



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

01965
2 g.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

PEPTIDOS Y SUEÑO: EFECTOS DEL POLIPEPTIDO
VASOACTIVO INTESTINAL (VIP)
Y DEL LIQUIDO CEFALORAQUIDEO (LCR)
DE GATOS PRIVADOS DE SUEÑO SOBRE
EL INSOMNIO INDUCIDO POR PCPA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PSICOBIOLOGIA
PRESENTA
OSCAR PROSPERO GARCIA

MEXICO, D.F.

1987

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PEPTIDOS Y SUEÑO: EFECTOS DEL POLIPEPTIDO VASOACTIVO INTESTINAL
(VIP) Y DEL LIQUIDO CEFALORAQUIDEO (LCR) DE GATOS PRIVADOS DE
SUEÑO SOBRE EL INSOMNIO INDUCIDO POR PCPA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN PSICOBIOLOGIA PRESENTA

OSCAR PROSPERO GARCIA

Director de Tesis: DR. RENE RAUL DRUCKER COLIN

CONTENIDO

Resumen (español)

Introducción

La teoría colinérgica del sueño

Monoaminas y sueño

Factores inductores de sueño

- Factores sanguíneos
- El factor S
- La sustancia promotora de sueño
- Factores aislados de la orina humana
- Neuroproteínas y sueño
- Neuropeptidos y sueño MOR

Material y métodos

Resultados

Discusión y conclusiones

Bibliografía

RESUMEN

En los últimos años se ha observado que un número cada vez mayor de sustancias tienen propiedades hipnagógicas. Sin embargo, la mayoría de los llamados "factores inductores de sueño" parecen ejercer su efecto solo sobre el sueño de ondas lentas. Recientemente, ha sido demostrado que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de gatos privados de sueño por medios instrumentales puede contener un factor inductor de sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR). Concomitantemente, también se ha observado que el Polipéptido Vasoactivo Intestinal (VIP) induce un incremento en el tiempo total de sueño MOR de ratas y gatos normales. El propósito del presente trabajo es determinar si el LCR de gatos privados de sueño y el VIP son capaces de revertir el insomnio inducido por PCPA en el gato. Para su efecto se privaron de sueño durante 24 hrs a 22 gatos e inmediatamente después se les extrajo el LCR a través de una cánula previamente implantada en el 4º ventrículo.

Parte de este LCR fue calentado antes de administrarlo a los receptores. Algunos gatos donadores fueron, simultáneamente a la privación, tratados con cloranfenicol. Esto nos permitió tener 4 tipos de LCR. El LCR extraído de gatos normales (sin privar de sueño). El LCR PS extraído de gatos privados de sueño. El LCR C que era LCR PS pero calentado (94°C durante 15 min) antes de administrarlo y el LCR CAP extraído de los gatos tratados con cloranfenicol. Los gatos receptores fueron pretratados con

400 mg/kg, i.p. de PCPA durante 2 días consecutivos. Venticuatro hrs después de la segunda inyección, los gatos receptores recibieron en el 4º ventrículo 100 ul de uno de los tipos de LCR ó 200 ng de VIP/100 ul de salina. Los resultados mostraron que solamente el LCR de gatos privados de sueño y el VIP fueron capaces de restaurar el sueño MOR, en los gatos que de otra manera permanecieron insomnes. Debido a que el efecto de estas sustancias fue incrementando la frecuencia pero no la duración del sueño MOR, existe la posibilidad de que el LCR de gatos privados de sueño contenga una sustancia parecida al VIP que participe en los mecanismos de disparo de dicha fase.

INTRODUCCION

El estudio sistemático del sueño empieza con el siglo. Inicialmente los estudios se hicieron describiendo la conducta, pero los resultados eran poco consistentes. El advenimiento de la poligrafía en el estudio del sueño permitió la determinación de los diferentes estadios por los que cursa un sujeto que duerme. Esto vino a modificar la tendencia a interpretar el sueño como un estado tónico en el cual no había modificaciones. Son Aserinsky y Kleitman (1953) los que describen la desincronización del electroencefalograma (EEG) acompañada de movimientos oculares en el humano y quienes le llamaron a dicho período "sueño con movimientos oculares rápidos" (sueño MOR). La asociación posteriormente descrita entre el sueño MOR y las ensoñaciones atrajo el interés por estudiar los mecanismos involucrados en su generación y mantenimiento. En la década de los 60 surgen diversas teorías que intentan explicar los mecanismos neurofisiológicos y neuroquímicos que participan en la regulación del sueño. Ejemplos de estas teorías son la teoría colinérgica y la monoaminérgica. Una teoría originada a principios de siglo y retomada en la década de los 60 es la teoría de los factores inductores de sueño.

Revisaremos brevemente las dos primeras teorías y más ampliamente la tercera con el fin de exponer más detalladamente su desarrollo, ya que en su contexto se realizaron los experimentos que aquí se reportan.

La Teoría Colinérgica del Sueño

La acetilcolina (ACh) ha sido uno de los neurotransmisores que se han involucrado en la generación del ciclo sueño-vigilia. Los trabajos pioneros de Hernández-Peón aportaron evidencias que sugirieron la participación de la ACh en este fenómeno. Inicialmente, Hernández-Peón y cols. (1963 a,b) demostraron que la administración tópica de ACh y eserina en diferentes áreas del cerebro del gato en libre movimiento indujo sueño con una latencia aproximada de 5 min y una duración aproximada de 60 min. Tales zonas, en particular el área preóptica lateral y la formación reticular mesencefálica entre otras, forman parte del sistema límbico, por lo que sugirieron la participación de este sistema en la regulación del sueño usando como neurotransmisor a la ACh. Ulteriores trabajos (Velluti y Hernández-Peón, 1963) demostraron que la aplicación de microcristales de atropina en el área preóptica indujo insomnio después de que el gato se recuperó de los efectos de la ACh aplicada en la misma zona. Estos trabajos apoyaron la hipótesis de que la ACh estaba involucrada en la modulación del ciclo sueño-vigilia y permitieron que Hernández-Peón en 1965 postulara la existencia de un "sistema de sueño" el cual consistía de 2 componentes: un componente descendente localizado dentro del sistema límbico mesencefálico que recibía proyecciones de la corteza cerebral y del tálamo y un componente ascendente que se originaba en la médula espinal y atravesaba el bulbo raquídeo, el puente y el mesencéfalo. Ambos componentes utilizarían ACh como neurotransmisor. El autor también propuso la existencia de un sistema de vigilia, modulado

por la formación reticular mesencefálica. Algunos trabajos independientes han apoyado esta teoría. Varios reportes (Mitchell, 1961; Celesia y Jasper, 1966) habían mostrado cambios en la liberación de Ach cortical dependientes del estado conductual en el que se encontrara el sujeto. Posteriormente, Jasper y Tessier (1971) demostraron que la liberación de Ach cortical es de 2.1 ng/cm²/min en vigilia, de 2.2 ng/cm²/min durante el sueño MOR; mientras que durante el sueño lento es de 1.2 ng/cm²/min. Por otro lado, Gadea-Ciria y cols. (1973) utilizando la técnica de infusión-perfusión (Push-pull) por medio de una cánula, demostraron que la Ach incrementa sus concentraciones en el núcleo caudado del gato durante el sueño MOR. Domino y cols. (1970) aportaron datos adicionales al encontrar disminuido el tiempo total de sueño MOR del gato después de administrarle hemicolina, una sustancia que bloquea la recaptura de colina. La colina y la acetilcoenzima A son utilizados para la síntesis de Ach, por lo que su biodisponibilidad desciende con el hemicolina.

Recientemente se ha retomado la teoría de Hernández-Peón y se ha reportado que la administración tópica de carbacol (Silberman y cols., 1980) o bethanecol (Hobson y cols., 1983) en el tegmento pontino del gato restringido de movimiento incrementa la aparición y la duración del sueño MOR. Algunas observaciones no publicadas hechas en nuestro laboratorio en el gato en libre movimiento, confirman dichos hallazgos. Más recientemente, Baghdoyan y cols. (1984, 1985) han reproducido estos efectos y han agregado que la administración de carbacol en la formación

reticular bulbar y mesencefálica incrementan el estado de vigilia. Estos resultados reproducen los publicados por Hernández-Peón en 1965.

Existen datos en humanos que apoyan la hipótesis. Así, la atropina y la escopolamina retardan y reducen la aparición de sueño MOR (Toyoda y cols., 1966) y la administración de 0.5 mg i.v. de fisostigmina en voluntarios sanos incrementa su duración y el reporte de ensueños (Sitaram y col., 1978).

Monoaminas y Sueño

Jouvet y cols (1959 a,b, 1961) describieron la presencia de atonía muscular durante la fase de sueño con movimientos oculares rápidos (MOR) en el gato. A partir de esta descripción inicial de la fase de sueño MOR - que ellos llamaron "sueño paradójico"- utilizaron diferentes técnicas como lesión, manipulación farmacológica y registro, con el fin de esclarecer los mecanismos que subyacen a la aparición del sueño lento y el sueño MOR.

Jouvet (ver 1969) utilizó la paraclorofenilalanina (PCPA) con el fin de analizar la participación de la serotonina en el sueño en el gato. Algunos reportes previos habían descrito las propiedades inductoras de insomnio de esta sustancia (Delorme y cols., 1966; Koella y cols., 1968). Previamente Koe y Weissman (1966) habían descrito una potente y selectiva inhibición de la hidroxilasa del triptofano y, en consecuencia, de la síntesis de serotonina por la PCPA.

Jouvet (1969) hizo un seguimiento de la conducta y los cambios poligráficos que presentaron los gatos después de la administración de 400 mg/kg i.p. de PCPA. En las primeras 24 hrs.

no encontraron variaciones en la conducta ni en los registros; sin embargo, después de este período, hay una abrupta caída en la incidencia de sueño lento, así como de sueño MOR. Treinta horas después se instala un insomnio total con una duración media de 70 hrs, acompañado de una persistente aparición de espigas ponto-genículo-occipitales (PGO). Después de este período empiezan a reaparecer ambas fases de manera breve y discreta hasta que, alrededor de 200 horas después, las características del ciclo sueño-vigilia son prácticamente normales. Concomitante al insomnio, demostraron que hay un decremento importante de la biodisponibilidad de serotonina (95%) por lo que sugirieron que el insomnio es consecuencia de la baja concentración de este neurotransmisor.

Para apoyar esta posibilidad, administraron 5-hidroxitriptofano (5-HTP) precursor directo de la serotonina, cuando el gato estaba en el pico máximo del insomnio. La idea era aportar el precursor necesario para la síntesis de serotonina, ya que la vía de síntesis natural estaba bloqueada por la PCPA. En consecuencia, el resultado esperado era la recuperación del sueño. Este efecto pudo observarse de 6 a 10 hrs después de que se administró vía sistémica (i.v. ó i.p.) el 5-HTP. La latencia del sueño MOR fue mucho mayor.

Por otro lado, utilizando la técnica de cirugía estereotáxica Jouvét y cols. (1966) lesionaron los núcleos del sistema del rafé en los cuales se concentran la mayor cantidad de cuerpos neuronales de los sistemas cerebrales serotoninérgicos (Dalstrom y Fuxe, 1964). Los animales fueron registrados durante

10 a 13 días consecutivos a la lesión.

En los gatos en los que se comprobó una destrucción del 80-90% del sistema del rafé por histología, se presentó un estado de insomnio electroencefalográfico y conductual durante 3-4 días post lesión. Cuando la lesión fue menor, el insomnio duró sólo los 2 primeros días. Si la lesión era circunscrita a la región rostral del sistema del rafé, los animales presentaron períodos que los autores equipararon a la narcolepsia, ya que pasaban de la vigilia al sueño MOR. Finalmente, la destrucción del 15% ó menos del rafé no modificó el sueño.

Por otra parte, el mismo grupo hizo una serie de experimentos en los cuales administraron 0.5 mg/kg de reserpina en el gato (Delorme y cols., 1965) y reprodujeron el estado de quietud que otros investigadores ya habían reportado (Brodie y cols., 1966). La aparición de sueño lento se suprimió durante 12 hrs, y la de sueño MOR por 24 hrs., al mismo tiempo que se indujo un incremento considerable de espigas PGO. En este caso lograron inducir la reaparición de sueño MOR administrando 1-dihidroxfenilalanina (1-DOPA), precursor de la noradrenalina (NA). Por otra parte, también había sido demostrado que la administración de nialamida, inhibidor de la monoaminooxidasa (MAO), una enzima catabólica de monoaminas, inhibe selectivamente la aparición de sueño MOR. Este efecto pudo ser relacionado con una disminución de la concentración de la MAO en el núcleo Locus Coeruleus (LC). En trabajos posteriores Jouvét y cols. (1965) demostraron que la lesión bilateral de este núcleo produjo una total y selectiva supresión del sueño MOR.

Con estos resultados, Jouvét dió por sentado que la

disminución de la serotonina por inhibición farmacológica (PCPA) o por lesión de los núcleos del raquí indujo la disminución del sueño lento ya que además, la administración de 5-HTP produjo su reaparición. Por el otro lado, ya que la depleción de monoaminas cerebrales por reserpina y la lesión bilateral del LC indujo desaparición del sueño MOR y de que la administración de dihidroxifenilalanina produjo su reaparición. Jouvét postuló en 1969 que los núcleos del LC, utilizando a la NA como neurotransmisor, regulaban el sueño MOR.

A pesar de esta evidencia, colateralmente se generaron una serie de experimentos que no apoyaron la hipótesis de Jouvét. Rechtschaffen y cols. (1973) reportaron que la administración de PCPA a ratas solo indujo un moderado decremento del sueño total, a pesar de tener depletado más del 90% de la serotonina cerebral. Dement y cols. (1973) encontraron resultados semejantes al administrar crónicamente PCPA a una serie de gatos durante un mínimo de 6 días continuos y un máximo de 37. Los estudios bioquímicos hechos por este grupo (Henriksen y cols., 1971) habían demostrado que al 5º día de tratamiento los niveles de serotonina estaban muy bajos, manteniéndose así a lo largo del tratamiento. Estos animales tuvieron un ciclo sueño-vigilia prácticamente normal a partir del séptimo día de tratamiento cuando los niveles de serotonina estaban en sus más bajas concentraciones.

Por otro lado, se demostró (Mc Ginty, Harper y Fairbanks 1976; Puizillout y cols., 1979; Cespuglio y cols., 1981) que la actividad unitaria de las neuronas del raquí y la liberación de

serotonina son altas durante la vigilia y disminuyen progresivamente en el sueño lento y el sueño MOR.

Estas evidencias son difíciles de conciliar con la teoría original, lo que ha obligado al autor a modificarla sustancialmente. Sallanon y col. (1983, 1985) recientemente han sugerido que es probable que la participación de la serotonina en el sueño no sea como un neurotransmisor clásico, sino como una neurohormona. De esta manera, la serotonina sería liberada durante la vigilia y actuaría como una neurohormona induciendo la síntesis o liberación de un factor o factores inductores de sueño, el cual secundariamente sería el responsable de que se presente el sueño lento y el sueño MOR.

Factores Inductores de Sueño

En 1913, Pierón y cols., demostraron que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de perros privados de sueño, inducía sueño en perros normales. A partir de estos experimentos, Pierón sugirió que la vigilia induce la acumulación de una "hipnotoxina" responsable de la producción del sueño.

A pesar de lo importante de este hallazgo, pocos autores trataron de reproducirlo. En 1939, Schnedorf e Ivy reportaron que los resultados no se reproducían, ya que solo 9 de 24 de los perros que recibieron el LCR durmieron.

A pesar de estas diferencias, en la década de los 60's la idea de factores humorales inductores de sueño es retomada por varios investigadores quienes tratan de determinar su presencia en el torrente circulatorio, en el LCR ó el parénquima cerebral.

Factores de sueño sanguíneos

Monnier y cols. (1963) estudiaron exhaustivamente la presencia de sustancias inductoras de sueño en el sistema circulatorio. El modelo utilizado consistió en anastomosar la vena yugular de un conejo donador y la de un conejo receptor. Ambos conejos tenían implantados electrodos para registro del electroencefalograma (EEG). El conejo donador tenía además un electrodo implantado en los núcleos intralaminares del tálamo y fue estimulado con pulsos de baja frecuencia (6 Hz) y alta intensidad (0.7 v). Esta estimulación indujo sincronización del EEG, lo que Monnier llamó "sueño delta ortodoxo", en ambos sujetos. Debido a que los conejos estaban conectados por medio de la vena yugular, se supuso que en consecuencia a la estimulación talámica, el cerebro del donador había liberado una sustancia que por medio del torrente circulatorio llegó al cerebro del conejo receptor e indujo sincronización del EEG. Estos resultados fueron reproducidos en ratas parabióticas (Matsumoto y cols., 1972).

El siguiente paso fue dializar los factores de la sangre venosa. Monnier y Hosli (1964, 1965) reportaron que el dializado obtenido de la sangre de un conejo dormido era capaz de inducir sueño en un conejo despierto cuando se administraba vía endovenosa y posteriormente observaron que la administración intraventricular producía resultados semejantes (Monnier y Hatt, 1971; 1972).

Habiendo demostrado las propiedades inductoras de este dializado, Monnier (1972; 1973; 1977) caracterizaron y aislaron

el principio activo, un nonapéptido con un peso molecular de 849, el cual induce sueño de ondas lentas cuando se administra en el 3er. ventrículo de conejos. A este factor lo bautizaron con el nombre de péptido inductor de sueño delta cuyas siglas en inglés son DSIP.

A pesar de que actualmente dicho péptido está disponible en el comercio y se ha empleado en diversas condiciones experimentales y con fines terapéuticos, existen varios reportes que no apoyan la efectividad que supuestamente tiene. Tobler y Borbely (1980) evaluaron la actividad locomotora de la rata y el tiempo que pasó en sueño después de la administración del DSIP y no encontraron cambios significativos en relación a los controles. Otros autores han reportado hallazgos semejantes (Mendelson y cols, 1980).

El Factor S

En un proyecto que podría considerarse la más directa continuación de las observaciones de Pierón se reportó que el LCR de cabras privadas de sueño inducía sueño en ratas normales. Inicialmente Pappenheimer y cols., (1967) estudiaron cabras implantadas con un tubo en la cisterna magna, las cuales fueron privadas de sueño durante 24, 48 y 72 hrs. por medio de choques eléctricos y alarmas acústicas que se ponían en marcha cuando el animal se relajaba. Al final del periodo de privación se extrajo LCR a una velocidad de 100 ul/min durante 5 hrs.

El LCR de estas cabras y de otras que no se privaron de sueño se administró en los ventrículos laterales de ratas,

crónica y previamente implantadas, a una velocidad de 3.3 ul/min 30 min en un volumen total de 100 ul. La actividad locomotora se evaluó constantemente mediante fotoceldas conectadas a contadores automáticos. Los resultados mostraron que el LCR de cabras privadas de sueño redujo la actividad locomotora de las ratas por varias horas mientras que el LCR de cabras normales no tuvo ningún efecto.

Este trabajo no incluyó la evaluación electrofisiológica. En 1971 el grupo de Pappenheimer reporta que el LCR de cabras privadas de sueño reduce la actividad locomotora de la rata al mismo tiempo que incrementa la sincronización del EEG (FencI y col. 1971). Nuevamente, el siguiente paso fue tratar de separar el principio activo del LCR. Se hizo cromatografía en Sefadex G-10 y reacción con fluorescamina y se incubó con pronasa, la cual destruyó su actividad biológica. Todo ello llevó a Pappenheimer a sugerir que se trataba de un oligopéptido de menos de 500 daltones.

En 1982, Krueger y Pappenheimer reportan que el factor S puede tratarse de un pequeño glucopéptido. Los glucopéptidos son subunidades del péptidoglicano, que a su vez es un componente estructural de la pared de bacterias o plantas pero no de las células de mamífero y que genéricamente son llamados péptidos muramil.

A partir de estos hallazgos Krueger y cols. (1985a, 1985b) prueban una serie de péptidos muramil, sugiriendo que el muramil dipéptido (MDP) es el más poderoso para inducir sueño lento. Sin embargo, se necesita alrededor de 10 veces mayor concentración del MDP para igualar los efectos del factor S. Al mismo tiempo

que el MDP incrementa la cantidad de sueño lento, se decrementa la de sueño MOR, al menos durante 6 hrs. después de su administración. Uno de los problemas es que el MDP incrementa la temperatura corporal y estimula la respuesta inmunológica.

Por otra parte, los estudios de microinyección cerebral del factor S en conejos, han sugerido que el sitio de acción podría encontrarse entre la unión del cerebro basal anterior y el mesodiencefalo incluyendo partes del hipotálamo y del subtálamo (García-Arrarás y Pappenheimer, 1983).

El MDP se ha obtenido de la orina del humano, y se supone que puede ser aportado por las bacterias normales de la uretra (Krueger y Pappenheimer, 1982). Sin embargo, se ha pretendido sostener que el aporte necesario de factor S para inducir el sueño cotidiano es suministrado por la flora natural del organismo; por lo que, en sujetos de avanzada edad cuya flora se encuentra disminuida, se presentan alteraciones del sueño.

Sustancia Promotora de Sueño (SPS)

Influidos por el concepto de la hipnotoxina de Piéron, Nagasaki y cols. (1974) privaron de sueño a 1000 ratas durante 24 hrs. aplicándoles un choque eléctrico cuando intentaban dormir. Al final de la privación las ratas fueron sacrificadas, los tallos cerebrales se separaron, homogenizaron, dializaron y liofilizaron. Posteriormente este extracto fue inyectado intraperitonealmente en ratas normales. Los resultados mostraron un decremento de la actividad locomotora y un incremento de la actividad de alto voltaje del EEG, así como del sueño lento.

Estos datos confirmaron las observaciones hechas por Drucker-Colín y col. (1970) y Drucker-Colín (1973) mediante el uso de una cánula push-pull en la formación reticular mesencefálica de gatos normales. El perfusado de gatos privados de sueño inducía sueño cuando se inyectaba en regiones homólogas de receptores. El grupo japonés mostró después que cuando se administra en el 3er. ventrículo incrementa en un 50% el SL durante la fase de oscuridad, y 20% en el segundo día, pero no lo modifica durante el periodo de luz. Por otro lado, el sueño MOR sólo se incrementa durante el segundo día durante la fase de oscuridad (Inoue y cols., 1983).

La SPS también tiene efectos en ratones, cuando se administra intraperitonealmente, presentándose nuevamente un efecto tardío sobre el sueño MOR (Nagasaki y cols., 1980). Se ha intentado caracterizar bioquímicamente a la SPS purificando parcialmente por sefadex G-10 y cromatografía de capa delgada. Tiene un peso molecular de 500 daltones parecido al del factor S, y produce inhibición de la descarga espontánea del ganglio abdominal del cangrejo de río (Acocil). Este efecto inhibitorio fue 100 veces mayor al obtenido con GABA; los autores sugieren que el SPS es una sustancia de índole proteínica con poderosas propiedades inhibitorias.

Más recientemente, utilizando un sistema de evitación pasiva, Inoue y cols. (1985) privaron de sueño a 500 ratas adultas durante 24 hrs. Al final de este periodo las sacrificaron y les extrajeron el tallo cerebral, lo homogeneizaron y lo dializaron. El dializado mostró tener al

menos 4 compuestos capaces de inducir sueño, a los cuales les llamaron SPS-A-1, SPS-A-2, SPS-B y SPS-X. Este último ya se ha demostrado que se trata de la uridina.

Factores Aislados de la Orina Humana

Varios investigadores han descrito las propiedades hipnogénicas de diferentes sustancias extraídas de la orina del humano y probadas en animales de experimentación. Ursin y cols. (1984) han reportado la existencia de factores inductores de sueño de índole protéica extraídos de la orina de hombres privados de sueño y han logrado aislar 3 péptidos por medio de columnas de cromatografía, Sefadex G 25 y geles P-2 y Fractogel.

Estas sustancias fueron administradas intracerebro-ventricularmente (IVT) a ratas, produciéndose un incremento significativo en el tiempo total de sueño y sueño MOR comparado a los controles.

Por otro lado, Krueger y cols. (1982) han extraído de la orina de humanos adultos jóvenes una sustancia que proponen que sea el muramil dipéptido con propiedades inductoras de sueño.

Neuroproteínas y Sueño MOR.

A fines de la década de los 60, se sugirió que el rebote de sueño MOR que presenta un sujeto durante la abstinencia a la administración crónica de algunas drogas, refleja una fase de "reparación" neuronal acompañado por un incremento en la síntesis de proteínas cerebrales (Oswald, 1969). En consecuencia, el incremento en las proteínas cerebrales debería facilitar la aparición del sueño MOR.

En este contexto se ha reportado (Takahashi, 1968; Sassin, 1977) que a las fases 3 y 4 de sueño lento del humano, están asociadas con un pico de liberación plasmática de hormona del crecimiento (HC). Debido a que en el humano la liberación de HC durante el sueño ocurre en la primera parte de la noche, antes de que se presente el sueño MOR, se ha sugerido que pudiese tener un papel importante en los mecanismos de disparo de esta fase. Dicha hipótesis ha sido indirectamente confirmada ya que la administración de HC a gatos (Stern y cols., 1975) y ratas (Drucker-Colín y cols., 1975), induce sueño MOR en forma dosis-dependiente a la tercera hora después de su administración. Ulteriormente estos resultados han sido reproducidos en humanos (Mendelson, 1980).

Como la HC es una hormona anabólica que facilita la síntesis de proteínas (Korner, 1965), pudiera suponerse que el incremento del sueño MOR inducido por la hormona es un efecto indirecto mediado por la neoformación de proteínas.

Por otra lado, durante el periodo de recuperación después de la administración de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas (Stern y cols., 1972), se observa un aumento de la fase de sueño MOR. Esto fue interpretado por los autores como debido a un aumento en la síntesis de proteínas durante la recuperación. Más recientemente, se ha observado que la administración de otros inhibidores como la anisomicina o el cloranfenicol disminuye específicamente el sueño MOR en ratas (Rojas-Ramírez y cols., 1977) y en gatos (Drucker-Colín y cols., 1979). Estos resultados han sido confirmados por Petitjean y

col. (1979). Resulta importante señalar que en estos estudios el SL no se modifica, excepto cuando los fármacos fueron administrados en dosis altas y que la disminución de sueño MOR fue causada por reducción en la frecuencia y no en la duración de los periodos de sueño MOR (Drucker-Colín y cols., 1979; Rojas-Ramírez y cols., 1977).

Estos resultados sugieren que cierto tipo de proteínas están involucradas en los mecanismos de disparo del sueño MOR. Dicha posibilidad fue probada determinando los efectos del cloranfenicol (CAP) sobre el efecto de rebote de sueño MOR inducido por privación mecánica de sueño o por la administración crónica de anfetamina. En los experimentos de privación mecánica, los gatos fueron privados de sueño durante 72 horas y el periodo de recuperación estudiado a intervalos de 12 hrs, durante 36 hrs consecutivas, bajo los efectos del CAP o de solución salina. El CAP bloqueó el efecto de rebote de sueño MOR que ocurre normalmente después de la privación de sueño. Nuevamente se pudo observar que fue la frecuencia y no la duración de esta fase la afectada, lo cual apoya la idea de que el cloranfenicol afecta los mecanismos de disparo del sueño MOR (Espejel, 1980).

En otros experimentos (Drucker-Colín y Benítez, 1977) se obtuvieron registros basales del ciclo vigilia-sueño en 12 ratas. Ulteriormente se les administró 10 mg/kg de anfetamina durante 15 días. Durante este periodo se registró el sueño durante los días 1, 7 y 15. Al final del 15º día las ratas se dividieron en 2 grupos iguales. A uno se les administró solución salina y al otro 100 mg/kg de CAP. Los resultados mostraron que durante el

periodo de abstinencia a la anfetamina, se bloqueó el rebote de sueño MOR sólo en el grupo que recibió CAP.

Neuropéptidos y Sueño MOR

Las sustancias endógenas con propiedades hipnóticas que hemos mencionado han demostrado tener efectos primordiales sobre el sueño lento y mínimos sobre el sueño MOR. Sin embargo, en base a los experimentos con inhibidores de la síntesis de proteínas se puede inferir que pudiera haber sustancias de naturaleza peptídica que afectan selectivamente al sueño MOR.

Entre una serie de péptidos, tales como angiotensina II, renina, sustancia P, arginina, vasotocina, colecistocinina, beta endorfina, met y leu-encefalina, y el péptido vasoactivo intestinal (VIP) sólo este último afectó el sueño y particularmente el sueño MOR en ratas (Riou y col. 1982 a,b,c). Estos efectos han sido recientemente confirmados en gatos (Drucker-Colín y col. 1984), y además se ha demostrado que el efecto sobre MOR es independiente de sus efectos sobre la temperatura (Obal y col., 1985).

Posiblemente la ausencia tan notable de efectos sobre sueño de una gran cantidad de péptidos, puede deberse al hecho de que la mayoría de los estudios se llevan a cabo en animales cuyas necesidades de sueño son normalmente satisfechas. Inoué y cols. (1985) han demostrado que una misma sustancia tiene diferentes efectos dependiendo de si se administra de día o de noche. Por ejemplo, la uridina y la Prostaglandina D₂ no aumentan el sueño durante el día, pero durante la noche tienen efectos muy

notables. Hallazgos semejantes han sido reportados para la S-adenosil-1-homocisteina (Sarda y cols., 1982). En base a estas observaciones, el grupo japonés sugiere que los posibles factores de sueño deberían ser probados siempre que el sueño no predomina; es decir, que los requerimientos de sueño están satisfechos o que el sujeto está insomne.

La importancia de esta consideración se ha hecho patente ya que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de gatos privados de sueño es capaz de revertir el insomnio producido por la paraclorofenilalanina (PCPA), particularmente del sueño MOR (Sallanon y col., 1982). Estas observaciones se han replicado en ratas insomnes por propranolol (Adrien y Dugovic, 1984). A partir de esta breve revisión se puede concluir que es evidente que a la fenomenología del sueño subyace una serie de eventos neuroquímicos cuya complejidad es alta. Los estudios reseñados en esta introducción sugieren la participación de algunos neurotransmisores en la generación o regulación del sueño. Asimismo, parece clara la participación de péptidos y de sustancias de otra índole bioquímica, como son la uridina y la prostaglandina D_2 , en la modulación del sueño de ondas lentas. Sin embargo, en cuanto al sueño MOR, la información disponible es escasa y poco concluyente, por lo que es necesario diseñar nuevos experimentos que incrementen dicho conocimiento. En concordancia con lo anterior, los experimentos que aquí se refieren tienen el objetivo de determinar la existencia de factores inductores de sueño MOR en el líquido cefalorraquídeo del gato privado de sueño, obtener información acerca de su índole bioquímica y determinar las probables similitudes que existan entre el efecto inducido

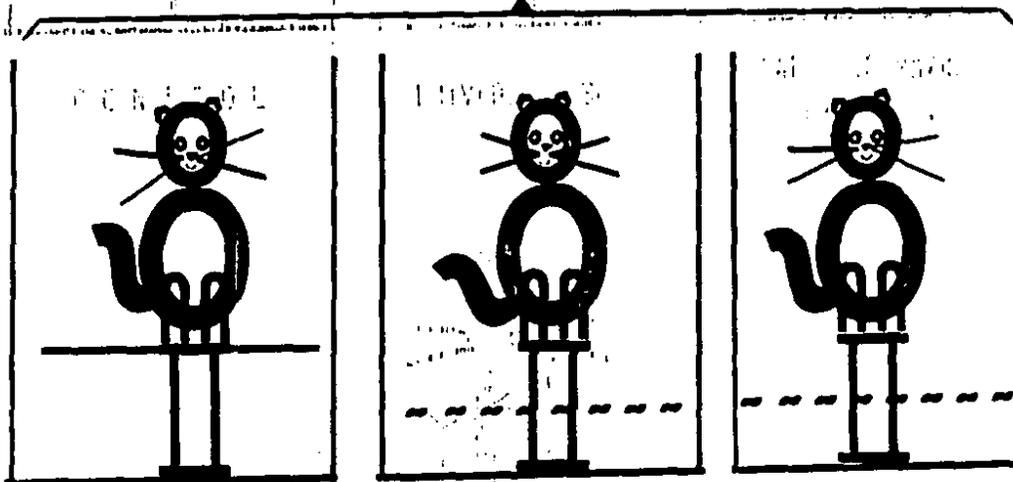
por el LCR de gatos privados de sueño y el VIP en el gato insomne por PCPA.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 52 gatos adultos de ambos sexos con un peso corporal entre 2 y 4 Kg. Veintidós de estos gatos fueron utilizados como donadores de LCR y treinta como receptores. Todos los gatos fueron estereotáxicamente implantados con una cánula de acero inoxidable (calibre 21) en el IV ventrículo. Todos los gatos receptores fueron además implantados con electrodos para registro convencional del ciclo sueño-vigilia. Esto incluyó electrodos tripolares en el cuerpo geniculado lateral (CGL), electrodos de tornillo en los huesos parietales para el registro del EEG y sobre el canto externo de la órbita para el registro de movimientos oculares y además, electrodos de alambre en las masas musculares de la nuca para el registro del electromiograma. La cirugía se llevó a cabo bajo los efectos de pentobarbital y se permitió que los gatos se recuperaran durante 7 días. Después de la recuperación, 17 de los gatos donadores fueron privados de sueño durante 24 hrs. por el método del tanque que consiste en colocar al gato sobre un pedestal cuadrado, de 11 cm por lado y 30 cm. de altura. El pedestal está dentro de un tanque que tiene un nivel de agua de 10 cm. (Ver fig. 1). Dado que el sueño se acompaña de hipotonía, los animales no duermen para evitar caer al agua. Este método se ha criticado porque entraña la posibilidad de que induzca la liberación de sustancias relacionadas al estrés, las cuales pueden alcanzar el LCR e

METODO UTILIZADO EN AMBOS GRUPOS

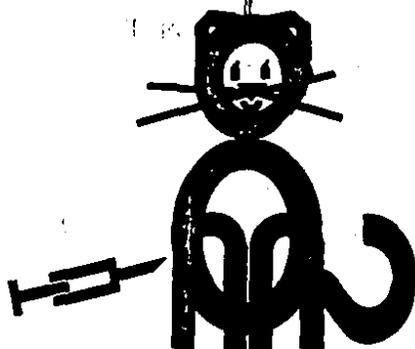
	DONADORES	RECEPTORES
N	22	30
PREPARACIÓN (IMPLANTACIÓN)	CÁNULA 4º VENTRÍCULO	CÁNULA 4º VENTRÍCULO Y ELECTRODOS PARA REGIS- TRAR SUEÑO.
PROCEDIMIENTO 1	PRIVACIÓN DE SUEÑO (24 HRS) (N=17) ESTANCIA EN EL TANQUE EN UN PEDESTAL GRANDE (NO HAY PRIVACIÓN DE SUEÑO) (N=5)	400 MG/KG. I.P. DE PARACHLOROFENILALANINA 2 INYECCIONES ESPACIA- DAS POR 24 HRS.
PROCEDIMIENTO 2	EXTRACCIÓN DE LCR A LAS 24 HRS. A) PRIVACIÓN (LCR PS) B) PRIVACIÓN + BAÑO MARÍA (LCR C) C) PRIVACIÓN + CAP (LCR CAP) D) SIN PRIVAR (LCR N)	6 GRUPOS (N=5) RECIBEN ICV 200 µL DE: LOS 4 DIFERENTES LCR. 1 GRUPO VIP (200 NG) 1 SIN INYECTAR
PROCEDIMIENTO 3		REGISTRO DE SUEÑO DURANTE 8 HORAS



CONTROL

PRIVADO DE SUEÑO

CAP 150 MG/KG
C/12 HRS.



PCPA

400 MG/KG/DÍA, I.P.

recibieron intraventricularmente (IVT) cualquiera de los LCR mencionados, o 200 ng de VIP. Los volúmenes totales inyectados fueron 100 μ l a una velocidad aproximada de 20 μ l/min. Un sexto grupo no recibió ninguna inyección IVT, con el fin de evaluar los efectos de la PCPA por sí misma. Inmediatamente después de la inyección IVT (Ver Tabla 1). Todos los gatos fueron registrados poligráficamente durante 8 hrs. (09:50 - 17:15 hrs \pm 15 min).

Los polisomnogramas fueron evaluados visualmente de acuerdo a los criterios estándares para hacer el diagnóstico de tres estados en el ciclo sueño-vigilia: vigilia (V); sueño lento (SL) y sueño con movimientos oculares rápidos (MOR).

Se utilizó una computadora marca Apple II C para obtener el tiempo total en minutos y el porcentaje de cada una de estas fases y también para determinar la frecuencia y duración individual de los períodos de sueño MOR.

Se hizo una prueba de Barlett con el fin de determinar la homogeneidad de las varianzas. Si esta prueba era positiva se procedió a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia y ulteriormente se aplicó una prueba de Scheffé (Scheffé, 1953) para comparaciones múltiples con el fin de determinar los grupos que contribuyeron a las diferencias. Una prueba de Chi-cuadrada fue hecha para los valores de las frecuencias de sueño MOR.

De los 30 gatos receptores, 10 fueron poligráficamente registrados antes de someterlos a cualquier tratamiento con el fin de obtener valores control de los parámetros estudiados. Los valores obtenidos en estos animales fueron comparados con los

valores obtenidos del grupo 6 de receptores (bajo el exclusivo efecto de la PCPA) por medio de una prueba de t-student.

RESULTADOS

Como puede apreciarse en la Tabla 2, la PCPA induce una supresión casi total de sueño MOR y muy bajos niveles de SL cuando se compara con los controles ($t = 8.13$ $p < 0.001$ para el sueño MOR y $t = 2.23$ $p < 0.05$ para el SL). Los gatos estuvieron insomnes de la hora 48 a la 56 después de la 2a. inyección de PCPA, pasando aproximadamente el 80% del tiempo en vigilia. En la Figura 2 pueden verse los hipnogramas típicos de un gato de cada grupo.

En la Tabla 2 también se puede ver que la administración de LCR N, LCR C y LCR CAP no modificó el insomnio inducido por PCPA. Por otro lado, el LCR PS y el VIP produjeron un aumento en la cantidad de SL y sueño MOR (Ver Figuras 3 y 4). El análisis de varianza, sin embargo, mostró significancia para el sueño MOR ($F(5.29); 20.03$, $p < 0.001$) pero no para el SL. La ausencia de un incremento significativo en la duración del SL, a pesar de la evidente tendencia a ello (Ver Fig. 3), es probablemente debido a una gran variabilidad en los grupos, como demuestran los valores del error estandar. Por su parte, la prueba de Scheffé para comparaciones múltiples indicó que la significancia era atribuible a los grupos que recibieron LCR PS y VIP ($p < 0.01$). El efecto de estas sustancias es evidente en las Figs. 2 y 4.

Otra observación importante fue que el incremento significativo del sueño MOR debido a la administración de VIP o

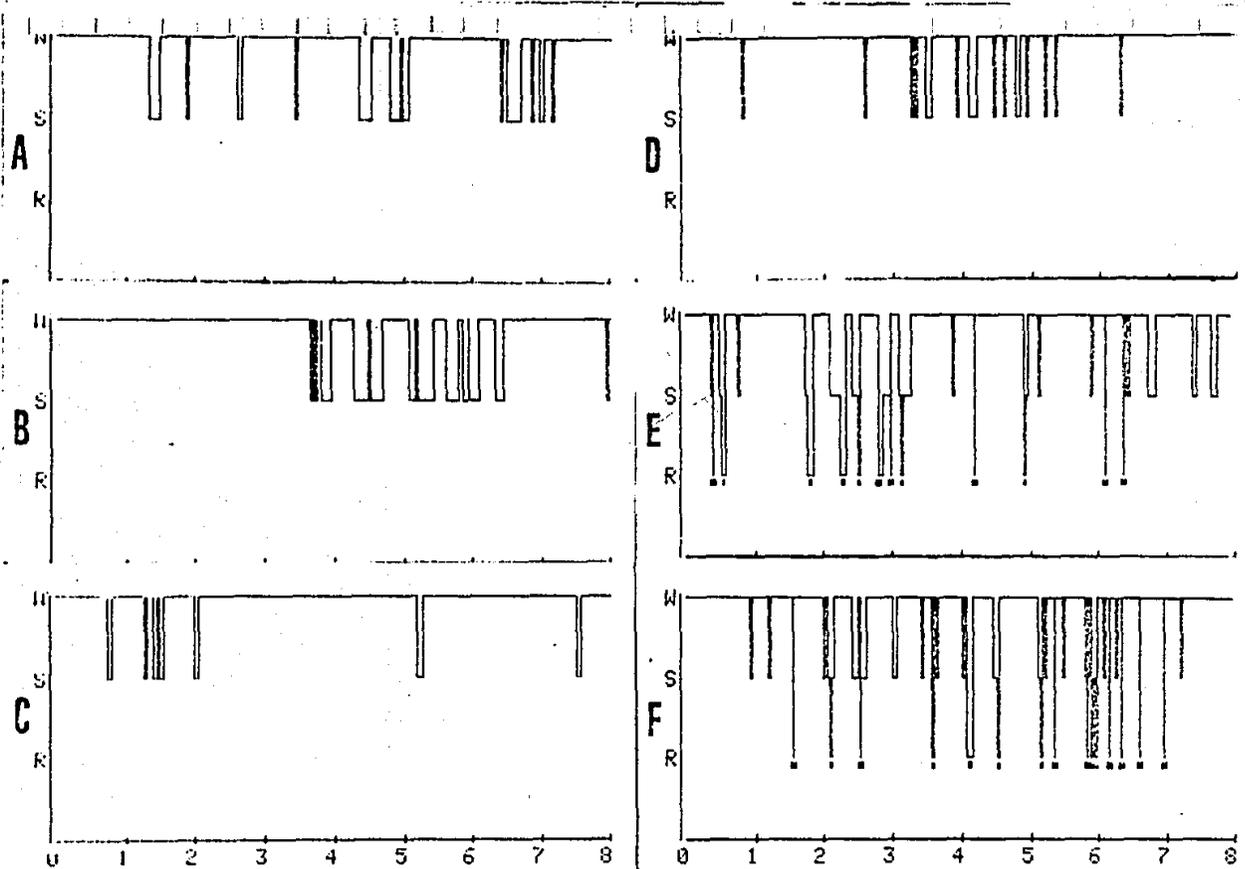


FIG. 1. EN ESTA FIGURA SE ILUSTRAN HIPNOGRAMAS DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA DE LOS GATOS, DURANTE 8 HRS. (24 HRS. DESPUÉS DE LA 2ª. INYECCIÓN DE PCPA): A. EFECTOS DE LA PCPA SIN NINGUNA EMANIPULACIÓN ADICIONAL; B. EFECTOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 100 μ L IVT DE LCR DE GATOS SIN PRIVAR DE SUEÑO (LCR N); C. EFECTOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 100 μ L IVT DE LCR CALENTADO, EXTRAÍDO DE DONADORES PRIVADOS DE SUEÑO (LCR); D. EFECTOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 100 μ L IVT DE LCR DE GATOS PRIVADOS DE SUEÑO Y SIMULTANEAMENTE TRATADOS CON CLORANFENICOL (LCR CAP); E. EFECTOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 100 μ L DE LCR DE GATOS PRIVADOS DE SUEÑO (LCR PS); F. EFECTOS DE 200 NG/100 μ L DE VIP.

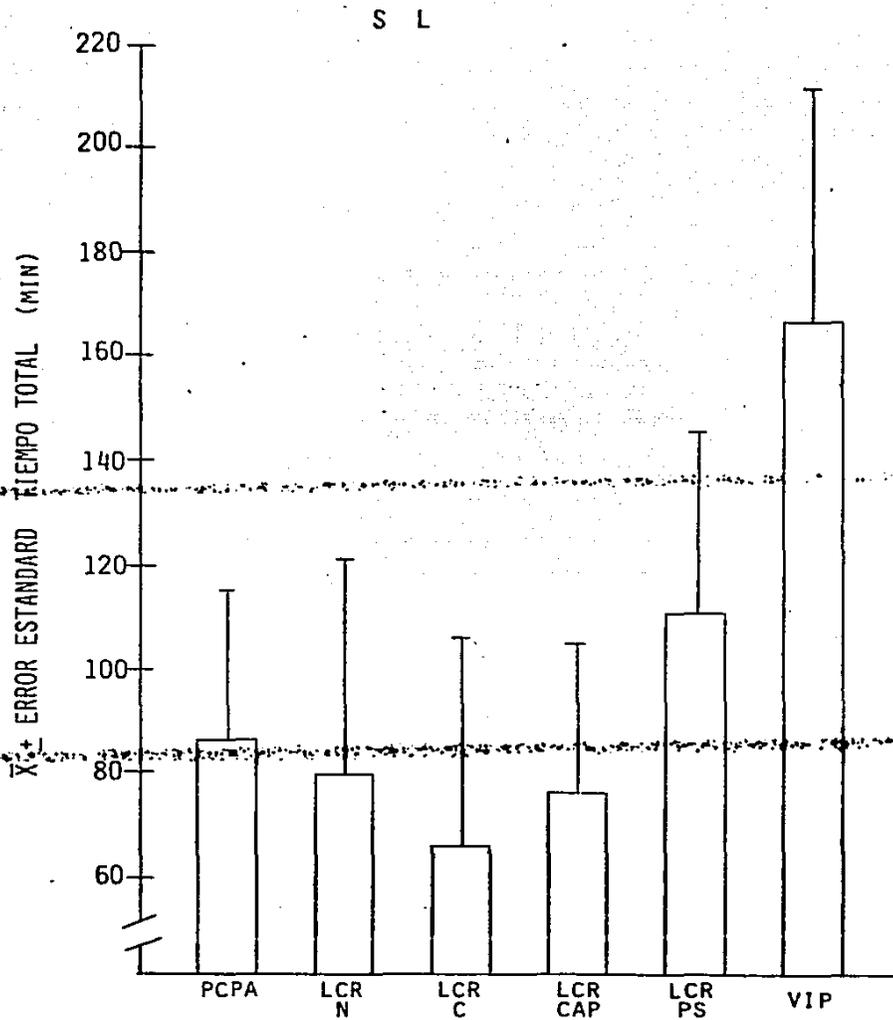


FIG. 2. EN ESTE HISTOGRAMA SE MUESTRA EL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS ANTES MENCIONADOS SOBRE LA DURACION MEDIA DEL SUEÑO LENTO.

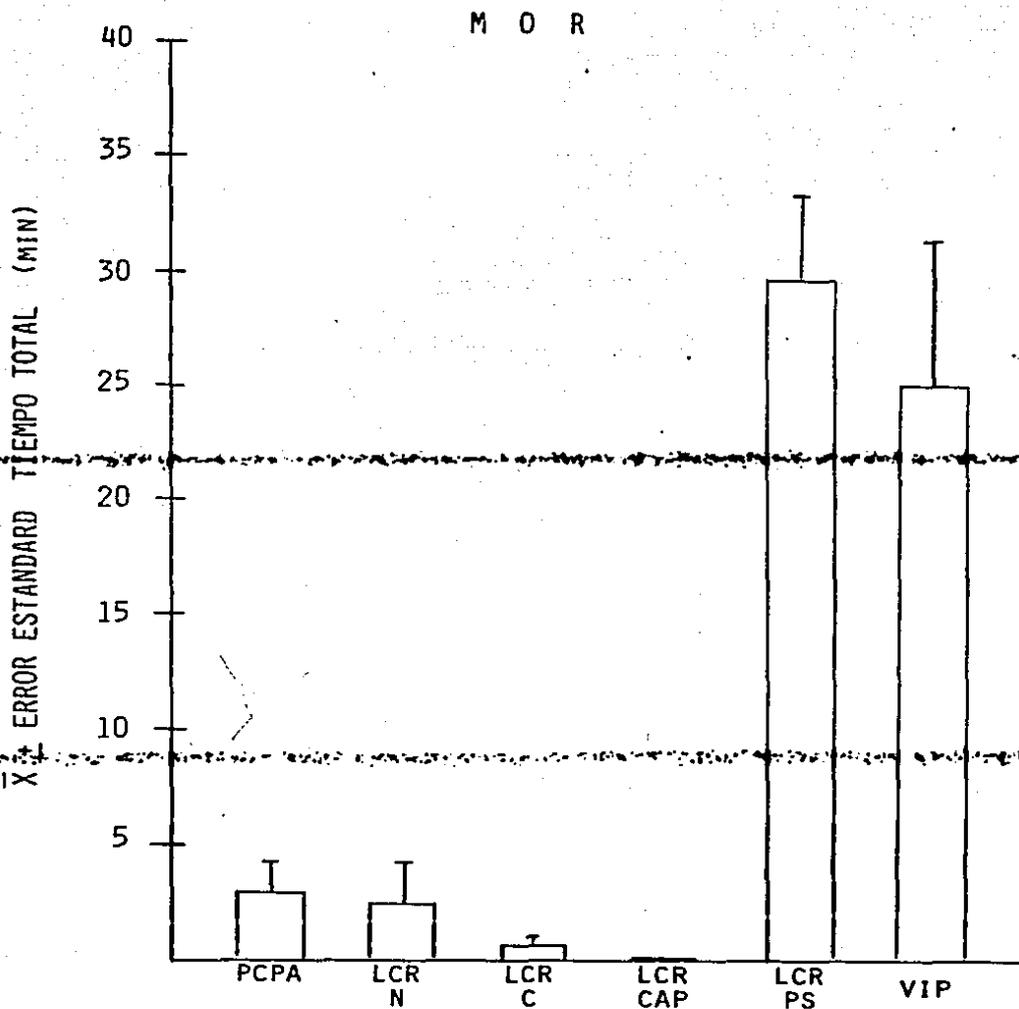


FIG. 3. EN ESTE HISTOGRAMA SE MUESTRA EL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS MENCIONADOS SOBRE LA DURACION MEDIA DEL SUEÑO MOR. OBSERVE LOS EFECTOS SIGNIFICATIVOS DEL LCR PS Y EL VIP SOBRE ESTA FASE ($P < 0.01$)

TABLA 2

EFFECTOS DEL VIP Y DE DIFERENTES LCR SOBRE PARAMETROS DE SUEÑO
DE GATOS INSOMNES PRE TRATADOS CON PCPA

	VIGILIA (min)	SL (min)	MOR (min)	DURACION DE MOR (min)	FRECUENCIA DE MOR (min)	LATENCIA DE MOR (min)
CONTROL NORMAL (n=10)	249 ± 29	171 ± 26	60 ± 4.8	6.2 ± 0.5	9.8 ± 1	51 ± 19
CONTROL PCPA (n= 5)	391 ± 33	86.2 ± 34	2.8 ± 1.4	1.5 ± 0.8	1.2 ± 0.6	270 ± 213
GATOS RECEPTORES DE LCR N (n= 5)	398 ± 31	79.5 ± 35	2.5 ± 1.8	0.9 ± 0.7	1.4 ± 0.6	333 ± 134
GATOS RECEPTORES DE LCR C (n= 5)	414 ± 40	65.5 ± 40	0.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1	2.2 ± 1.9	380 ± 204
GATOS RECEPTORES DE LCR CAP(n=5)	405 ± 29	75 ± 29	0	0	0	480
GATOS RECEPTORES DE LCR PS (n= 5)	342 ± 38	110 ± 35.5	28 ± 2.3 *	1.8 ± 0.3	18.6 ± 8	139 ± 100
GATOS RECEPTORES DE VIP (n = 5)	288 ± 50	167 ± 45	25 ± 7 *	2.3 ± 0.9	12.2 ± 2.1	111 ± 76

* CSF SD VS CONTROL PCPA p < 0.01
VIP VS CONTROL PCPA p < 0.01

** CSF SD VS NORMAL CONTROL p < 0.001
VIP VS NORMAL CONTROL p < 0.01

EN ESTA TABLA PODEMOS OBSERVAR QUE LOS EFECTOS DEL LCR PS Y DEL VIP SON SIGNIFICATIVOS PARA LA FRECUENCIA, PERO NO PARA LA DURACION DEL SUEÑO MOR.

LCR PS, fue resultado de un incremento en la frecuencia de aparición de dicha fase, con solo un ligero incremento en su duración (Ver Fig. 2 y Tabla 2). De hecho, la frecuencia regresó a la basal comparada con la de los sujetos normales mientras que la duración permaneció significativamente disminuida ($t = 4.11$ $p < 0.01$ para el VIP y $t = 5.29$ $p < 0.001$ para el LCR PS). Estas observaciones indican colateralmente que, a pesar de que el VIP y el LCR PS son capaces de inducir sueño MOR en el gato insomne, lo hacen en cantidades relativamente pequeñas comparado con los normales, lo que indica que la recuperación es incompleta.

DISCUSION

Los resultados muestran claramente que tanto el VIP como el LCR obtenido de animales privados de sueño, son capaces de revertir el insomnio inducido por PCPA. También puede observarse que los efectos se restringen al sueño MOR, aunque la recuperación es solamente de un 50%. Con base en estos hallazgos, es evidente que la vigilia forzada induce la acumulación de un factor inductor de sueño MOR en el LCR del gato, lo cual confirma trabajos previos (Sallanon y cols., 1982).

Adicionalmente este estudio muestra que el factor de sueño MOR en el LCR del gato es termolábil, ya que su eficacia fue neutralizada por calentamiento, y es sensible a los efectos del CAP, ambos datos apoyan el que dicho factor sea de naturaleza proteínica.

Debido a que el efecto del VIP y del LCR-PS tendió a normalizar la frecuencia de los periodos de sueño MOR, pero no la duración, es posible que ambos estén ejerciendo sus efectos sobre los mecanismos de disparo de dicha fase, mientras que su manutención dependa de otras sustancias.

Una de estas sustancias podría ser la acetilcolina (Ach), ya que como mencionamos en la introducción, se ha demostrado que los fármacos colinérgicos inducen periodos de sueño MOR más largos que los controles y que este efecto puede ser bloqueado por atropina (Baghdoyan y cols., 1984; Velluti y Hernández Peón, 1963). El VIP parece ser un modulador de la actividad muscarínica en los ganglios simpáticos (Kawatani y cols., 1985; Mo y cols., 1984), en las glándulas salivales (Hedlund y cols., 1983) y en diversas áreas del cerebro que incluyen el tallo cerebral (Obata-Tsuto y cols., 1983). Es posible que en animales normales el VIP pueda participar en la inducción de sueño MOR, al mismo tiempo que modula la liberación de Ach, la cual consecuentemente regula la duración del sueño MOR. La ausencia de efecto del VIP y del LCR PS sobre la duración no invalida esta posibilidad, ya que en estos experimentos los gatos tienen un severo insomnio producido por la PCPA lo cual puede impedir que se manifieste el efecto de la Ach.

El efecto inducido por el VIP en este trabajo es más pronunciado que el reportado con anterioridad (Drucker-Colín y cols., 1984). Esto puede ser consecuencia de dos factores. En estos experimentos el VIP fue administrado en el IV ventrículo, mientras que en el anterior se administró en el tercero. Esta

diferencia puede ser de gran importancia, ya que las estructuras que están en la vecindad del IV ventrículo han sido involucradas en la generación del sueño MOR (McGinty y Beahm, 1984). Además este punto puede ser de mayor importancia, el VIP fué administrado a gatos insomnes y, como Inoué y cols. (1985) habían señalado, tradicionalmente los probables factores inductores de sueño se han aplicado cuando los animales están en el periodo en el que sus requerimientos de sueño están satisfechos. Así se han observado efectos más dramáticos cuando dichas sustancias son administradas en periodos en los que el sueño no predomina (Honda y cols., 1984; Obal y cols., 1986), como es el caso de este estudio.

Por otro lado, Jouvet (1983) ha sugerido que es necesario que una sustancia que se postule como inductora de sueño, debería cumplir al menos los siguientes requisitos:

- 1) Ser endógena;
- 2) Aumentar durante la privación de sueño;
- 3) Activar los mecanismos de sueño;
- 4) Tener una dependencia estrecha de la dosis;
- 5) Inducir insomnio si se inactivan;
- 6) Su administración exógena debe incrementar el sueño en sujetos normales o revertir el insomnio.

Tomando en cuenta estos requisitos, podemos observar que en el LCR PS hay una sustancia endógena (punto 1) que aumenta en concentración durante la privación instrumental del sueño (punto 2), revierte el insomnio cuando se administra exógenamente (punto 6) y que es probable que esté actuando preferencialmente sobre los mecanismos de disparo del sueño MOR (punto 3). El Punto 3 y 6 son satisfechos también por el VIP. Es importante

demostrar que el LCR-PS cumple con los Puntos 4 y 5, para lo que es necesario diseñar nuevos experimentos. Sin embargo, es probable que el punto 4 también sea satisfecho por el LCR-PS ya que, como podemos observar en la Tabla I, el efecto inducido por el LCR N sobre el sueño MOR, a pesar de que es pequeño no es despreciable ya que puede ser debido a la dosis. De acuerdo a la hipótesis de Piéron (1913), la sustancia inductora de sueño se sintetiza y se acumula durante la vigilia lo que sugiere que en todo momento podemos extraerla, en bajas concentraciones. Por lo tanto, es probable que hayamos extraído bajas concentraciones de la sustancia inductora de sueño en el LCR-N; mientras que en el LCR-PS la obtuvimos en mucho mayor concentración. Parece razonable sugerir que en el LCR-PS se encuentra una sustancia que cumple con la mayoría de los requisitos para ser considerada un factor inductor de sueño. En relación a la índole bioquímica de esta sustancia es interesante, que el VIP mimetize tales efectos, por lo que se puede sugerir que existe un factor inductor de sueño MOR que se acumula durante la vigilia prolongada en el LCR del gato, que es termolábil y sensible a la acción del cloranfenicol y que puede tratarse del VIP o de una sustancia muy parecida.

Ciertamente los resultados no son definitivos y podría ser hasta aventurado sugerir que el principio activo del LCR-PS sea el VIP. Sin embargo, los resultados reportados nos permiten sugerir una serie de experimentos cuya hipótesis de trabajo sea postular al VIP como el principio activo del LCR-PS. Para probar dicha hipótesis sugerimos realizar los siguientes experimentos cuyos resultados darían la pauta para trabajos experimentales

posteriores:

1. Neutralizar los efectos del LCR-PS por medio de un dializado a través de membranas que depuren al LCR de sustancias de peso molecular semejantes al PM del VIP.

2. Neutralizar el efecto del LCR-PS incubándolo con anticuerpos específicos del VIP.

3. Probar si la administración de otras sustancias semejantes al VIP, ya sea por su estructura bioquímica o porque pertenecen a la misma familia (péptidos gastroenteropancreáticos) induce efectos parecidos a los que hemos producido con el VIP.

En conclusión podemos sugerir que el LCR-PS y el VIP tienen propiedades inductores de sueño MOR. Podemos adelantar también que es muy probable que el efecto inducido por el VIP pueda ser mimetizado por otros péptidos, ya que suponemos que el VIP es parte de un sistema neuroquímico más complejo del cual depende el sueño MOR.

REFERENCIAS

1. Adrien, J. y Dugovic, C. Presence of paradoxical sleep (PS) factor in the cerebrospinal fluid of PS-deprived rats. *Europ. J. Pharmacology* 100: 223-226, 1984.
2. Aserinsky, E. y Kleitman, N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 118: 273-274, 1953.
3. Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W. y Hobson, J.A. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res.* 306: 39-52, 1984.
4. Baghdoyan, H.A., McCarley, R.W. y Hobson, J.A. Cholinergic manipulation of brain stem reticular systems: effects on desynchronized sleep generation. En: *Sleep: Neurotransmitters and Neuromodulators*. Wauquier, A. y cols. (Eds.) Rascu Press, Nueva York, 1985. pp. 15-27.
5. Brodie, B.B., Corner, M.S., Costa, E. y Dlabac, A. Role of brain serotonin in the mechanism of the cerebral action of reserpine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 152: 340, 1966.
6. Celesia, G.G. y Jasper, H.H. Acetylcholine released from cerebral cortex in relation to state of activation. *Neurology* 16(11): 1053-1063, 1966.
7. Cespuglio, R., Faradji, H., Gómez, M.E. y Jouvet, M. Single unit recordings in the nuclei raphé dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats. *Neurosci. Lett.* 24: 130-138, 1981.

8. Dahlstrom, A. y Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. I Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 Suppl. 232, 1964.
9. Delorme, F., Jeannerod, M. y Jouvet, M. Effets remarquables de la reserpine sur l'activite EEG phasiques ponto-geniculo-occipitale. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 159: 900-903, 1965.
10. Delorme, F., Froment, J.L. y Jouvet, M. Suppression du sommeil par la p-chloromethamphetamine et p-chlorophenylalanine. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 160: 2347-2351, 1966.
11. Dement, W.C., Henriksen, S. y Ferguson, J. The effect of the chronic administration of parachlorophenylalanine (PCPA) on sleep parameters in the cat. En *Serotonin and Behavior* Barchas, J. y Usdin, E. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1973. pp 419-424.
12. Domino, E.F. y Stawiski, M. Effect of cholinergic antisynthesis agent HC-3 on the awake-sleep cycle of the cat. *Psychophysiol* 7: 107-144, 1970.
13. Drucker-Colin, R.R. Crossed perfusion of sleep inducing brain tissue substance in conscious cats. *Brain Res.* 56: 123-134, 1973.
14. Drucker-Colin, R.R. y Benitez, F. REM sleep rebound during withdrawal from chronic amphetamine administration is blocked by chloramphenicol. *Neurosci. Lett.* 6: 267-271, 1977.

frequency during short and long REM sleep periods: effects of protein synthesis inhibition. *Behav. Neurol. Biol.* 26: 123-217, 1979.

16. Drucker-Colin, R., Zamora, F., Bernal-Pedraza, F. y Sosa, B. Modification of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors. *Exp. Neurol.* 63: 458-467, 1979.

17. Drucker-Colin, R., Bernal-Pedraza, F., Fernández-Cancino, F. y Oksenberg, A. Is vasoactive intestinal polypeptide (VIP) a sleep factor? *Peptides* 8: 37-40, 1984.

18. Drucker-Colin, R.R., Rojas-Ramírez, J.A., Vera-Trueba, J., Monroy-Ayala, G. y Hernández-Peón, R. Effect of crossed-perfusion of the midbrain reticular formation upon sleep. *Brain Res.* 23: 269-273, 1970.

19. Drucker-Colin, R.R., Spanis, C.W., Hauyad, J., Sassin, J.F. y McGaugh, J.L. Growth hormone effects on sleep and wakefulness in the rat. *Neuroendocrinology* 18: 1-8, 1975.

20. Espejel, R.M. Administración crónica de un inhibidor de la síntesis de proteínas sobre el ciclo sueño-vigilia. Tesis de licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM. México, 1980.

21. Fencel, V., Koski, G. y Pappenheimer, J.R. Factors in cerebrospinal fluid from goats that affect sleep and activity in rats. *J. Physiol. (Lond.)* 216: 565-589, 1971.

22. Gadea-Ciria, M., Stadler, H., Lloyd, K. y Bartholini, G. Acetylcholine release within the cat striatum during the sleep-wakefulness cycle. *Nature* 243: 518-519, 1973.

23. Garcia-Arriaras, J.E. y Pappenheimer, J.R. Site of action of sleep-inducing muramyl peptide isolated from human urine: microinjection studies in rabbit brain. *J. Neurophysiol.* 49: 528-533, 1983.
24. Hedlund, B., Abens, F. y Bartfai, T. Vasoactive Intestinal Polypeptide and muscarinic receptors: super sensitivity induced by long-term atropine treatment. *Science* 220: 519-520, 1983.
25. Henriksen, S., Gonda, W., Cohen, H., Barchas, J. y Dement, W. The effect of monoamine oxidase inhibitor (pargyline) on the central monoamine levels and sleep y the PCPA cat. *Psychophysiol* 7: 321-325, 1971.
26. Hernández-Peón, R. y Chávez-Ibarra, G. Sleep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.* 24: 188-198, 1963a.
27. Hernández-Peón, R., Chávez-Ibarra, G., Morgane, P.J. y Timonaria, C. Limbic cholinergic pathways involved in sleep and emotional. *Behavior. Exp. Neurol.* 8: 93-111, 1963b.
28. Hernández-Peón, R. Central neuro-humoral transmission in sleep and wakefulness. En: Akert, K., Bally, C. y Schade, J.P. (Eds.) Elsevier, 1965. pp. 96-117.
29. Hobson, J.A., Goldberg, M., Vivaldi, E. y Riew, D. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjection of the muscarinic agonist Bethanecol. *Brain Res.* 275: 127-136, 1983.

30. Honda, K., Komoda, Y., Nishida, S., Nagasaki, H., Uchizono, K. e Inoué, S. Uridine as an active component of sleep-promoting substance: its effects on the nocturnal sleep in rats. *Neurosci. Res.* 1: 243-252, 1984.
31. Inoue, S., Honda, K. y Komoda, Y. A possible mechanism by which the sleep-promoting substance induces slow wave sleep but suppresses paradoxical sleep in the rat. En: *Sleep'82* Koella, W.P. y cols. (Eds.) Karger, Basel, 1983. pp. 112-114.
32. Inoue, S., Honda, K. y Komoda, G. Uridine as an active component of the sleep-promoting substance. En: *Sleep'84*. Koella, W.P. y cols. (Eds.) Gustar Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1985, pp. 212-214.
33. Jasper, H.H. y Tessier, J. Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science* 172: 601-602, 1971.
34. Jouvét, M. y Michel, F. Correlations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 153: 422-425, 1959.
35. Jouvét, M., Michel, F. y Courjon, J. Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 153: 1024-1028, 1959 a.
36. Jouvét, M. Telencephalic and rombencephalic sleep in the cat. En: *The nature of sleep*. Wolstenholme, G.E.W. y O'Connor, M. (Eds.) Churchill, London, 1961. pp. 188-208.
37. Jouvét, M. y Delorme, F. Locus coeruleus et sommeil paradoxal. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 159: 895-899, 1965.

23. García-Arraras, J.E. y Pappenheimer, J.R. Site of action of sleep-inducing muramyl peptide isolated from human urine: microinjection studies in rabbit brain. *J. Neurophysiol.* 49: 528-533, 1983.
24. Hedlund, B., Abens, F. y Bartfai, T. Vasoactive Intestinal Polypeptide and muscarinic receptors: super sensitivity induced by long-term atropine treatment. *Science* 220: 519-520, 1983.
25. Henriksen, S., Gonda, W., Cohen, H., Barchas, J. y Dement, W. The effect of monoamine oxidase inhibitor (pargyline) on the central monoamine levels and sleep y the PCPA cat. *Psychophysiol* 7: 321-325, 1971.
26. Hernández-Peón, R. y Chávez-Ibarra, G. Sleep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.* 24: 188-198, 1963a.
27. Hernández-Peón, R., Chávez-Ibarra, G., Morgane, P.J. y Timonaria, C. Limbic cholinergic pathways involved in sleep and emotional. *Behavior. Exp. Neurol.* 8: 93-111, 1963b.
28. Hernández-Peón, R. Central neuro-humoral transmission in sleep and wakefulness. En: Akert, K., Bally, C. y Schade, J.P. (Eds.) Elsevier, 1965. pp. 96-117.
29. Hobson, J.A., Goldberg, M., Vivaldi, E. y Riew, D. Enhancement of desynchronized sleep signs after pontine microinjection of the muscarinic agonist Bethanecol. *Brain Res.* 275: 127-136, 1983.

47. Krueger, J.M., Walter, J. y Levin, C. Factor S and related somnogens: an immune theory for slow-wave sleep. En Brain mechanisms of sleep. McBinty, D.J. y cols. (Eds.) Raven Press, New York., 1985b. pp. 253-276.
48. Matsumoto, J., Sogabe, K. y Hori-Santiago, U. Sleep in parabiosis. *Experientia* 28: 1043-1044, 1972.
49. McBinty, D.J., Harper, R.M. y Fairbanks, M.K. 5-HT-containing neurons: unit activity in behaving cats. En: Serotonin and behavior. Barchas, J. y Usdin, E. (Eds.) Academic Press, Nueva York, 1973. pp. 267-279.
50. Mendelson, W.B., Gillin, J.C. y Wyatt, R.J. Studies with the delta sleep-inducing peptide in the rat. *Sleep Res.* 9: 55, 1980a.
51. Mendelson, W.B., Seater, S., Groid, P. y Gillin, J.C. The effect of growth hormone administration on human sleep: a dose-response study. *Biol. Psychiatry* 15: 613-618, 1980.
52. Mitchell, J.F. The spontaneous and evoked release of acetylcholine from the cerebral cortex. *J. Physiol.* 165: 98-116, 1963.
53. Monnier, M. y Hosli, L. Dialysis of sleep and waking factors in blood of the rabbit. *Science* 146: 796-798, 1964.
54. Monnier, M. y Hosli, L. Humoral transmission of sleep and wakefulness II. Hemodialysis of a sleep inducing humor during stimulation of the thalamic somnogenic area. *Pfluegers Arch.* 282: 60-75, 1965.
55. Mo, N. and Dun, N.J. Vasoactive Intestinal Polypeptide facilitates muscarinic transmission in mammalian sympathetic ganglia. *Neurosci. Lett.* 52: 19-23, 1984.

56. Monnier, M. y Hatt, A.M. Humoral transmission of sleep. V. New evidence from production of pure sleep hemodialyzate. Pfluegers Arch. 329: 231-234, 1971.
57. Monnier, M., Hatt, A.M., Cueni, L.B. y Schoenenberger, G.A. Humoral transmission of sleep. VI. Purification and assessment of a hypnogenic fraction of "Sleep dialyzate" (Factor Delta). Pfluegers Arch. 331: 257-265, 1972.
58. Monnier, M., Koller, T. y Graber, S. Humoral influences of induced sleep and arousal upon electrical brain activity of animals with crossed circulation. Exp. Neurol. 8: 264-277, 1963.
59. Monnier, M., Dudler, L. y Schoenenberger, F.A. Humoral transmission of sleep. VIII. Effects of the "Sleep factor delta" on cerebral, motor and visceral activities. Pfluegers Arch. 345: 23-35, 1973.
60. Nagasaki, H., Iriki, M., Inoué, S. y Uchizond, K. The presence of a sleep promoting material in the brain of sleep-deprived rats. Proc. Jpn. Acad. 50: 241-246, 1974.
61. Nagasaki, H., Kitahama, K., Valatx, J.L. y Jouvet, M. Sleep-promoting effect of the sleep-promoting substance (SPS) and delta sleep-inducing peptide (DSIP) in the mouse. Brain Res. 192: 276-280, 1980.
62. Obal, Jr. F., Sary, G., Alfondi, P., Rubicsek, G. y Obal, F. Vasoactive intestinal polypeptide promotes sleep without effects on brain temperature in rats at night. Neurosci. Lett. 64: 236-240, 1986.

63. Obata-tsuto, H.L., Okamura, H., Tsuto, T., Terubayashi, H., Fukui, K., Yanaihara, N. e Iyata, Y. Distribution of the VIP-like immunoreactivity neurons in the cat Central Nervous System. Brain Res. Bull. 10: 653-660, 1983.
64. Oswald, I. Human brain proteins, drugs and dreams. Nature 223: 893-897, 1969.
65. Pappenheimer, J.R., Miller, T.B. y Goodrich, C.A. Sleep promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep deprived goats. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 58: 543-547, 1967.
66. Petitjean, F., Buda, D., Janin, M., David, M. y Jouvet, M. Effects due chloramphenicol sur le sommeil du chat-comparison avec le thiamphenicol, l'erythromycine et l'oxytetracycline. Psychopharmacology 66: 147-153, 1979.
67. Pieron, H. Le probleme physiologique de sommeil, Masson, 1913, Paris.
68. Prezewlodka, B., Mogilnicka, E., Jason, W., Van Luitelaar, Z.L.J.M. y Coenen, A.M.L. Deprivation of REM sleep in the rat and the opiod peptides B-endorphin and dynorphin. Neurosci. Lett. 70: 138-142, 1986.
69. Puizillout, J.J., Graudin Chazal, G., Daszuta, A., Seifritz, N. y Ternaux, J.P. Release of endogenous serotonin from "encephale isole" cats. II correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. J. Physiol. (Paris) 75: 531-537, 1979.

70. Rechtschaffen, A., Lovell, R.A., Freedman, D.X., Whitehead, W.E. y Aldrich, M. The effect of parachlorophenylalanine on sleep in the rat: some implications for the serotonin-sleep hypothesis. En: Serotonin and Behavior. Barchas J. y Usdin, E. (Eds.) Academic Press, New York, 1973. pp 401-418.
71. Riou, F., Cespuglio, R. y Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat: I peptides decreasing paradoxical sleep. Neuropeptides 2: 243-254, 1982a.
72. Riou, F., Cespuglio, R. y Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat: II peptides without significant effect on the sleep-waking cycle. Neuropeptides 2: 255-264, 1982b.
73. Riou, F., Cespuglio, R. y Jouvet, M. Endogenous peptides and sleep in the rat: III the hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide. Neuropeptides 2: 265-277, 1982c.
74. Rojas-Ramírez, J.A., Aguilar-Jiménez, E., Posada-Andrews, A., Bernal-Pedraza, J. y Drucker-Colín, R. The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep, wake cycle of rats. Psychopharmacology 53: 147-150, 1977.
75. Sallanon, M., Buda, C., Janin, M. y Jouvet, M. Restoration of paradoxical sleep by cerebrospinal fluid transfer to PCPA pretreated insomniac cats. Brain Res. 251: 137-147, 1982.
76. Sallanon, M., Buda, C., Javin, M. y Jouvet, M. Implication of serotonin in sleep mechanisms: Induction, facilitation? En: Sleep: Neurotransmitters and Neuromodulators. Wauquier, A. y cols. (Ed.) Raven Press, Nueva York, 1985. pp. 135-140.

77. [Name], [Name]. [Title]. En: *Neurobiology of Sleep*. Drucker-Colin, R. y McGaugh, J.L. (Eds.) Academic Press, New York 1977. pp. 199-202.
78. Schnedorf, J.G. y Ivy, A.C. An examination of the hypnotoxin theory of sleep. *Am. J. Physiol.* 125: 191-205, 1939.
79. Schoenenberger, F.A. y Monnier, M. Characterization of delta-electroencephalogram (sleep) inducing-peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1282-1286, 1977.
80. Schoenenberger, F.A., Cueni, L.B., Monnier, M. y Hatt, A.M. Humoral transmission of sleep. VII Isolation and physico-chemical characterization of the "Sleep inducing factor delta". *Pfluegers Arch.* 338: 1-17, 1972.
81. Silberman, E.K., Vivaldi, E., Garfield, J., McCarley, R.W. y Hobson, J.A. Carbachol triggering of desynchronized sleep phenomena. Enhancement via small volume infusions. *Brain Res.* 191: 215-224, 1980.
82. Sitaram, N. y Guillin, J.C. Development and use of pharmacological probes of the CNS in man: evidence of cholinergic abnormalities in primary affective illness. *Biol. Psychiat.* 15: 925-955, 1980.
83. Stern, W.C., Jalowiec, E., Shobshalowitz, H. y Morgane, P.J. Effects of growth hormone on sleep-waking patterns in cat. *Horm. Behav.* 6: 189-196, 1975.
84. Stern, W.C., Morgane, P.J., Panksepp, J., Salovick, A.J. y Jalowiec, J.E. Elevation of REM sleep following inhibition of protein synthesis. *Brain Res.* 47: 254-258, 1972.

85. Takahashi, Y., Kipnis, D.M. y Danghaday, W.H. Growth hormone secretion during sleep. *J. Clin. Invest.* 47: 2079-2090, 1968.
86. Tobler, I. y Barbely, A.A. Effect of delta sleep inducing peptide (DSIP) and arginine vasotocin (AVT) on sleep and motor activity in the rat. *Waking Sleeping* 4: 139-153, 1980.
87. Toyoda, J., Sakiu, K., Kwriharo, K. A polygraphic study of the effect of atropine on human nocturnal sleep. *Folia Psychiatrica et Neurologica Japonica* 120: 275-289.
88. Ursin, R. Endogenous sleep factors. *Exp. Brain Res. Suppl.* 8: 118-132, 1984.
89. Van Luijtelaar, E.L.J.M. y Coenen, A.M.L. Electrophysiological evaluation of three paradoxical sleep deprivation techniques in rats. *Physiol. Behav.* 36: 603-609, 1986.
90. Velluti, R. y Hernández-Peón, R. Atropine blockade within a cholinergic hypnogenic circuit. *Exp. Neurol.* 8: 20-29, 1963c.