indican los niveles de significancia estadística de la diferencia entre las medias; \*P 0.050; \*\*P < 0.010 al compararse con el control.

### 11.5. Sueño sincronizado con potenciales PGO (SP)

Los resultados del ANOVA mostraron diferencias significativas en el porcentaje de SP entre tratamientos; ( $F = 10.622$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). Específicamente, el test de Boferroni mostró diferencias entre  $SP_{CON}$  ( $6.43\% \pm SD 4.18$ ) vs.  $SP_{MUSC}$  ( $1.21\% \pm SD 3.21$ ) ( $t = 3.185$ ,  $P = 0.010$ ) y  $SP_{CON}$  ( $6.43\% \pm SD 4.18$ ) vs.  $SP_{CARB}$  ( $11.07\% \pm SD 4.58$ ) ( $t = 2.481$ ,  $P = 0.050$ ) (Figura 9). No se observaron diferencias significativas al compararse con  $SP_{GLUT}$  ( $6.82\% \pm SD 2.69$ ).

El análisis del ANOVA mostró diferencias significativas en el número total de episodios de SP ( $F = 10.487$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). Las Figuras 9 y 10 describen la reducción significativa del SP, esta disminución (número total y porcentaje) resultó ser el efecto más robusto de entre todos los tratamientos y fue la fase más disminuida después de la estimulación GABAérgica de la región C-PBL.

Por otro lado, la prueba Bonferroni mostró una disminución significativa en el número total de episodios de SP;  $SP_{MUSC}$  ( $20.42 \pm SD 26.07$ ) en comparación con  $SP_{CON}$  ( $88.91 \pm SD 50.74$ ) ( $t = 5.152$ ,  $P = 0.001$ ) mientras que no se observaron diferencias para el resto de los ensayos: vs.  $SP_{GLUT}$  ( $85.10 \pm SD 34.36$ ) y  $SP_{CARB}$  ( $80.10 \pm SD 25.16$ ) (Figura 10).

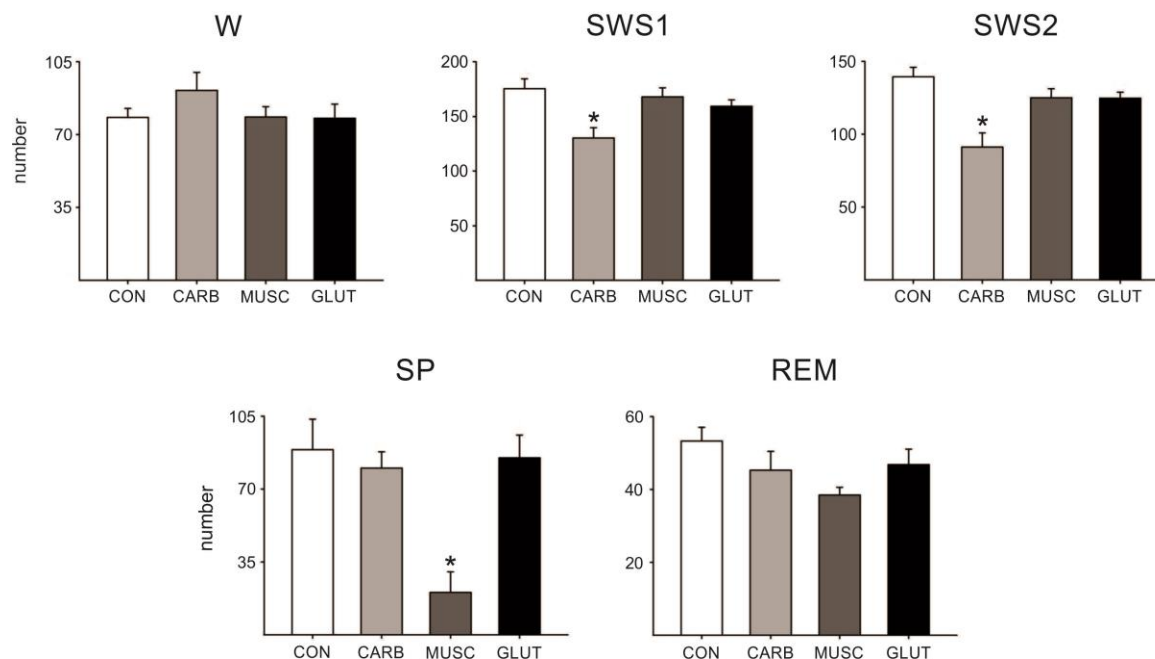


Figura 10. Efecto de los diferentes ensayos farmacológicos sobre el número total de episodios de vigilia (W), sueño de ondas lentas (SWS), SP y REM. Nótese, que el SP se redujo de manera significativa solamente después de la microinyección de muscimol, mientras que el sueño REM se presentó sin cambio alguno. La inyección de carbacol redujo significativamente el número total de SWS1 y de SWS2, mientras que, el L-glutamato presentó valores similares a aquellos de los registros control. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM); los asteriscos indican los niveles de significancia estadística de la diferencia entre las medias; \* $P < 0.001$  al compararse con el control.

### 11.6. Sueño REM

El ANOVA mostró diferencias significativas en el porcentaje de sueño REM entre tratamientos ( $F = 21.076$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La prueba de Bonferroni indicó diferencias significativas exclusivamente para  $REM_{CARB}$  ( $24.22\% \pm SD 4.32$ ) al compararse con  $REM_{CON}$  ( $13.58\% \pm SD 3.37$ ) ( $t = 6.718$ ,  $P = 0.001$ ) (Figura 9), mientras que no se observaron diferencias para  $REM_{MUSC}$  ( $13.58\% \pm SD 2.49$ ) ni

para REM<sub>GLUT</sub> (15.03%  $\pm$  SD 1.92). El número total de episodios de sueño REM no mostró cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales.

### 11.7. Latencia al sueño lento y al sueño REM

El carbacol provocó un aumento importante en el tiempo de instalación del sueño. El ANOVA mostró diferencias significativas en la latencia al SWS1 entre tratamientos; ( $F = 6.711$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La prueba de Bonferroni mostró diferencias significativas para: SWS1<sub>CON</sub> (10.59min  $\pm$  SD 8.20) vs. SWS1<sub>CARB</sub> (66.11min  $\pm$  SD 60.11) ( $t = 3.940$ ,  $P = 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas al compararse con SWS1<sub>GLUT</sub> (13.08min  $\pm$  SD 4.34) ni con SWS1<sub>MUSC</sub> (22.50min  $\pm$  SD 26.05). Por otra parte, la latencia al primer episodio de sueño REM cambió significativamente entre tratamientos ( $F = 7.565$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La prueba Bonferroni encontró diferencias significativas para: REM<sub>CON</sub> (48.57min  $\pm$  SD 26.06) vs. REM<sub>CARB</sub> (148.23min  $\pm$  SD 59.29) ( $t = 3.183$ ,  $P = 0.010$ ); y REM<sub>CON</sub> (48.57min  $\pm$  SD 26.06) vs. REM<sub>MUSC</sub> (126.74min  $\pm$  85.28) ( $t = 3.322$ ,  $P = 0.007$ ). No se encontraron diferencias al compararse con REM<sub>GLUT</sub> (52.41min  $\pm$  SD 17.64) Figura 8.

Estos resultados sugieren que la estimulación colinérgica retrasa y desorganiza significativamente la instalación del sueño, de manera específica se altera la presentación del primer episodio de sueño REM. Sin embargo, la cantidad total de sueño REM después de 23 horas resulta ser mayor bajo esta condición. En contraste, en los ensayos de muscimol solo la latencia al sueño REM aumentó en forma significativa, mientras que el porcentaje de REM y la latencia al sueño de ondas lentas no se modificó.

### 11.8. Duración promedio del sueño REM

El ANOVA indicó diferencias significativas en la duración promedio del sueño REM entre tratamientos ( $F = 9.193$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La prueba Bonferroni mostró diferencias solo para:  $REM_{CON}$  ( $3.56\text{min} \pm \text{SD } 1.12$ ) vs.  $REM_{CARB}$  ( $7.47\text{min} \pm \text{SD } 2.52$ ) ( $t = 4.971$ ,  $P = 0.001$ ) (Figura 11). No se encontraron diferencias significativas vs.  $REM_{GLUT}$  ( $4.69\text{min} \pm \text{SD } 1.22$ ) y vs.  $REM_{MUSC}$  ( $5.06\text{min} \pm \text{SD } 1.77$ ).

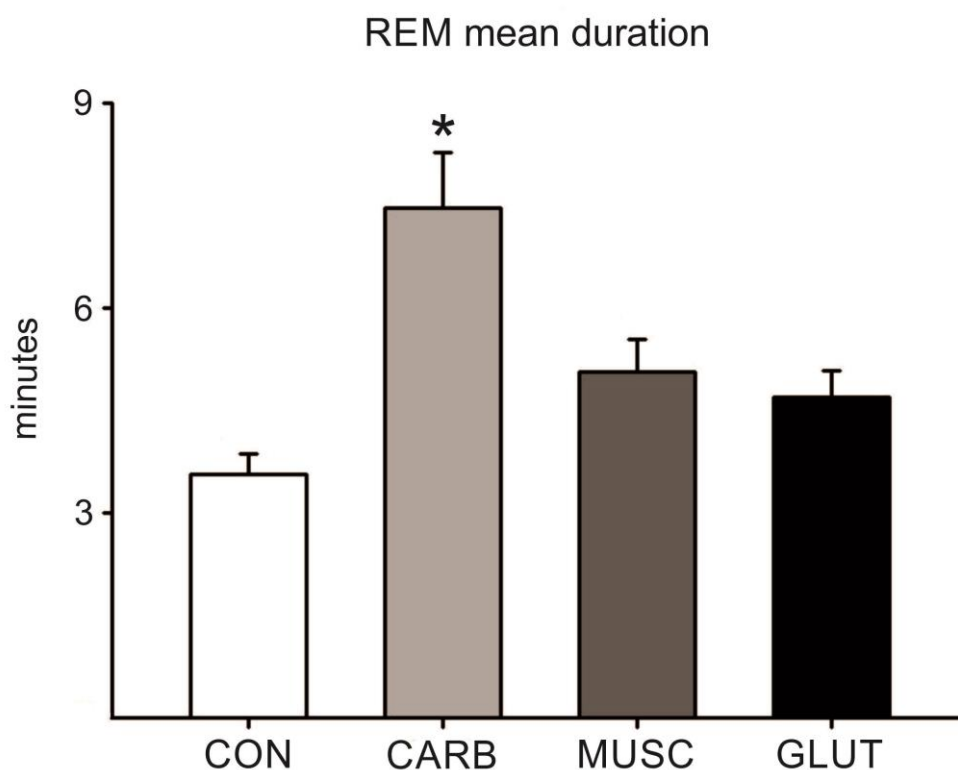


Figura 11. Efectos sobre la duración promedio (en minutos) del sueño REM después de las microinyecciones en la región C-PBL. Solamente la microinyección de carbacol provocó un incremento significativo en la duración promedio de los episodios de sueño REM. Mientras tanto, L-glutamato y muscimol mostraron valores similares a aquellos de los registros control. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM); los asteriscos indican los niveles de significancia estadística; \* $P < 0.001$  al compararse con el control.

### 11.9. Conteo total de potenciales PGO

Con el fin de cuantificar los efectos de los diferentes tratamientos farmacológicos sobre la actividad PGO, dichos potenciales fueron contados de manera visual en ambos cuerpos geniculados laterales (LGBs). El conteo se realizó a lo largo de las 23 horas de registro, en todas y cada una de las manipulaciones experimentales. Los valores obtenidos fueron comparados con los datos de los registros control. Para los registros control, la media de potenciales PGO fue de  $14,674 \pm 1,239$ . La microinyecciones de carbacol resultaron en un conteo significativamente mayor de PGOs, con un número promedio que alcanzó  $37,382 \pm 15,599$  potenciales. El número total de potenciales varió significativamente entre los ensayos ( $F = 10.188$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ). La prueba Bonferroni encontró diferencias entre: PGO<sub>CON</sub> ( $14,674 \pm SD 1,239$ ) vs. PGO<sub>CARB</sub> ( $37,382 \pm SD 15,599$ ) ( $t = 4.000$ ,  $P = 0.005$ ); y PGO<sub>CON</sub> vs. PGO<sub>MUSC</sub> ( $5,349 \pm SD 1,551$ ) ( $t = 10.119$ ,  $P = 0.002$ ). No se encontraron diferencias al compararse con PGO<sub>GLUT</sub> ( $17,361 \pm SD 10,554$ ) (Figura 12).

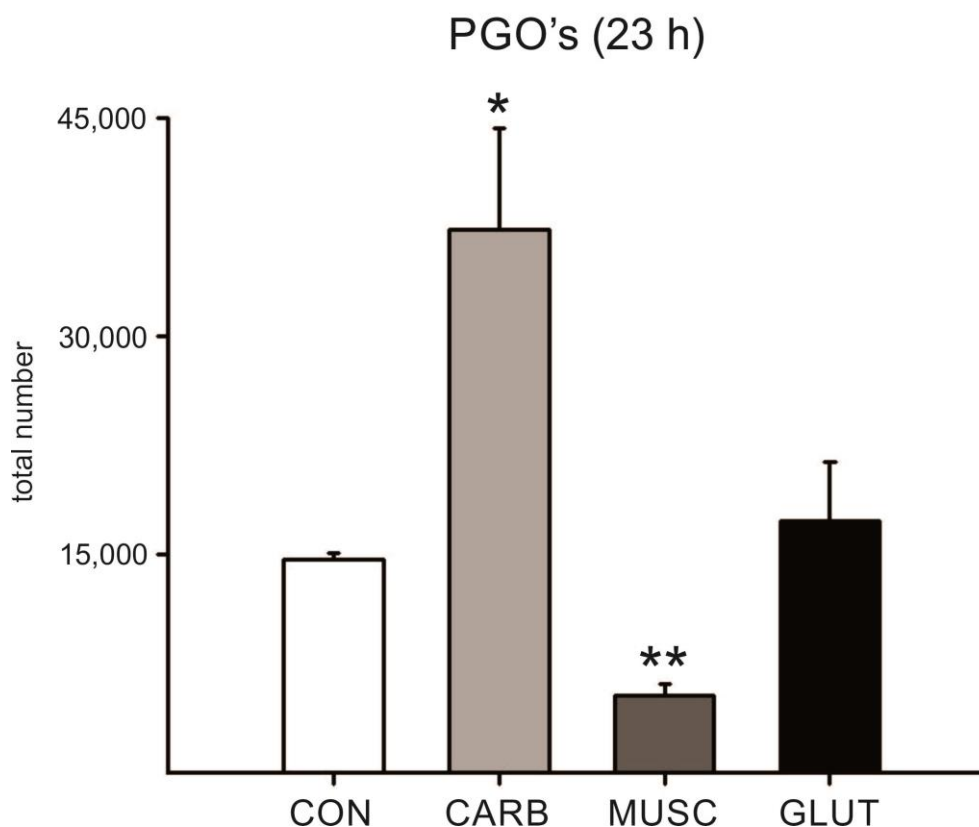


Figura 12. Conteos a largo plazo de potenciales PGO después de las microinyecciones en la región C-PBL. Las barras muestran el número total de potenciales (media  $\pm$  error estándar por cada 23 horas) durante el control y durante los ensayos post-farmacológicos. Nótese la masiva y duradera disminución en el número total de potenciales tras la microinyección de muscimol. En contraste, nótese el aumento del número total de potenciales después de la microinyección de carbacol. Los conteos durante L-glutamato resultaron en valores similares a aquellos obtenidos durante los registros control. Los datos son presentados como la media  $\pm$  el error estándar; los asteriscos indican el nivel de significancia estadística; \*P < 0.005; \*\*P < 0.005 al compararse con el control.



## 12. DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que la actividad PGO es regulada en la región C-PBL, además se confirmó que esta actividad es originada y promovida mediante mecanismos colinérgicos y no por mecanismos glutamatérgicos. Nosotros suponemos que la inactivación GABAérgica de este sitio en específico tiene como consecuencia la supresión casi total de los potenciales PGO. Confirmamos, que la estimulación colinérgica de la región C-PBL promueve el sueño REM y el SP, incrementando a la vez la actividad PGO durante 23 horas.

Es importante señalar que la latencia al sueño REM aumenta significativamente después de la estimulación colinérgica y que en general, la instalación del sueño se retrasa de manera importante con respecto a la latencia de instalación del sueño de las situaciones control. La estimulación glutamatérgica, mostro valores similares a aquellos de los registros control para el tiempo de instalación del sueño, mientras que la estimulación GABAérgica aumentó la latencia al sueño REM pero no la del SWS. Cabe señalar, que la estimulación GABAérgica provocó una importante reducción en el número total y en el porcentaje del SP, además de una importante disminución de la actividad PGO durante 23 horas. Estos resultados sugieren que los mecanismos GABAérgicos en la región C-PBL pueden inhibir de manera directa a la actividad PGO, retrasan la instalación del sueño REM y prácticamente suprimen la aparición de episodios de SP mientras que el sueño de ondas lentas no se modifica.

Es importante mencionar que después de las microinyecciones de muscimol, la latencia al sueño REM mostró valores similares a aquellos de las dosis de carbacol. Sin embargo, el muscimol redujo de manera significativa el número total de SP así como su porcentaje, además esta dosis decreció de manera importante el número total de potenciales PGO durante los periodos de 23 horas. Por lo tanto, sugerimos que el GABA en la región C-PBL puede estar inhibiendo exclusivamente a la actividad PGO y al SP sin modificar al sueño REM (este último se deteriora ligeramente pero no hay cambios significativos).

Cabe señalar que a pesar de que el muscimol provocó los efectos antes descritos, el número total y el porcentaje del estado de vigilia no incrementó. En este sentido, los mecanismos que involucran transmisión GABAérgica en el núcleo pontis oralis (NPO) contiguo, ya han sido descritos pero este núcleo en particular es el responsable de la modulación tanto de sueño REM como del estado de vigilia (Xi et al., 2004).

Nuestros resultados sugieren que a diferencia del NPO en gatos y de la formación reticular pontina en su parte oral (PnO) en ratas (Watson et al., 2011) –áreas asociadas con el mantenimiento y duración del sueño REM– la región C-PBL solamente modula a los fenómenos fásicos del sueño REM (e.g. potenciales PGO) y que por otra parte no bloquea propiamente al sueño REM. Por otra parte, el L-glutamato en esta misma región no produce ningún tipo de cambio ni en el sueño REM ni en los episodios de SP.

Cabe señalar, que otros estudios también han demostrado que el glutamato en el PPT también participa en la instalación y mantenimiento del sueño REM (Datta y Siwek, 1997; Datta et al., 2001), sin embargo en estos estudios la actividad de las ondas P en ratas y de los potenciales PGO en el gato no fue analizada. Es importante mencionar que en este estudio la administración de glutamato en la región C-PBL no se asoció directamente con la regulación de la actividad PGO. Por lo tanto, nuestros resultados destacan la presencia y la importancia de las interacciones entre el sistema GABAérgico pontino y el sistema colinérgico pontino, sobre la regulación de los fenómenos fásicos del sueño REM, es decir, los potenciales PGO, esta interacción puede ser independiente de aquellas interacciones responsables de la generación de sueño REM.

La disminución significativa del porcentaje de SP después de la aplicación de muscimol en la región C-PBL, sugiere que esta breve etapa de sueño – considerada como una etapa que promueve y origina al sueño REM – resulta ser la fase de sueño más sensible a la estimulación GABAérgica. Notablemente, a pesar de que existe una intensa inhibición de la actividad PGO, así como un retraso en la instalación del sueño REM, el muscimol no alteró ni la duración promedio del sueño REM, ni su número total durante los registros de 23 horas. Indicándonos así, que puede ser otro el neurotransmisor responsable de la regulación de dichos fenómenos y este resulta ser la acetilcolina.

Nosotros proponemos que el conjunto de fenómenos del sueño REM, podría estar obedeciendo dos mecanismos diferentes; por una parte, la regulación de la

instalación del sueño REM y el mantenimiento de esta fase, mediante un impulso glutamatérgico del compartimiento celular colinérgico del PPT y por otra parte, mediante la facilitación de los componentes fásicos del sueño REM (potenciales PGO) a través de un impulso colinérgico de la región C-PBL. Sin embargo, la manera y el grado en que estos dos mecanismos interactúan entre sí, aún queda por ser estudiado.

En la figura 13, presentamos un esquema general que trata de explicar las interacciones entre diferentes estructuras y diferentes neurotransmisores involucrados en la generación del SP y en la transición del SP hacia el sueño REM en el gato (Figura 13). Cabe mencionar que en roedores, el núcleo tegmental sublaterodorsal (SLD), también denominado parte dorsal del núcleo subcoeruleus (SubCD) resulta ser la estructura generadora de las ondas P, pero no así del sueño REM (impulso glutamatérgico) además, que las neuronas glutamatérgicas REM-on del SLD también podrían ser las responsables de la activación cortical y de la atonía muscular del sueño REM.

En resumen, esta supuesta interacción entre estos diferentes mecanismos no ocurre necesariamente del mismo modo en animales presa (roedores), de hecho, la interacción entre estos neurotransmisores en el SLD-SubCD, en el peri-LC alpha (control de la atonía muscular) y en la sustancia gris periacueductal ventro-lateral (VIPAG) es diferente y probablemente el glutamato y el GABA desempeñen roles fundamentales. En cambio en el gato, la acetilcolina es el neurotransmisor primordialmente involucrado en la generación de los signos del sueño REM.

Los resultados de este estudio demuestran que la aplicación de agonistas GABAérgicos en la región C-PBL no inhibe al sueño REM. Mediante estudios de microdiálisis in vivo en el gato, ha sido demostrado que los receptores GABA<sub>A</sub> de la formación reticular pontina (FRP) inhiben la liberación de acetilcolina (Vazquez y Baghdoyan, 2004). El hecho de que la liberación de acetilcolina en la PRF sea modulada por los receptores GABA<sub>A</sub>, es consistente con la interpretación de que la inhibición de la neurotransmisión GABAérgica en la PRF contribuye con la generación del sueño REM, mediante el incremento en la liberación de acetilcolina (Vazquez y Baghdoyan, 2004). De una manera similar, el GABA podría estar ejerciendo una influencia inhibitoria en la región C-PBL. Esta misma inhibición a la vez, disminuye o impide la liberación de acetilcolina dando como resultado una importante reducción de episodios de SP y la casi total supresión de actividad PGO.

Una característica particular de este estudio es la duración de los efectos observados durante y a lo largo de los registros de 23 horas. Esta preparación fue diseñada puesto que permite tener una aproximación fisiológica de los eventos conductuales y electrográficos relacionados con el sueño al analizar dichos eventos en forma longitudinal. Por lo tanto, se propone que el GABA en la región PBL puede ser el neurotransmisor más involucrado en el mecanismo que regula el SP a largo plazo, actuando por medio de una disminución duradera de la transmisión colinérgica, la cual a su vez provoca un deterioro importante de la actividad PGO y una reducción significativa en el número de episodios de SP.

Los resultados del presente estudio indican la necesidad de futuras investigaciones en animales intactos para especificar el grado en el que la región C-PBL contribuye con la generación de los potenciales PGO, no solo durante el sueño REM sino también cuando estos potenciales ocurren en combinación con el sueño de ondas lentas, esto nos podría explicar si es que mediante interacciones GABAérgicas-colinérgicas es como los estados de transición entre el sueño de ondas lentas y el sueño REM son facilitados.

### **13. CONCLUSIÓN**

Hemos demostrado que la aplicación local de muscimol, agonista de los receptores GABA<sub>A</sub> interrumpe la actividad de los potenciales PGO y reduce significativamente los episodios de SP al ser administrado en la región C-PBL. Por otra parte el carbacol promueve los estados relacionados con los PGO, promoviéndose así los episodios de SP y de REM, mientras que la aplicación de glutamato no provocó cambios en las proporciones de estos estados.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 1953;118:273-274.
- Ayala GF. Actividad ponto-geniculo-occipital (PGO) durante el sueño del gato. *Ser Biol Exp* 1976;1:5-20.
- Ayala GF. Filogenia del sueño: Los mamíferos. *Bol Estud Méd Biol Méx (Suplemento)* 1983;32:67-82.
- Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA. A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res* 1987;414:245-261.
- Baghdoyan HA, Lydic R, Callaway CW, Hobson JA. The carbachol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose dependent and antagonized by centrally administered atropine. *Neuropsychopharmacology* 1989;2:67-79.
- Balzamo E. Un primate parmi les primates. Etats de vigilance et activités ponto-geniculo-corticales (PGC). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1980;48:694-705.
- Baust W, Holzbach E, Zechlin O. Phasic changes in heart rate and respiration correlated with PGO-spike activity during REM sleep. *Pflugers Arch* 1972;331:113-123.
- Berlucchi G, Moruzzi G, Salvo G, Strata P. Pupil behavior and ocular movement during synchronized and desynchronized sleep. *Arch Ital Biol* 1964;102:230-245.
- Bertrand F, Hugelin A. Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. *J Neurophysiol* 1971;34: 189-207.
- Bizzi E, Brooks DC. Functional connections between pontine reticular formation and lateral geniculate nucleus during sleep. *Arch Ital Biol* 1963;101:666-680.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH. The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 2002;16:1959-1973.
- Bremer F. Cerveau "isolé" et physiologie du sommeil. *C.R.Soc.Biol.(Paris)*, 1935;118: 1235-1241.



- Brooks DC, Bizzi E. Brain stem electrical activity during deep sleep. *Arch Ital Biol* 1963;101:648-665.
- Brooks DC. Waves associated with eye movement in the awake and sleep cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1968;24:532-541.
- Brooks DC, Gershon MD. Eye movement potentials in the oculomotor and visual system of the cat: A comparison of reserpine induced waves with those present during wakefulness and rapid eye movement sleep. *Brain Res* 1971;27:223-239.
- Brooks DC, Gershon MD. An analysis of the effect of reserpine upon ponto-geniculo-occipital wave activity in the cat. *Neuropharmacology* 1972;11:499-510.
- Buguet A, Petitjean F, Jouvet M. Suppression des pointes ponto-geniculo-occipitales du sommeil par lésion ou injection in situ de 6-hydroxy-dopamine au niveau du tegmentum pontique. *C R Soc Biol* 1970;164:2293-2298.
- Caballero A, de Andres I. Unilateral lesion in locus coeruleus area enhance paradoxical sleep. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1986;64:339-346.
- Callaway CW, Lydic R, Baghdoyan HA y Hobson JA. Pontogeniculooccipital waves: spontaneous visual system activity during rapid eye movement sleep. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1987;7:105-149.
- Calvo JM, Fernandez-Guardiola A. Phasic activity of basolateral amygdala, cingulate gyrus, and hippocampus during REM sleep in the cat. *Sleep* 1984;7:202.
- Calvo JM, Badillo S, Morales-Ramirez M, Palacios-Salas P. The role of the temporal lobe amygdala in ponto-geniculo-occipital activity and sleep organization in cats. *Brain Res* 1987;403:22-30.
- Calvo JM, Datta S, Quattrochi J, Hobson JA. Cholinergic microstimulation of the peribraquial nucleus in the cat. II. Delayed and prolonged increases in REM sleep. *Archives Italiennes de Biologie* 1992;130:285-301.
- Calvo JM, Fernandez-Mas R. Transitory and short-duration changes of sleep organization provoked by amygdaloid kindling in the cat: A daily 23-hour sleep recording study. *Epilepsy Research* 1994;19:1-13.

- Calvo JM, Simón-Arceo K, Fernández-Mas R. Prolonged enhancement of REM sleep produced by carbachol microinjection into the amygdala. *Neuroreport* 1996;7:577-580.
- Calvo JM, Simón-Arceo K. Long-term enhancement of REM sleep from sites in the pons and amygdala. En *Handbook of Behavioral States Control: Cellular and Molecular Mechanisms*. Lydic R y Baghdoyan H (Eds). CRC Press, Inc. Florida, USA. 1999;391-406.
- Cespuglio R, Laurent JP, Jouvet M. Etude des relations entre l'activité ponto-geniculo-occipitale (PGO) et la motricité oculaire chez le chat sous réserpine. *Brain Res* 1975;83:319-335.
- Cespuglio R, Laurent JP, Calvo JM. Organisation anatomique des activités phasiques provoquées par la reserpine au niveau du système oculo-moteur. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1976;40:12-24.
- Cespuglio R, Calvo JM, Musolino R, Valatx JL. Activite phasique chez le rat. *Physiol Behav* 1977;19:589-596.
- Chase MH, Morales FR. The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annu Rev Psychol* 1990;41:557-584.
- Clément O, Sapin E, Bérod A, Fort P, Luppi PH. Evidence that neurons of the sublateralodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep* 2011;34:419-423.
- Datta S, Paré D, Oakson G, Steriade M. Thalamic-projecting neurons in brainstem cholinergic nuclei increases their firing rates one minute in advance of EEG desynchronization associated with REM sleep (abstract), *Soc Neurosci Abstr* 1989;15:452.
- Datta S, Calvo JM, Quattrochi J, Hobson JA. Long-term enhancement of REM sleep following cholinergic stimulation. *Neuroreport* 1991;2:619-622.
- Datta S, Calvo JM, Quattrochi J, Hobson JA. Cholinergic microstimulation of the peribrachial nucleus in the cat. 1. Inmediated and prolonged increase in ponto-geniculo-occipital waves. *Arch Ital Biol* 1992;130:263-284.
- Datta S, Quattrochi J, Hobson JA. Effect of specific muscarinic M2-receptor antagonist on carbachol induced long-term REM sleep. *Sleep* 1993;16:8-14.

- Datta S, Hobson JA. Neuronal activity in the caudolateral peribrachial pons: relationship to PGO waves and rapid eye movements. *J Neurophysiol* 1994;71:95-109.
- Datta S. Neuronal activity in the peribrachial area: Relationship to behavioral state control. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19:67-84.
- Datta S, Hobson JA. Suppression of ponto-geniculo-occipital waves by neurotoxic lesions of pontine caudo-lateral peribrachial cells. *Neuroscience* 1995;67:703-712.
- Datta S, Siwek DF. Excitation of the brain stem pedunculo-pontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *J Neurophysiol* 1997;77:2975-88.
- Datta S, Siwek DF, Patterson EH, Cipolloni PB. Localization of pontine PGO wave generation sites and their anatomical projections in the rat. *Synapse* 1998;30:409-423.
- Datta S, Patterson EH, Siwek DF. Brainstem afferents of the cholinceptive pontine wave generation sites in the rat. *Sleep Res Online* 1999;2:79-82.
- Datta S, Spoley EE, Patterson EH. Microinjection of glutamate into the pedunculo-pontine tegmentum induces REM sleep and wakefulness in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R752-759.
- Datta S. Activation of phasic pontine-wave generator: A mechanism for sleep-dependent memory processing. *Sleep and Biological Rhythms* 2006;4:16-26.
- Datta S, Maclean RR. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:775-824.
- Davenne D, Adrien J. Suppression of PGO waves in the kitten: Anatomical effects on the lateral geniculate nucleus. *Neurosci Lett* 1984;45:33-38.
- Davenne D, Adrien J. Lesion of the ponto-geniculo-occipital pathways in kittens. I. Effects on sleep and on unitary discharge of the lateral geniculate nucleus. *Brain Res* 1987;409:1-9.

- Davenne D, Fregnac Y, Imbert M, Adrien J. Lesion of the PGO pathways in the kitten. II. Impairment of physiological and morphological maturation of the lateral geniculate nucleus. *Brain Res* 1989;485:267-277.
- Dement WC. The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1958;10:291-296.
- Delorme JF, Jeannerod M, Jouvet M. Effets remarquables de la reserpine sur l'activité EEG phasique ponto-geniculo-occipitale. *C R Soc Biol* 1965;159:900-903.
- Delorme JF, Froment JL, Jouvet M. Suppression du sommeil par la p-chlorométhamphetamine et p-chlorophénylalanine. *C R Soc Biol* 1966;160:2347-2351.
- Drucker-Colin R, Bernal-Pedraza J, Fernandez-Cancino F, Morrison AR. Increasing PGO spike density by auditory stimulation increases the duration and decreases the latency of rapid eye movement (REM) sleep. *Brain Res* 1983;278:308-312.
- Dunin-Barkowski WL, Orem JM. Suppression of diaphragmatic activity during spontaneous ponto-geniculo-occipital waves in cat. *Sleep* 1998;21:671-675.
- Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mieux B, Jones BE, y Muhlethaler M. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience* 2001;108:177-181.
- Fulwiler CE, Saper CB. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 1984;319:229-259.
- Gade-Ciria M. Etude séquentielle des pointes ponto-geniculo-occipitales (PGO) au cours du sommeil paradoxal chez le chat normal et après lésions corticales et sous-corticales. Thèse de Doctorat de Spécialité. Lyon, France, Université de Provence 1972;pp.219.
- Gadea-Ciria M. Cerebellar control of the feline oculomotor system during paradoxal sleep. *Exp Neurol* 1976;51:263-265.
- Gadea-Ciria M, Fuentes J. Analysis of phasic activities in the lateral rectus muscle of the eyes (PALRE) during paradoxical sleep in chronic cerebellectomized cats. *Brain Res* 1976;111:416-421.
- Galopin T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Muhlethaler M, Serafin M. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 2000;404:992-995.

- Gervasoni D, Darracq L, Fort P, Soulière F, Chouvet G, Luppi PH. Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur J Neurosci* 1998;10:964-970.
- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, et al. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 2000;20:4217-4225.
- Gritti I, Mariotti M, Mancina M. GABAergic and cholinergic basal forebrain and preoptic-anterior hypothalamic projections to the mediodorsal nucleus of the thalamus in the cat. *Neuroscience* 1998;85:149-178.
- Guzmán-Flores C, Alcaráz M, Fernandez-Guardiola A. Rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology. *Bol Est Méd Biol (Méx)* 1958;16:29-31.
- Hasseberg L. Ruhe and schlaf bei säugetieren. Wittenberg-Lutherstand: A Ziemsen. 1965;pp.160.
- Henriksen SJ, Jacobs BL, Dement WC. Dependence of REM sleep PGO waves on cholinergic mechanisms. *Brain Res* 1972;48:412-416.
- Hernández-Peón R. A cholinergic hypnogenic limbic forebrain-hindbrain circuit. En: Jouvett (Ed.), *Aspects anatom. of onctionnels. du sommeil*. Paris, Centre Reserche Scientifique 1965;pp.63-68.
- Hess WR. Das schlafsyndrom als folge dienzephaler reizung. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1944;2:305-344.
- Hobson JA, McCarley RW, Wysinsky PW, Pivik RT. Reciprocal tonic firing by FTG and LC neurons during the sleep-waking cycle. *Sleep Res* 1973;2:29-34.
- Hobson JA, McCarley RW, Pivik RT, Freeman R. Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. *Journal of Neurophysiology* 1974;37:497-511.
- Hobson JA, McCarley RW, Wysinsky PW. Sleep cycle osillation: reciprocal discharge by two brain stem neuronal groups. *Science* 1975;189:55-58.
- Hobson JA. Sleep and dreaming. *J Neurosci* 1990;10:371-382.
- Hobson JA, Pace-Schott E. The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:679-693.

- Hobson JA, Friston KJ. Waking and dreaming consciousness: neurobiological and functional considerations. *Prog Neurobiol* 2012;98:82-98.
- Horner RL, Sanford LD, Annis D, Pack AI, Morrison AR. Serotonin at the laterodorsal tegmental nucleus suppresses rapid-eye-movement sleep in freely behaving rats. *J Neurosci* 1997;17:7541-7552.
- Jeannerod M. Organization de l'activité électrique phasique de sommeil paradoxal. Lyon, France: These de Medicine 1965.
- Jones BE. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 1991;40:637.
- Jouvet M, Michel F. Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique. *C R Soc Biol (Paris)* 1959;153:422-425.
- Jouvet M. Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch Ital Biol* 1962;100:125-206.
- Jouvet M y Jouvet D. A study of the neurophysiological mechanisms of dreaming. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1963;Suppl24,133-157.
- Jouvet M. Paradoxical sleep--A study of its nature and mechanisms. *Prog Brain Res* 1965;18:20-62.
- Jouvet M, Delorme JF. Locus coeruleus et sommeil paradoxal. *C R Soc Biol* 1965;159:895-899.
- Jouvet M, Vimont-Vicary P, Delorme JF. Suppression élective du sommeil paradoxal chez le chat par les inhibiteurs de la mono-amino-oxydase. *C R Soc Biol* 1965;159:1595-1599.
- Jouvet M, Renault J. Persistence of insomnia after lesions of the nuclei of the raphe in the cat *C R Seances Soc Biol Fil* 1966;160:1461-1465.
- Jouvet M. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiol Rev* 1967;47:117-177.
- Jouvet M. The role of monoamines and acetylcholine containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. En: M. Jouvet y G. Moruzzi (Eds.). *Neuropysiology and Neurochemistry of Sleep and Wakefulness. Reviews of Physiology*, New York, Heidelberg 1972;pp.166,307.

- Jouvet M. Neuromediators and hypnogenic factors. *Rev Neurol* 1984; 140(6-7):389-400. Revisión en Frances.
- Klaue R. Etude polygraphique des differents états du sommeil. *J Psychol Neurol* 1937;47:510-531.
- Kleitman N. *Sleep and Wakefulness*. The University of Chicago Press, Chicago and London 1963.
- Kodama T, Lai YY, Siegel JM. Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res* 1998;780:178-181.
- Koyama Y, Sakai K. Modulation of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons by acetylcholine and monoamines applied iontophoretically in unanesthetized cats. *Neuroscience* 2000;96:723-733.
- Laurent JP, Cespuglio R, Jouvet M. Delimitation des voies ascendentes de l'activite ponto-geniculo-occipitale chez le chat. *Brain Res* 1974a;65:29-52.
- Laurent JP, Guerrero FA, Jouvet M. Reversible suppression of the geniculate PGO waves and the concomitant increase of excitability of the intrageniculate optic nerve terminals. *Brain Res* 1974b;81:558-563.
- Laurent JP, Rondouin G, Benita M, Jouvet M. Reversible blockade of PGO waves and concomitant modifications of thalamic unit activity in chronic cats. *Brain Res* 1977;137:305-322.
- López-Rodríguez F, Chase MH, Morales FR. PGO-related potentials in lumbar motoneurons during active sleep. *J Neurophysiol* 1992;68:109-116.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 2006;441:589-94.
- 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 Natl Acad Sci* 1992;89:743-747.
- Luppi PH, Clement O, Sapin E, Peyron C, Gervasoni D, Léger L, et al. Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. *Pflugers Arch* 2012;463:43-52.
- Luppi PH, Clément O, Fort P. Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Curr Opin Neurobiol* 2013;23:786-792.

- Magnes J, Allweis C, Abeles M. The metabolism of the perfused cat brain during EEG synchronization and arousal. *J Neurochem* 1967;14:859-871.
- Márquez-Ruiz J, Escudero M. Eye movements and abducens motoneuron behavior after cholinergic activation of the nucleus reticularis pontis caudalis. *Sleep* 2010;33:1517-1527.
- Matsumoto J, Jouvet M. Effets de reserpine, DOPA et 5 HTP sur les deux états de sommeil. *C R Soc Biol* 1964;158:2137-2140.
- McGinty D, Szymusiak R. Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Front Biosci* 1998;8:1074-1083.
- Mignot E. Why we sleep: The temporal organization of recovery. *PLoS Biol* 2008; 6(4):e106.
- Mikiten T, Niebyl P, Hendley C. EEG desynchronization during behavioral sleep associated with spike discharges from the thalamus of the cat. *Fed Proc Am Soc Exp Biol* 1961;20:327.
- Miyauchi S, Takino R, Fukuda H, Torii S. Electrophysiological evidence of dreaming: human cerebral potentials associated with rapid eye movements during REM sleep. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1987;66:383-391.
- Morales, FR, Boxer P, Chase MH. Behavioral state-specific inhibitory postsynaptic potentials impinge on cat lumbar motoneurons during active sleep. *Exp Neurol* 1987;98:418-435.
- Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1949;1:455-473.
- Mouret JR, Jeannerod M, Jouvet M. L'activité électrique du système visuel au cours de la phase paradoxale du sommeil chez le chat. *J Physiol* 1963;55:305-306.
- Mouret JR, Willppula A, Frachon N, Jouvet M. Effets d'un inhibiteur de la monoamine-oxidase sur le sommeil du rat. *C R Soc Biol* 1968;162:914-917.
- Mraovitch S, Kumada M, Reis DJ. Role of the nucleus parabrachialis in cardiovascular regulation in cat. *Brain Res* 1982;232:57-75.
- Murillo-Rodriguez E, Arias-Carrion O, Zavala-Garcia A, Sarro-Ramirez A, Huitron-Resendiz S, Arankowsky-Sandoval G. Basic sleep mechanisms: an integrative review. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2012;12:38-54.



- Nelson JP, McCarley RW, Hobson, J.A. REM sleep burst neurons, PGO waves, and eye movement information. *J Neurophysiol* 1983;50:784-797.
- Norgren R. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol* 1976;166:17-30.
- Orem J. Control of the upper airways during the sleep and the hypersomnia- sleep apnea syndrome. *Physiology in Sleep*. Orem J; Barnes CD (Eds). New York, Academic Press 1980;pp.273-308.
- Orem J. Augmenting expiratory neuronal activity in sleep and wakefulness and in relation to duration of expiration. *J Appl Physiol* 1998;85:1260-1266.
- Pal D, Mallick BN. Neural mechanism of rapid eye movement sleep generation with reference to REM-OFF neurons in locus coeruleus. *Indian J Med Res* 2007; 125:721-739.
- Pappenheimer JR, Miller JB, Goodrich CA. Sleep promoting effect of cerebrospinal fluid from sleep deprived goats. *Proc Nat Acad Sci* 1967;58:513-517.
- Peigneux P, Laureys S, Fuchs S, Delbeuck X, Degueldre C, Aerts J, Delfiore G, Luxen A, Maquet P. Generation of rapid eye movements during paradoxical sleep in humans. *Neuroimage* 2001;14:701-708.
- Perenin MT y Jeannerod M. Lésions internucléaires: effets sur la motricité oculaire pendant l'éveil et le sommeil paradoxal chez le chat. *Brain Res* 1971;32:299-310.
- Pieron H. En: *Le problème physiologique du sommeil*. Paris, Masson 1913;pp.1-520.
- Quattrochi J, Mamelak AN, Macklis JD, Madison R, Hobson JA. Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol fluorescent microspheres. *Science* 1989;245:984-986.
- Quattrochi J, Mamelak A, Binder DK, Williams J, Rittenhouse C, Hobson JA. Dynamic suppression of REM sleep by parenteral administration of the serotonin-1 agonist eltopazine. *Sleep* 1992;15:125-132.
- Quattrochi J, Mamelak AN, Binder D, Williams J, Hobson JA. Dose-related suppression of REM sleep and PGO waves by the serotonin-1 agonist eltopazine. *Neuropsychopharmacology* 1993;8:7-13.

- Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, technique and scoring system for sleep stages of human subjects. (1st ed) Washington D C, public health service, U S Government Printing Office 1968.
- Roffwarg HP, Adrian J, Marks GA, Farber J. Central and peripheral REM sleep activity in the auditory system of the cat. Sleep Research, Chase MH; Kripke DF; Walter PJ (Eds). Los Angeles U.C.L.A. 1979;pp.35
- Ruch-Monachon MA, Jalfre M, Haefely W. Drugs and PGO waves in the lateral geniculate body of the curarized cat. I. PGO wave activity induced by Ro 4-1284 and by p-chlorophenylalanine (PCPA) as a basis for neuropharmacological studies. Arch Int Pharmacodyn Ther 1976;219:251-268.
- Saito, H, Sakai K, Jouvet M. Discharge pattern of the nucleus parabrachialis lateralis neurons of the cat during sleep and waking. Brain Res 1977;134:59-72.
- Sakai K, Sastre JP, Salvert D, Touret M, Tohyama M, Jouvet M. Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: An HRP study. Brain Res 1977;176:233-254.
- Sakai K, Kanamori N, Jouvet M. Neuronal activity specific to paradoxical sleep in the bulbar reticular formation of unrestrained cats. C R Acad Sci 1979;289: 557-561.
- Sakai K, Jouvet M. Brain stem PGO-ON cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. Brain Res 1980;194:500-505.
- Sakai K. Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. En D J McGinty (Ed), Brain Mechanisms of Sleep. New York: Raven Press 1985;pp.111-137.
- Sakai K, Luppi PH, Salvert D, Kimura H, Maeda T, Jouvet M. Localisation des neurones cholinergiques dans le tronc cérébral inférieur chez le chat. C R Acad Sc (Paris) 1986;303:317-324.
- Sakai K, el Mansari M, Jouvet M. Inhibition by carbachol microinjections of presumptive cholinergic PGO-on neurons in freely moving cats. Brain Res 1990;527:213-223.
- Sakai K, Koyama Y. Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurons in the pons? NeuroReport 1996;7:2449-2453.
- Sanford LD, Ball WA, Morrison AR, Ross RJ, Mann G. Peripheral and central components of alerting: habituation of acoustic startle, orienting responses, and elicited waveforms. Behav Neurosci 1992;106:112-120.

- Saper CB, Loewy AD. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 1980;197:291-317.
- Sastre JP, Jouvet M. Le comportement onirique du chat. *Physiol Behav* 1979;22:974-978.
- 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.
- Simon-Arceo K, Ramirez-Salado I, Calvo JM. Long-lasting enhancement of rapid eye movement sleep and pontogeniculoccipital waves by vasoactive intestinal peptide microinjection into the amygdala temporal lobe. *Sleep* 2003;26:259-264.
- Simon RP, Michel DG, Brooks DC. The role of the raphe nuclei in the regulation of ponto-geniculo-occipital waves activity. *Brain Res* 1973;313-330.
- Snider RS, Niemer WT. *A Stereotaxic Atlas of the Cat Brain*. University of Chicago Press, Chicago, IL 1961.
- Steriade M, Sakai K, Jouvet M. Bulbothalamic neurons related to thalamocortical activation processes during paradoxical sleep. *Exp Brain Res* 1984; 54:463-475.
- Steriade M. The genesis of synchronized thalamocortical oscillations during sleep. *Proceedings, 5th International Congress of Sleep Research* 1987;442.
- Steriade M, McCarley RW. *Brainstem control of wakefulness and sleep*. Plenum Press, New York 1990.
- Steriade M. Basic Mechanisms of Sleep Generation. *Neurology* 1992;42:9-18.
- Steriade M, Contreras D, Dossi RC, Nunez A. The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *J Neurosci* 1993a;13: 3284-3299.
- Steriade M, Dossi RC, Contreras D. Electrophysiological properties of intralaminar thalamocortical cells discharging rhythmic (approximate-to 40 hz) spike-bursts at approximate-to 1000 hz during waking and rapid eye movement sleep. *Neuroscience* 1993b;56:1-9.
- Sterman MB, Knauss T, Lehman D, Clemente CD. Circadian sleep and waking patterns in the laboratory cat. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1965;19:509-517.

- Taylor WB, Moldofsky H, Furedy JJ. Heart rate deceleration in REM sleep: an orientating reaction interpretation. *Psychophysiology* 1985;22:110-115.
- Thomas J, y Benoit O. Individualisation d'un sommeil a ondes lentes et activité phasique. *Brain Res* 1967;5:221-235.
- Torterolo P, Sampogna S, Chase MH. A restricted parabrachial pontine region is active during non-rapid eye movement sleep. *Neuroscience* 2011;190:184-93.
- Ursin R, Sterman MB. A manual for standardized scoring of sleep and waking in the adult cat. Brain Information Service/Brain Research Institute. Los Angeles 1981.
- Valatx JL, Jouvet D, Jouvet M. Evolution electroencephalographique des différents états du sommeil chez le chaton. *Electroencep Clin Neurophysiol* 1964;17:218-233.
- Vazquez J, Baghdoyan HA. GABA<sub>A</sub> receptors inhibit acetylcholine release in cat pontine reticular formation: implications for REM sleep regulation. *J Neurophysiol* 2004;92:2198-206.
- Vivaldi E, McCarley RW, Hobson JA. Evocation of desynchronized sleep signs by chemical microstimulation of the pontine brainstem. *The reticular Formation Revisited (Capitulo de Libro)* Hobson JA, Brazier MAB. Eds. New York. Raven Press 1980;pp.513-529.
- Von Economo C. Sleep as a problem of localization. *J Nerv Ment Dis* 1930;7:249-259.
- Ward DG, Grizzle WE, Gann DS. Inhibitory and facilitatory areas of the rostral pons mediating ACTH release in the cat. *Endocrinology* 1976;99:1220-1228.
- Watson CJ, Lydic R, Baghdoyan HA. Sleep duration varies as a function of glutamate and GABA in rat pontine reticular formation. *J Neurochem* 2011;118:571-580.
- Xi MC, Morales FR, Chase MH. Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by a GABAergic pontine mechanism. *J Neurophysiol* 1999;82:2015-2019.
- Xi MC, Morales FR, Chase MH. Interactions between GABAergic and cholinergic processes in the nucleus pontis oralis: neuronal mechanisms controlling active (rapid eye movement) sleep and wakefulness. *J Neurosci* 2004;24:10670-10678.
- Yamamoto K, Mamelak AN, Quattrochi J, Hobson JA. A cholinergic desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: locus of sensitive region. *Neuroscience* 1990a;39:279-293.

Yamamoto K, Mamelak AN, Quattrochi J, Hobson JA. A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: spontaneous and drug-induced neuronal activity. *Neuroscience* 1990b;39:295-304.

# ANEXO



## GABA<sub>A</sub> receptor agonist at the caudo-lateral peribrachial area suppresses ponto-geniculo-occipital waves and its related states



Ignacio Ramírez-Salado<sup>a,b,\*</sup>, Ana Paula Rivera-García<sup>b</sup>, Javier Velázquez Moctezuma<sup>c</sup>, Anabel Jiménez Anguiano<sup>c</sup>, Francisco Pellicer<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Cronobiología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370, Mexico

<sup>c</sup> Área de Neurociencias, Departamento Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, Mexico

<sup>d</sup> Laboratorio de Neurofisiología Integrativa, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 April 2014

Received in revised form 17 June 2014

Accepted 24 June 2014

Available online 8 July 2014

#### Keywords:

Caudo-lateral peribrachial area (C-PBL)

Carbachol

Muscimol

Glutamate

Ponto-geniculo-occipital waves (PGO)

Synchronized sleep with PGO waves (SP)

### ABSTRACT

**Purpose:** In order to explore the potential role of GABA, acetylcholine and glutamate in the caudo-lateral peribrachial area (C-PBL) over Rapid-Eye-Movement sleep (REM) onset and maintenance as well as on synchronized sleep with ponto-geniculo-occipital (PGO) waves (SP) in cats, a muscimol, carbachol and L-glutamate local application was performed and behavioral states were assessed.

**Methods:** Fourteen chronically implanted, adult, male cats underwent a 23 hour polysomnographic recording after 3 pharmacological manipulations: carbachol, muscimol and L-glutamate. Each cat received all three drugs randomly with a seven day interval.

**Results:** 1) Carbachol increases waking, SP and REM sleep while decreases slow wave sleep (SWS). 2) Muscimol decreases SP percentage and number while increases REM sleep onset. 3) Carbachol facilitates PGO activity and increases the latency to both SWS1 and REM sleep but enhances PGO activity while muscimol decreases it.

**Conclusions:** Acetylcholine promotes PGO related states (SP as well as REM sleep), while GABA reduces only SP and specifically PGOs.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

REM sleep is a physiological state regulated by the interaction of, among others neurotransmitters, acetylcholine (ACh) (Calvo et al., 1992; Hernandez-Peón, 1965; Jouvet, 1972; Mignot, 2008), glutamate (Clément et al., 2011; Datta et al., 1998, 2001; Kodama et al., 1998; Lu et al., 2006; Luppi et al., 2012; Sakai and Koyama, 1996) and GABA (Boissard et al., 2002; Luppi et al., 2013; Xi et al., 1999). It is well known that pontine cholinergic mechanisms play a critical role in the generation and maintenance of REM sleep (Baghdoyan et al., 1987, 1989; Datta et al., 1991; Márquez-Ruiz and Escudero, 2010; Murillo-Rodríguez et al., 2012; Pal and Mallick, 2007). Specifically,

it has been observed that the activation of regions such as the cholinergic cell compartment of the pedunculopontine tegmental nucleus (PPT) and of the laterodorsal tegmental nucleus (LDT) within the caudo-lateral peribrachial area (C-PBL) is associated to REM sleep regulation, in turn this activation is facilitated by the kainate type of glutamate receptors (Datta et al., 1991; Quattrochi et al., 1989; Sakai et al., 1990). Moreover, it should be noted that the glutamate release at the medial pontine reticular formation (mPRF) is increased during natural REM sleep as well as after its cholinergic stimulation. Thus, a bidirectional facilitation between cholinergic and glutamatergic drive is associated to REM sleep installation and maintenance at the pons. Specifically, the PPT is involved in the generation of REM sleep through cholinergic cell activation which in turn is regulated by glutamate (Datta et al., 2001; Datta and Maclean, 2007) however the role of glutamate at other pontine regions in the regulation of the sleep-waking cycle remains to be determined.

One of the most definitive physiologic signs of REM sleep, ponto-geniculo-occipital waves (PGO), appears as well in the transitional synchronized states that precede REM sleep stages (SP). Among the many REM-on cell groups, the activation of neurons in the C-PBL of predator animals such as cats generates PGO waves (Brooks and Bizzi, 1963;

**Abbreviations:** PPT, pedunculopontine tegmentum; LDT, laterodorsal tegmentum; NPO, nucleus pontis oralis; C-PBL, caudo-lateral peribrachial area; PGO, ponto-geniculo-occipital waves; REM, rapid eye movement sleep; SP, synchronized sleep with PGO waves; SWS, slow wave sleep; SWS-1, slow wave sleep 1; SWS-2, slow wave sleep 2; W, wakefulness.

\* Corresponding author at: Laboratorio de Cronobiología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370, Mexico. Tel.: +52 55 4160 5058; fax: +52 55 5655 9980.

E-mail address: [salado@imp.edu.mx](mailto:salado@imp.edu.mx) (I. Ramírez-Salado).