

174
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTOS DEL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO
(VIP) EN GATOS CON INSOMNIO PRODUCIDO
POR LESIONES DEL AREA PREOPTICA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARGARITA ISABEL ROMERO DE MARTINO



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.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
CARACTERIZACION DEL SUEÑO.....	1
ANTECEDENTES.....	10
EL SUEÑO COMO OBJETO DE UNA NEUROFISIOLOGIA "HUMEDA".....	14
FACTORES INDUCTORES DEL SUEÑO.....	16
FACTOR S.....	19
PEPTIDO INDUCTOR DE SUEÑO DELTA (DSIP).....	25
FACTORES DE SUEÑO EN EL CEREBRO.....	29
EFECTOS HORMONALES EN EL SUEÑO.....	32
ARGININ-VASOTOCINA (AVT).....	33
HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH).....	35
EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) COMO FACTOR INDUCTOR DEL SUEÑO.....	38
EL EFECTO DE INSOMNIO PRODUCIDO POR LESIONES DEL AREA PREEPTICA.....	43
EL ACIDO KAINICO COMO INSTRUMENTO EN NEUROBIOLOGIA.....	46
MATERIALES Y METODOS.....	50
RESULTADOS.....	57
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	72

INTRODUCCION.

El sueño es un fenómeno que influye en la regulación de casi todos los procesos fisiológicos que han sido estudiados, los cuales incluyen procesos sensoriales y motores, funciones neuroendócrinas, termorregulación, funciones cardiovasculares y respiratorias. El ciclo sueño-vigilia modula rítmicamente otras funciones del organismo y, a su vez, existen otros sistemas fisiológicos que modulan la regulación del sueño, de tal manera, el sueño y éstos están activamente interrelacionados.

El sueño puede definirse como episodios espontáneos recurrentes de inactividad motora, acompañados por umbrales elevados de respuesta a estímulos sensoriales. La actividad mental en estos lapsos se encuentra sumamente disminuída, esto es, el sueño va acompañado de inconciencia y los episodios son rápidamente reversibles. Además existe un incremento en la tendencia a dormir después de la privación de sueño, lo que indica la presencia de un componente homeostático en este fenómeno (McGinty y Beaha, 1984).

CARACTERIZACION DEL SUEÑO.

Al aplicar el criterio conductual que incluye períodos prolongados de inactividad, organización circádica, umbrales de respuesta elevados, posturas específicas de sueño, ondas lentas de alto voltaje y sueño activo, se puede sugerir que las bases del sueño se presentan en casi todos los phyla, incluyendo a los invertebrados como los insectos. Sin

embargo, ciertos rasgos distintivos del sueño y los patrones de sueño integrados fisiológicamente parecen surgir únicamente en mamíferos y aves. Solo los mamíferos y las aves han mostrado compartimentalizaciones periódicas de los estados del sueño.

Los fenómenos utilizados para caracterizar electrofisiográficamente a cada una de las fases del sueño son los siguientes: 1) registro de electroencefalograma cortical (EEG); 2) movimientos oculares; 3) actividades electromiográficas (EMG) del cuello en animales y barbilla en humanos y 4) registro de la actividad del cuerpo geniculado lateral (CGL).

El primer estado ha sido llamado sueño de ondas lentas (SL), sueño sincronizado (EEG), sueño de estados I a IV en humanos adultos y sueño quieto en infantes. Durante esta fase el animal tiene una postura característica del dormir, sus ojos están cerrados y las pupilas están mióticas. El tono muscular permanece en algunos grupos musculares del cuerpo. La actividad eléctrica de la corteza está caracterizada por husos y ondas lentas (fig. 1) y no existe actividad electro-oculográfica.

Después de cierto período de tiempo, este estado es seguido por otro con características totalmente diferentes. Este segundo estado se conoce como sueño paradójico, sueño activo en infantes humanos, y sueño de movimientos oculares

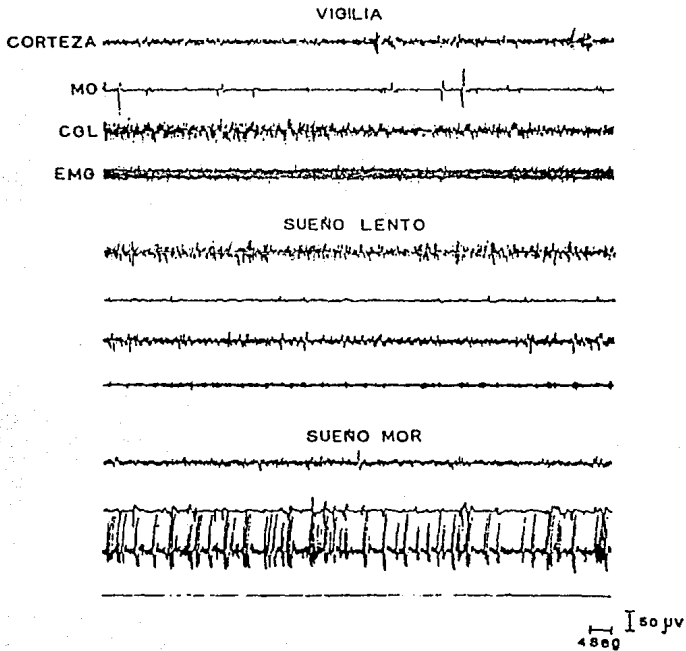


Figura 1: Registros electro-fisio-gráficos en los que se muestran las distintas fases del ciclo sueño-vigilia.

rápidos (MOR) que es el nombre más comunmente usado. El sueño MOR tiene dos aspectos fenomenológicos distintos los que podemos describir de la siguiente manera:

1) Actividad Tónica. En esta fase existe una actividad cortical rápida de bajo voltaje similar a la de vigilia, (fig. 1), asociada con un ritmo teta regular en el hipocampo y una desaparición total de evidencias electromiográficas de actividad muscular. El fenómeno tónico persiste por varios minutos y es acompañado por comportamientos fásicos y fenómenos eléctricos característicos en la mayoría de los mamíferos (Jouvet, 1969).

2) Actividad Fásica. En esta fase ocurren movimientos oculares rápidos de 50 a 60 por minuto, con un patrón bastante estereotipado que es distinto al que se observa durante la vigilia. Estos van asociados con una actividad cortical y subcortical la cual ha sido denominada actividad pontogeniculo-occipital (PGO). Esta actividad fásica está compuesta de ondas de alto voltaje que pueden ser registradas en la formación reticular del puente, en el cuerpo geniculado lateral, y en la corteza occipital (fig. 1). Asimismo estas ondas PGO se presentan en el sueño de ondas lentas que precede al sueño MOR por alrededor de 30 a 45 segundos, su promedio en este último es también muy constante (60 +/- 5 ondas por minuto).

Durante el sueño MOR la actividad espontánea se presenta periódicamente semejando a la actividad eléctrica de una entrada visual durante la vigilia (Jouvet, 1969).

Los parámetros del sueño son sensibles a las condiciones en las que se realizan las mediciones, incluyendo adaptación en el laboratorio, hora del día y temperatura. Sin embargo, bajo condiciones estandarizadas los parámetros del sueño son consistentes, predecibles y proveen una base normativa para la detección de influencias de interés experimental.

Los estudios relacionados con el sueño se enfrentan a varios factores que dificultan el progreso de las investigaciones. En primer lugar, las relaciones entre el fenómeno del sueño y otros fenómenos fisiológicos son tan diversas que se genera un proceso de extraordinaria complejidad. En segundo lugar, se ha visto que los mecanismos reguladores del sueño se encuentran dispersos anatómicamente, es decir, que el control del sueño no está localizado en una región particular del cerebro, sino que está influenciado por numerosas regiones. Aunado a lo anterior, en los estudios del sueño se carece del conocimiento sobre las funciones que tiene. La idea de que el sueño se relaciona de alguna manera con el reposo o la recuperación del organismo es un componente de muchas

teorías, sin embargo, no se sabe como se representan sus consecuencias fisiológicamente.

Se ha buscado el efecto preciso del sueño en la sobrevivencia de los organismos y se han desarrollado numerosas teorías sobre su función. Estas se encuentran resumidas en la tabla 1 (Tomado de McGinty y Beahm, 1984). Estas hipótesis pueden dividirse en dos categorías: 1) Conductuales y 2) Restaurativas - Sintéticas. Conforme más componentes del sueño se conocen, más teorías funcionales se proponen.

Tabla 1: Diferentes teorías sobre la función del sueño.

TEORIAS	REFERENCIAS
<u>RESTAURATIVAS.</u>	
Restitución Corporal Funciones del SL para restitución corporal y recuperación músculo esquelética.	Hartmann, 1973; Oswald, 1970, 1974
Funciones del sueño para la reparación tisular y la recuperación.	Hess, 1954
Restitución del Cerebro. El sueño lento es un período de restitución cerebral.	Oswald, 1970, 1974
El sueño es un período de restitución cerebral.	Horne, 1978, 1980
La recuperación sináptica para neuronas que tuvieron cambios macromoleculares durante la activación de la vigilia.	Moruzzi, 1966, 1972

SINTETICAS.

El sueño MOR provee un período de aumento de síntesis de proteínas.

Rojas-Ramírez et al., 1977.
Drucker-Colin et al., 1975;
1979, 1980.

El sueño provee un período de disminución en la demanda de energía para el incremento de la síntesis macromolecular.

Adam y Oswald,
1977 Durlle et al.,
1978.

CONSERVACION DE LA ENERGIA.

El sueño, letargo, sopor, o hibernación son adaptaciones homologas para la conservación de energía.

Berger, 1975; Walker y Berger, 1980
Walker et al.,
1977; 1979.

El sueño es un período de descanso reforzado que limita los requerimientos metabólicos.

Zepelin y
Rechtschaffen,
1974.

La pérdida de la termoregulación durante el sueño MOR reduce el costo metabólico y la energía ahorrada es utilizada por los jóvenes para crecer y desarrollarse.

Zepelin, 1980

El sueño se desarrolla con la endoterma como medio para limitar el costo metabólico, y la cantidad manifiesta es dependiente de la seguridad del sueño en cada estilo de vida de las especies.

Allison y Van
Twyver, 1970.

ONTOGENETICAS.

El sueño MOR provee una estimulación endógena para la maduración y el desarrollo en la ontogenia.

Roffwarg, 1966
Berger, 1975.

El desarrollo ontogenético del ciclo descanso-actividad sirve para la estabilización homeostática.

Sterman, 1979.

ETOLOGICAS.

El sueño MOR sirve a una función de motivación por medio del decremento del comportamiento producido por la vigilia.

Vogel, 1975, 1979.

El sueño es un mecanismo de control conductual que se desarrolló para mejorar patrones de sobrevivencia adaptativos de vigilia.

Meddis, 1975, 1977;
Webb, 1974, 1975.

El sueño es un patrón de conducta instintivo que resulta de patrones funcionales íntimamente integrados a muchos niveles que proveen un balance homeostático general.

Moruzzi, 1966, 1972;
McGinty et al., 1974;
McGinty, 1971.

El sueño MOR provee una activación para la preparación de una respuesta conductual de "lucha o vuelo".

Snyder, 1966.

COGNOSITIVAS.

El MOR sirve para consolidar y mejorar la memoria y el aprendizaje.

Stern y Morgane, 1977;
Pearlman, 1971;
Fishbein y Gutwein, 1977.

El ciclo sueño-vigilia normal favorece la retención de información.

Ekstrand et al., 1977; McGaugh et al., 1979.

Según McGinty y Beahm (1984) un acercamiento más filosófico permitiría seleccionar los datos y ganar alguna perspectiva; si se supone que el sueño posee de hecho un impacto en la sobrevivencia de los organismos, es conductualmente similar en todos los animales, y cercanamente adaptado al estilo de vida de cada una de las especies, el paso siguiente sería preguntar el propósito. El amplio intervalo de funciones influenciadas por el sueño e implicadas en su regulación, sugieren que la búsqueda de una sola función específica del sueño es insostenible. El sueño puede más bien proveer una base reguladora a través de la cual muchos sistemas corporales pueden estar íntimamente integrados y permitir funciones más eficientes y más complejas. En todos los phyla se encuentran fenómenos similares al sueño y es posible que sea un factor que haya evolucionado a partir de los reptiles (McGinty y Beahm, 1984).

ANTECEDENTES.

Hasta antes de 1956 se pensaba que el sueño estaba constante y necesariamente asociado con la sincronización electroencefalográfica (EEG). Se sabía que tanto el EEG como el despertar se debían a una descarga fásica de impulsos reticulares ascendentes, los que probablemente desorganizaban los ritmos corticales lentos por la desincronización de la actividad del marcapaso talámico (Moruzzi y Magoun, 1949). Estos hechos y el estudio del efecto de lesiones en el Tegmento mesencefálico llevaron a la conclusión de que la vigilia y la activación EEG se debían a un flujo tónico de impulsos reticulares ascendentes. El sueño estaba considerado como un fenómeno pasivo, debido a la ausencia de vigilia. El alertamiento y la activación EEG estaban presentes siempre que el flujo tónico de impulsos estuvieran por arriba de un nivel crítico requerido para el sostenimiento de la vigilia. Por el contrario, el animal sucumbía al sueño siempre que la descarga tónica del sistema reticular ascendente decayera por debajo del nivel crítico. La retirada o cualquier disminución considerable de la facilitación de la difusión reticular llevaba a una caída en el tono cerebral, al cual se implicaba como el causante de todas las manifestaciones EEG y conductuales del sueño (Moruzzi, 1964).

La teoría pasiva del sueño requería solamente de un sistema para explicar la transición de vigilia a sueño y por lo tanto obedecía a la ley de la economía en la que los organismos se rigen por los medios o vías más simples posibles. Sin embargo, existían evidencias de que el sueño podía ser inducido por la estimulación eléctrica de diferentes partes del cerebro y que además esta estimulación solamente producía el efecto si se utilizaban frecuencias bajas que corresponden a la frecuencia de los husos del sueño. Estos experimentos eran rechazados por poner en duda la validez de la estimulación eléctrica, además era muy difícil de concebir a un sistema de sueño tan difuso como los estudios de estimulación sugerían. Por otro lado, algunos estudios de lesiones diferían también respecto a la teoría pasiva, pues las lesiones del Tallo Cerebral, por debajo del Sistema Reticular Activador Ascendente, producían un incremento definitivo en la conducta de vigilia y en los registros EEG de la misma (Bantini et al., 1958). Estos experimentos sugerían que las estructuras hipnogénicas o sincronizadoras se encontraban localizadas en la región caudal del Tallo Cerebral (Jouvet, 1969).

En 1960 la mayoría de los neurofisiólogos aceptaban la hipótesis de que existían mecanismos inductores de sueño que podían amortiguar activamente la actividad del Sistema Reticular Activador Ascendente. Este concepto fue

rápido aceptado cuando aproximadamente al mismo tiempo nuevos datos indicaron que el sueño no podía ser considerado como un fenómeno único opuesto a la vigilia, sino que de hecho constaba, al menos en aves y mamíferos, de dos estados sucesivos diferentes.

Aunque ya se habían reportado observaciones ocasionales de sueño sin sincronización del EEG (Derbyshire et al., 1936; Hess Jr. et al., 1953), fue hasta 1957 que se demostró que los episodios de actividad rápida de baja frecuencia sucedían constante y frecuentemente durante el sueño nocturno del hombre. Dement y Kleitman (1957) demostraron que éstos estaban relacionados con las ensoñaciones. Un año más tarde Dement (1958) encontró episodios de este tipo durante el sueño de gatos normales y al igual que en el hombre, se encontraban asociados con movimientos oculares rápidos.

A partir de estos descubrimientos los estudios de los mecanismos del sueño se desarrollaron rápidamente y se caracterizó a cada una de las fases del sueño.

Algunos estudios, realizados por Jouvet y sus colaboradores (1969) determinaron que existía un aumento en los umbrales del despertar reticular y sensorial, que había un relajamiento completo del cuello y otros músculos de la postura con una ligera caída de la presión arterial y que cuando los estímulos sensoriales no eran suficientemente

fuerzas para producir el despertar, el animal regresaba al patrón del sueño de ondas lentas en el EEG (Moruzzi, 1964). Más aún, nunca se observó una transición directa de vigilia a sueño rápido de bajo voltaje (MOR), lo cual sugería que el sueño sincronizado era un estado intermedio entre la vigilia y el sueño sin sincronización. (Moruzzi, 1964).

Moruzzi aceptaba que al menos el sueño sin EEG sincronizado era un fenómeno activo dado que esta fase no era reproducible a partir de lesiones en el Sistema Nervioso Central. Además, el hecho de que las anestésicas con Nembutal nunca producían un patrón EEG sin sincronización no resultaba muy claro, pues las evidencias indicaban que este era el sueño profundo. Sin embargo, Rossi et al (1961) y Jouvet (1961) demostraron que el sueño de EEG plano podía producirse por la estimulación eléctrica del Tallo Cerebral.

El primer paso en el estudio de los estados del sueño fue la descripción de sus patrones cualitativos. Durante este tiempo no se intentaron realizar estudios cuantitativos, debido principalmente a dificultades técnicas. Sin embargo los datos que se obtuvieron con el transcurso del tiempo mostraron que los estados del sueño son, como la temperatura rectal, el ritmo cardíaco, y el metabolismo basal, es decir, una constante biológica. Estos adelantos hicieron posible el estudio del sueño en relación con alteraciones cuantitativas en las funciones cerebrales tales

como el resultado de una droga inyectada o lesiones cerebrales localizadas, o en relación con datos obtenidos por medio de análisis bioquímicos.

EL SUEÑO COMO OBJETO DE UNA NEUROFISIOLOGIA "HUMEDA".

Con la llegada de los estudios a nivel bioquímico del sistema nervioso, F. O. Schmidt (1962) introdujo los términos de neurofisiología "seca" y "húmeda" en relación a los fenómenos eléctricos y neurohumorales respectivamente.

Cuando se vió que el sueño era un fenómeno difuso, un mecanismo neurofisiológico seco no podría explicar las variaciones circádicas del organismo. La constante de tiempo del potencial eléctrico del cerebro es del orden de milisegundos y por lo tanto no puede ser el de la ritmicidad circádica o ultradiana de los estados del sueño. Este concepto es demostrado más concluyentemente por la alteración en los estados del sueño, que es afectado por la privación selectiva del sueño MOR. En seguida de dicha privación, aparece un "rebote" de larga duración de sueño MOR, que generalmente se mantiene por un período aproximado de la mitad del tiempo de privación. Ningún mecanismo "seco" puede explicar este fenómeno que puede durar varios días o incluso semanas (Jouvet, 1969).

Compuestos como los neurotransmisores y las monoaminas comenzaron a ser estudiados como posibles controladores de los mecanismos del sueño. Algunos experimentos de Jouvet

(1969) implicaban a las monoaminas como posibles responsables de la producción del sueño en los animales. Jouvét demostró que disminuyendo selectivamente los niveles de serotonina por medio del fármaco P-Clorofenilalanina (PCPA), después de las primeras veinticuatro horas a partir del momento de la inyección se presentaba un abrupto decremento en ambos estados de sueño y después de treinta horas el animal se encontraba totalmente insomne, lo cual se mostraba por un comportamiento continuo de vigilia relajada, midriasis media y una actividad cortical rápida permanente de bajo voltaje. A partir de las sesenta horas comenzaban a aparecer patrones de sueño lento y MOR y se alcanzaba una restitución total del sueño a las doscientas horas de efectuada la inyección.

Dado que la P-Clorofenilalanina inhibe sólo el primer paso en la síntesis de la serotonina, Jouvét y sus colaboradores eran capaces de revertir el efecto inyectando 5 hidroxitriptofano (5-HTP) que es un precursor directo de la serotonina.

El mismo efecto fue producido al destruir estereotáxicamente las neuronas serotoninérgicas del Núcleo del Raphe en gatos que tenían electrodos permanentemente implantados en el cerebro. Después de realizar los estudios histológicos y bioquímicos observaron que el incremento del insomnio en los gatos era proporcional al tamaño de la lesión efectuada

en el Núcleo del Raphe y que las cantidades de serotonina encontradas en los cerebros eran igualmente proporcionales al tamaño de la lesión que tenían.

Estos trabajos y los de otros autores han tratado de alguna manera de encontrar un factor hipnogénico que sea el responsable del sueño.

FACTORES INDUCTORES DEL SUEÑO.

La búsqueda de sustancias sueño-inductoras ha tomado en general tres enfoques. El primero es puramente farmacológico. Históricamente éste involucra el uso de hierbas y plantas, y más recientemente la extracción de componentes activos a partir de estos productos o la producción de compuestos sintéticos. Este enfoque ha tenido relativamente pocos resultados, como se puede notar por la carencia de una droga sueño-inductora ideal. Más aún, la mayoría de tales drogas son muy probablemente depresoras del Sistema Nervioso Central, las cuales actúan de una manera no relacionada con los mecanismos naturales del sueño.

El segundo enfoque, que ha tenido un impacto enorme en las investigaciones del sueño, ha explorado el papel de los neurotransmisores como la serotonina, norepinefrina, y acetilcolina, en el ciclo sueño-vigilia.

El tercer enfoque que nos falta mencionar, se ha desarrollado mucho más lentamente que los anteriores. Esto es parcialmente debido a que ha tenido muy pocos adeptos,

pero más que nada porque de los tres puntos de vista éste es el que más tiempo consume y el más difícil de investigar (Drucker Colin, 1981). Este involucra la identificación de sustancias endógenas del cerebro u otro tejido.

Probablemente esta estrategia a la larga pueda ser la más exitosa aunque hasta ahora no lo haya sido. El aislamiento de un factor que tenga una función específica en el sueño representa una tarea monumental, dado el enorme número de factores que hay en el cerebro. Además existen otros problemas, principalmente relacionados con la adecuación del enfoque experimental. No es obvio a priori si las sustancias relacionadas con el sueño o sueño-inductoras aparecen durante la vigilia, al inicio del sueño, durante el sueño o inmediatamente después de un período de MOR como fue sugerido por Jouvet (1978). Todas estas alternativas pueden conducir a problemas metodológicos importantes (Drucker Colin y Valverde 1983).

No existe ninguna buena evidencia en la que se detecte una sustancia elaborada durante el sueño cuyos niveles difieran con respecto a la vigilia. Aun durante una vigilia prolongada, se ha fracasado en detectar cambios en los niveles de neurotransmisores hipnógenos probables tales como la norepinefrina (NE) y el 5-HT (Stern et al., 1971), tal vez debido a su elevada utilización. Esto sugiere que las vigiliadas prolongadas no inducen a la acumulación de neurotransmisores. Pero aun cuando hubiese tal evidencia,

permanece el dilema de determinar si el material obtenido durante el sueño es la causa o el resultado del sueño. Las hormonas presentan problemas similares (Drucker-Colin, 1981).

La idea original de una sustancia sueño-inductora fue introducida por Pierón (Lengendre y Pierón, 1910, 1911, 1912) quien reportó que el líquido cefalorraquídeo (CSF) de perros privados de sueño inducía a un estado de somnolencia o sueño cuando se aplicaba en el cuarto ventrículo a perros normales. Si estos líquidos se ultrafiltraban, dializaban o calentaban a 65 °C, sus propiedades sueño-inductoras se perdían. Aunque no se propuso en aquel tiempo, ésta última propiedad podía haber estado anticipando la posibilidad de que la sustancia sueño-inductora fuera de naturaleza peptídica (Drucker-Colin, 1981). Las observaciones de Pierón (1913) lo llevaron a sugerir que durante la vigilia el líquido cefalorraquídeo acumulaba una hipnotoxina con propiedades conducentes al sueño y que se disipaban durante éste.

Muchos años después, Schnedorf y Ivy (1939) repitieron los experimentos de Pierón y observaron sueño conductual en 9 de 24 perros inyectados en la cisterna con 8 ml de CSF de perros privados de sueño por un período de 7 a 16 días. Sin embargo, también se encontró sueño en 4 de 24 perros que recibían CSF de perros no privados de sueño. Resultados similares fueron reportados por Kroll (1933) con extractos

de cerebro de gatos y conejos previamente anestesiados. Estos extractos de cerebro indujeron sueño en animales receptores. Los resultados de todos estos experimentos se complicaron por el enorme volumen de CSF drenado e inyectado dentro de los ventrículos el cual incrementa la temperatura y presión intraventricular. También, el sueño fue evaluado por simples observaciones conductuales dado que en ese tiempo no se disponía de mediciones cuantitativas objetivas. Sin tales mediciones es difícil distinguir el sueño de las respuestas de tensión debidas a los procedimientos utilizados.

FACTOR S.

En lo que podría ser considerada la extensión más directa de la observación original de Pierón, Pappenheimer y su grupo (1967) realizaron una serie de estudios bajo la hipótesis de que el sueño es el resultado de sustancias que se acumulan durante la vigilia y pueden ser encontradas en los ventrículos. En su primer estudio algunas cabras implantadas permanentemente con un tubo cisternal, fueron privadas de sueño con un aparato automático que producía descargas eléctricas y alarmas acústicas cuando el animal se relajaba. Al finalizar el período de privación se hizo una punción en la Cisterna Magna y se extrajo líquido

cefalorraquídeo a una velocidad de 0.1 ml/min durante 5 horas.

El líquido cefalorraquídeo (CSF) de cabras privadas de sueño y cabras normales fue inyectado en el ventrículo lateral de ratas permanentemente implantadas a una velocidad de 3.3 μ l/min durante 30 minutos (0.1 ml vol. total). Las inyecciones se efectuaban en la tarde antes de oscurecer, cuando las ratas muestran su nivel más alto de actividad. El sueño fue medido conductualmente con base en la actividad locomotora registrada constantemente por fotoceldas conectadas a un contador automático. El CSF de las cabras privadas de sueño disminuyó la actividad locomotora de las ratas durante varias horas, mientras que el CSF normal no tuvo efecto. Dado que algunos experimentos piloto con gatos muestran efectos similares, los autores reportaron el hecho de que líquido de cabras privadas de sueño sea activo en gatos y ratas, sugiere que se trata de un factor humoral de importancia fundamental y general para el mecanismo del sueño. Sin embargo, este estudio no es totalmente aceptado por algunos investigadores que argumentan que los ventrículos de las ratas fueron punzados al tiempo de cada infusión, lo que era no solamente estresante, sino que también involucraba una gran cantidad de manipulación y como es sabido desde hace mucho tiempo las manipulaciones son adversas al

comportamiento de las ratas (Drucker-Colin y Valverde, 1983). El procedimiento pudo haber provocado períodos de inactividad inmediatamente seguidos al tratamiento, disminuyendo así la actividad locomotora. También se argumenta que hubiera sido más convincente, si los autores hubieran comparado trenes de actividad por hora. No obstante, dado que las cuentas de actividad media para las ratas que se les dió CSF de cabras privadas de sueño eran más bajas que aquellas a las que se les dió CSF normal, los resultados indican posiblemente que el primer CSF sí contenía un factor humoral sueño-inductor no presente en el segundo CSF. Sin embargo, la única manera de confirmar si este factor inducía al sueño era determinándolo electrofisiográficamente, pero estos registros no fueron efectuados.

En estudios subsecuentes este problema fue parcialmente corregido. La actividad motora y el EEG cortical fueron registrados en algunas ratas permanentemente implantadas, y se reportó una buena correlación entre la baja de actividad y el incremento de la sincronización EEG (FencI et al., 1971). También, 0.1 ml de CSF de cabras privadas de sueño por 48 horas indujeron una gran disminución en la actividad motora. Se concluyó por esto que la concentración de factor inductor de sueño en el CSF es máximo después de 48 horas de privación.

Los experimentos de dializado en los que se utilizaron membranas calibradas indicaron que el factor inductor de sueño tenía un peso molecular de menos de 500 y este fue llamado factor S (Pappenheimer et al., 1975). Durante la cromatografía en Sefadex G-10, el factor S se filtra antes de la sacarosa. Reacciones con fluorescamina indicaron que 0.5 nmol de una sustancia similar a un péptido en esta región era biológicamente activa, sin embargo no se reportó ninguna correlación entre la actividad biológica y la reactividad a fluorescamina. La incubación del factor S con Pronasa destruía su actividad biológica llevando a la idea de que se trataba de un péptido. Las propiedades sueño-inductoras del factor S no fueron imitadas por la 5-HT, 8-hidroxi-butilato, butirolactona, GABA, glutamato o 3'5'AMP cíclico.

Los ultrafiltrados fueron probados en la actividad locomotora de ratas y en el EEG de conejos que tenían electrodos de tornillo en las cortezas frontal y occipital. Un volumen de 0.1 ml de concentrado purificado de CSF de cabras normales y privadas de sueño disminuyó significativamente la actividad motora nocturna por 12 horas en ratas en comparación con los que recibieron soluciones salinas. Dado que una concentración de 20 veces de CSF de animales no

privados de sueño también producía efecto, se sugirió que el factor S esta presente en pequeñas cantidades aún en animales normales. Esta observación indicaba que uno podía eliminar el estresante proceso de la privación del sueño. En conejos, 0.1 ml de factor S purificado incrementó la cantidad relativa de sueño lento aproximadamente de 15 a 20% por 4 ó 5 horas. También el voltaje integrado promedio del EEG fue incrementado en relación al normal y fue similar al observado después de una privación de sueño.

Una observación importante en este estudio fue que los extractos de cerebro, particularmente aquéllos del tallo cerebral, contenían también factor S. En el reporte de este grupo (Krueger et al., 1978) el factor S se extrajo del cerebro y se trató por cromatografía de partición y electroforésis de alto voltaje dando un producto activo purificado un millón de veces. Las concentraciones del factor S en el tejido cerebral parece ser del orden de 0.3 nmoles/gr de tejido, la dosis efectiva inductora de sueño es alrededor de 0.15 nmol/g.

Durante el trayecto de estos estudios, parecía que el CSF también tenía un factor capaz de inducir una conducta excitadora de larga duración. En contraste con el factor S, este factor excitador E parecía ejercer su efecto incluso si se le inyectaba en el espacio subaracnoideo, lo que sugería la presencia de receptores en el tejido cortical.

El factor S por lo tanto parece ser un péptido, presente a lo largo del cerebro, cuyas concentraciones se incrementan como resultado de la privación de sueño y que tiene propiedades de inducir sueño en varias especies. Estas observaciones podrían significar que el sueño es el resultado de un balance delicado entre la acumulación y utilización de un péptido universal. Sin embargo, antes de aceptar este postulado deben ser considerados algunos hechos adicionales. Primero, Ringle y Herndon (1969) no observaron ningún efecto en la actividad locomotora, comportamiento o patrón EEG con CSF obtenido de conejos privados de sueño. Esto podría significar que los conejos privados de sueño no producen un factor inductor de sueño y que tal factor no es universal. Haciendo justicia, sin embargo, este estudio no es estrictamente comparable con el de Pappenheimer dado que el procedimiento de extracción de CSF involucraba electrocutamiento de los conejos (Drucker-Colin, 1981).

PEPTIDO INDUCTOR DE SUEÑO DELTA (DSIP).

En los primeros trabajos acerca de los factores de sueño, Monnier y su grupo en Suiza estudiaron la transmisión humoral del sueño vía sistema circulatorio. En estos estudios la vena yugular de un conejo donador se conectaba a la vena yugular de un conejo receptor. Subsecuentemente la región mediocentral intralaminar del tálamo del donador se estimulaba a bajas frecuencias (6/s). Dicha estimulación indujo sincronización del EEG cortical o lo que este grupo llamó "sueño delta ortodoxo" tanto en el donador como en el receptor (Monnier et al., 1963). Dado que los animales están unidos por la vena yugular, se piensa que una substancia del sueño liberada hacia la sangre venosa cerebral del donador como resultado de la estimulación talámica, penetra al cerebro receptor vía corazón, pulmones y la arteria carotidia, mostrando así que el sueño puede ser inducido por factores que aparecen en la sangre.

Monnier y Hosli (1964, 1965) dializaron la sangre venosa cerebral y mostraron que el dializado de un conejo donador que dormía inducía sueño en conejos receptores. La aportación del factor hipnogénico que aparecía en la sangre fue originalmente hecho por inyecciones intravenosas. Más tarde, los métodos ya probados se mejoraron por el uso de infusiones intraventriculares (Monnier y Hatt, 1971), y se

mostró que un dializado de sueño parcialmente purificado inducía una bradicardia sin efectos en la tasa respiratoria y sin cambios en el CSF y presión sanguínea, sugiriendo que sus propiedades inductoras de sueño no podían ser atribuidas a factores viscerales (Monnier et al., 1973).

Estos autores mediante el uso de medidas de voltaje del EEG como bioensayo iniciaron una serie de estudios tendientes al aislamiento, purificación y caracterización físico-química de la sustancia que resultó ser un nonapéptido, al cual llamaron péptido inductor de sueño delta (DSIP siglas en inglés) con un peso molecular de 849 y cuya secuencia de aminoácidos es Trp-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu (Monnier et al., 1972, 1977; Schoenberg y Monnier, 1977). En sus experimentos mas recientes, la aportación de la actividad EEG fue realizada usando análisis de espectro de poder lineal y tridimensional, así como análisis del factor para determinar variaciones de energías espectrales en bandas de frecuencia de 2 Hz (Monnier et al., 1977) (Schoenberg et al., 1978). Los experimentos dejan poca duda de que el DSIP induce un porcentaje mucho mayor de ondas lentas.

En un estudio, Polc et al., (1978) probó los efectos de 30 y 300 nmoles de DSIP administrándolo intravenosamente en el ciclo sueño-vigilia de gatos registrados por telemetría durante 6 horas. Tanto el sueño de ondas lentas como el

sueño MOR se incrementaron por la dosis pequeña de DSIP, pero la dosis mayor no tuvo efecto. Sin embargo, recientemente Walker y Sandman inyectaron 59 nmoles de DSIP en el ventrículo lateral y encontraron que no había decremento en la actividad locomotora (ver Drucker-Colin y Valverde 1983). En estudios realizados por el grupo de Drucker-Colin (1976) la aplicación de 235 nmoles de DSIP a la formación reticular mesencefálica (MRF) de gatos, no produjo cambios en el sueño. A la luz de los resultados de Polc, tal aplicación local de DSIP puede representar una dosis muy elevada, lo que podría explicar la ausencia de efectos en el sueño y la actividad locomotora.

Sin embargo, posteriormente Tobler y Borbely (1980) administraron 7, 24, 40, 80 y 160 nmoles de DSIP en ratas y encontraron que no había decremento en la locomoción ni incremento en el sueño. En estos estudios; si alguna cosa se encontraba, era incremento en la actividad. Los autores concluyeron que el DSIP no califica como una sustancia específica promotora del sueño.

Adicionalmente, la ausencia de una curva dosis-efecto es muy extraña. Schoenenberg et al. (1978) han justificado la ausencia de una dosis-efecto, sugiriendo que el DSIP induce cambios EEG similares a los del sueño normal, pero difieren de los efectos de fármacos hipnóticos. El requerimiento principal para fármacos hipnóticos clásicos que es una curva lineal dosis-efecto, se encontró inconve-

niente para el nuevo grupo de DSIP. De hecho, la administración intravenosa de DSIP a conejos en libre movimiento incrementa solamente a una dosis óptima definida el sueño delta ortodoxo y de espiga o sueño de ondas lentas y el sueño MOR correspondiente con una relación dosis-efecto muy estrecha.

El grupo de Monnier sugiere que el DSIP actúa más como un modulador o programador de sueño que como un neuro-transmisor. Cualquiera que sea el papel del DSIP, se deberían anticipar estudios de éste y otros grupos en el origen, distribución y localización de receptores de estas substancias en el cerebro. En vista de las evidencias conflictivas se debería de evaluar cuidadosamente la evidencia de que el DSIP sea una verdadera substancia inductora de sueño. Sin embargo, hay muy pocos estudios aislados que han aportado evidencias en contra de la presencia de factores sueño-inductores que aparecen en la sangre. Ringle y Herndon (1968) fracasaron en encontrar factores promotores de sueño dializables en el plasma de conejos privados de sueño. Sin embargo, este estudio fue realizado para determinar si la privación de sueño promovería la aparición de una substancia del sueño, mientras que en los estudios de Monnier la idea era que el sueño mismo lo promoviera. La diferencia en resultados puede ser por lo tanto atribuída a la diferencia de enfoques

(Drucker-Colin, 1981). De hecho Monnier y Hosli (1964) sugirieron que la vigilia mantenida, provocada por estimulación, producía un "factor de vigilia".

En otros estudios se mostró por Lenard y Schulte (1972) que gemelos craneofagos con una circulación común tenían ciclos de sueño-vigilia independientes, y que un perro con una cabeza extra transplantada con su circulación (De Andres et al., 1976) no presentó sueño simultáneo. Estas observaciones, sin embargo no pueden ser realmente tomadas como una crítica seria del DSIP, pues bajo esas condiciones anormales, no es probable que los niveles de excitabilidad cerebral sean comparables a aquéllos de sujetos normales (Drucker-Colin, 1981).

En resumen, con base en los datos disponibles, el papel del DSIP no es muy seguro, esencialmente porque el grupo de evidencias de estas propiedades sueño-inductoras vienen de observaciones en cambios de amplitud en EEG. La asociación de un agente humoral con un signo electroencefalográfico, no necesariamente significa que se está produciendo sueño (Drucker Colin, 1981).

FACTORES DEL SUEÑO EN EL CEREBRO.

Recientemente se ha intentado extraer material sueño-inductor del cerebro. Aquí otra vez, los enfoques se han basado en hipótesis diferentes con respecto al período en que el supuesto material debe ser obtenido.

Nagasaki et al., (1974) influenciados por el concepto de Pierón de que una "substancia de sueño" se acumula durante la vigilia, privaron de sueño a unas ratas por un período de 24 horas, aplicándoles choques eléctricos siempre que los animales intentaban dormir. Al final del período de privación las ratas (n=1,000) fueron sacrificadas y el tallo cerebral fue separado, homogeneizado, dializado y liofilizado. Este extracto de cerebro fue inyectado intraperitonealmente en ratas y se reportó que indujo un decremento en la motilidad y un incremento en la actividad delta y tiempo de sueño de ondas lentas. Sin embargo, este ensayo se realizó en un número muy pequeño de ratas (n=3 para la actividad motora; n=4 para tiempo en sueño). Sin embargo, el experimento sugiere que el tallo cerebral contiene un material sueño-inductor que se acumula durante la vigilia y que parece cruzar la barrera hematoencefálica. En un estudio subsecuente (Nagasaki et al., 1976) este extracto cerebral de ratas privadas de sueño fue parcialmente purificado por una columna de Sefadex G-10 y una cromatografía de capa fina. Tiene un peso molecular de 200 a 700 y produce inhibición de la tasa de descarga espontánea del ganglio abdominal del langostino. Dado que este efecto inhibitorio era 100 veces más fuerte que el GABA, mientras que la 5-HT incrementaba la tasa de disparo, los autores sugieren que el extracto cerebral de ratas privadas de sueño

contiene sustancias como péptidos con fuertes propiedades inhibitorias. Debería de señalarse que estos experimentos proveen apoyo para el concepto de Pierón de que durante la vigilia el CSF acumula una "hipnotoxina" con propiedades inhibitorias.

Otros estudios han sido realizados en el laboratorio de Drucker Colin (1981). El enfoque fue influenciado por el concepto de transmisión sináptica, en el sentido de que la extracción de una sustancia inductora de sueño debería de producirse al tiempo que es liberada, presumiblemente como un resultado de una activación fisiológica durante el sueño. En estos estudios, se uso la cánula "push-pull" (Drucker-Colin y Spanis, 1976), que permite la extracción en animales con libre movimiento de sustancias "activas" de sitios específicos del cerebro. Los experimentos se basaron en el concepto de que el sueño y la vigilia pueden ser explicados por una acción recíproca de dos sistemas neuronales básicamente antagonistas, según lo expuesto por Moruzzi (1972). De acuerdo con esto, se realizaron experimentos para extraer de la formación reticular sustancias liberadas durante el sueño en el fluido extracelular por las terminaciones nerviosas del "sistema de vigilia" y para probar los efectos de dichas sustancias en neuronas homólogas de la formación reticular (MRF) de un animal receptor. Estos experimentos mostraron que las subs-

tancias obtenidas de gatos que dormían eran capaces de inducir sueño cuando se perfundían en MRF homólogos de gatos receptores. Dado que el ensayo se basaba en registro del ciclo completo de sueño-vigilia, se concluyó que el perfusado obtenido de sitios específicos del cerebro durante el sueño contenía sustancias capaces de influir en el comportamiento de vigilia (Drucker-Colin et al., 1970; Drucker-Colin, 1973). En este tipo de experimentos, el aislamiento de un factor inductor de sueño del perfundido es un problema serio, primeramente porque la extracción a través de la cánula push-pull provee cantidades extremadamente bajas de material y porque los bioensayos basados en registros más o menos largos del ciclo sueño-vigilia para los experimentos de ensayo y error en varios estados de purificación resulta una tarea abrumadora.

EFFECTOS HORMONALES EN EL SUEÑO.

Si se dirige la atención a las hormonas, un ligero vistazo a la literatura indicará que éstas han sido estudiadas más como factores correlacionados con el sueño que factores controladores del sueño. Existen sin embargo, dos excepciones notables: Arginivasotocina (AVT) y la Hormona del Crecimiento (HC).

ARGININ-VASOTOCINA (AVT).

Se ha reportado que la AVT produce períodos prolongados de sueño de ondas lentas, aunque suprime el sueño MOR cuando se administra en dosis extremadamente pequeñas (10^{-6} pg) que corresponden a 600 moléculas en el tercer ventrículo de los gatos. Este incremento en el sueño de ondas lentas no se observa cuando la AVT se incubaba con tripsina, y el efecto no se logra con la vasopresina u oxitocina (Pavel et al., 1977a). En un estudio subsecuente, se reportó que los efectos de la AVT en el sueño son mediados por serotonina (Pavel, 1979). Esto fue indicado por las observaciones de que la AVT únicamente incrementa los niveles de 5-HT y que la administración de AVT + fluoxetina, que es un inhibidor selectivo y específico de la degradación de la 5-HT, duplicaba el incremento de sueño de ondas lentas, mientras que la administración de AVT + metergolina, que es un agente bloqueador de receptores 5-HT (Fuxe et al., 1978) eliminaba el sueño de ondas lentas.

Sin embargo, hay otros dos estudios en los que no ha sido posible confirmar las propiedades sueño-inductoras de la AVT (Mendelson et al., 1981; Tobler y Borbely, 1980). El estudio de Mendelson et al., confirmó, sin embargo, las propiedades inhibitoras de sueño MOR de la AVT. La diferencia principal entre estos dos estudios y los de Pavel es el

hecho de que se usaron ratas en lugar de gatos. Es concebible que la AVT puede tener efectos que difieren dependiendo de las especies (Drucker-Colin, 1981). Si este fuera el caso, la interpretación de la AVT como un péptido sueño-inductor se dificultaría. Además con base en un enfoque de bioensayo diferencial, se ha reportado que la AVT se encuentra en la glándula pineal de los mamíferos (Pavel et al., 1977b). Sin embargo, otros reportes han fracasado en apoyar estas observaciones previas. Mas aún, combinando la cromatografía de líquidos y el radioinmunoensayo, se detectó un valor mucho más bajo de AVT pineal en bovinos que el reportado previamente (3 y 100 pg/glándula) (Fisher et al., 1980). Es importante que se resuelva esta controversia, pues la inequívoca presencia de AVT en la glándula pineal de los mamíferos es un requerimiento para aceptar su papel en eventos fisiológicos tales como el sueño.

La AVT necesita estar presente en bajas concentraciones, como parecen indicar los estudios de Pavel. Drucker-Colin (1981) sugiere que la AVT podría ser el marcapaso humoral mensajero para el control pineal del ritmo circádico vigilia-sueño. Sin embargo, aunque la glándula pineal juega un papel central en el control del ritmo circádico en aves, en mamíferos no tiene en absoluto esa función (Kincl et al., 1970; Menaker, 1974).

HORMONA DEL CRECIMIENTO (HC)-

Se ha reportado, y confirmado ahora muchas veces que las fases 3 y 4 del sueño en humanos están asociados con un incremento de la hormona del crecimiento (HC) en el plasma. Debido a que en el humano la aparición de la HC en el plasma relacionada al sueño acontece en la fase temprana de la noche antes de la aparición del estado de sueño MOR, se ha pensado que la HC puede jugar un papel en la descarga del sueño MOR. La hipótesis ha sido probada inyectando HC en gatos y ratas. Ambos estudios mostraron que la HC inducía un incremento dosis-dependiente en el MOR alrededor de 3 horas después de la inyección. Es interesante que estas observaciones fueron confirmadas recientemente en humanos.

Sin embargo existen algunos estudios que han mostrado que las descargas secretoras nocturnas de la HC pueden ocurrir en algunos sujetos a pesar de una casi total ausencia de sueño lento (Sassin et al., 1969; Karacan et al., 1971), en general puede decirse que la secreción de la HC está asociada con el sueño lento. Queda por ser determinado, sin embargo, si el primero es parte del proceso neural relacionado en la regulación del sueño o meramente parte del sistema eferente. Un argumento que favorece a la HC como parte de los mecanismos de descarga del sueño puede ser el hecho que en mamíferos adultos normales una de las caracte-

rísticas más estables del ciclo del sueño es que el sueño lento precede siémpre el acontecimiento del sueño MOR. Dado que en el hombre los períodos iniciales de sueño lento son los que producen la liberación elevada de la HC, se ha sugerido la posibilidad (Stern y Morgane, 1977) que tales descargas de la HC puedan jugar un papel en la presencia subsecuente de episodios MOR. Sin embargo no se ha encontrado tal liberación de la HC en mamíferos. Esto puede deberse al hecho de que los mamíferos son policíclicos y que por lo tanto sería difícil detectar liberación de HC en el sueño lento. Esto está parcialmente apoyado por las observaciones de Takahashi et al. (1978) de que los perros privados de sueño muestran liberación de la HC durante el sueño lento, lo cual, como ellos han sugerido, puede indicar que la longitud de la vigilia es un factor en la liberación de la HC en el sueño lento. Además de estos problemas, los experimentos que se describirán a continuación parecen sugerir que la HC puede de hecho, indirectamente, ser parte de un sistema que está involucrado en el disparo del sueño MOR, pero que está mediado por síntesis de proteínas. Algunas evidencias involucradas en esta sugerencia proviene de experimentos que han mostrado que la administración de la HC a ratas (Drucker-Colin et al., 1975) y gatos (Stern et al., 1975) producen un incremento dosis-dependiente y específico en el MOR a la tercera hora de su aplicación. Un incremento

similar en el sueño MOR ocurre después de la administración de la HC a humanos (Mendelson et al., 1980). Debería de señalarse que la HC es una de las pocas sustancias que ha producido un incremento en el tiempo del MOR en muchas especies incluyendo al hombre.

Debería de esperarse a partir de estos resultados que la somatostatina, que es un factor inhibidor de la HC (Brazeau et al., 1973), produjera un decremento o al menos una alteración en el sueño, dado que se sabe que su administración retrasa la secreción de la HC en humanos (Iudke et al., 1976). Havlicek et al. (1976) y Rezek et al. (1976) han reportado algunas evidencias de sueño perturbado en ratas ya que dosis pequeñas de somatostatina reducían el sueño lento y suprimían casi totalmente el MOR. Estos estudios, sin embargo, estaban oscurecidos por el hecho que la somatostatina induce excitación motora y períodos prolongados de movimientos circulares y arañamientos compulsorios, haciendo difícil determinar si el péptido alteraba algún mecanismo básico del sueño.

Se sabe que la HC tiene funciones anabólicas importantes. De acuerdo con Tata (1968), la HC parece incrementar la tasa a la que se forman los ribosomas y con ello la facilitación de la síntesis de proteínas. Además, tales efectos son aditivos, sinérgicos, cuando se administran

dos diferentes hormonas anabólicas. Sin embargo, dado que hormonas diferentes parecen actuar sobre la síntesis de diferentes proteínas específicas, se sugiere que dos hormonas anabólicas producen efectos similares en el mismo tejido pero a través de rutas diferentes (Tata, 1968). Esto es interesante para el sueño en vista del hecho que 3 horas después de la administración de la HC, cuando se encontró que el MOR se había incrementado, se registró también un incremento en los niveles de proteína (Drucker Colin et al., 1975) y en la síntesis de proteínas en el diencéfalo y médula pontina (Stern y Morgane, 1977). Estos hechos apoyan la idea de que la HC produce un efecto en el sueño MOR de varias formas a través de su capacidad de sintetizar proteínas. Sin embargo existen datos escasos sobre la relación entre la síntesis de proteínas y el sueño.

EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) COMO FACTOR INDUCTOR DEL SUEÑO.

En 1982 fue publicado por primera vez, que el péptido intestinal vasoactivo (VIP) contenía propiedades sueño-inductoras. Riou y sus colaboradores (1982) probaron los efectos de varias dosis de VIP aplicandolo intraventricularmente. El VIP demostró que en dosis de más de 100 ng/20ml ejercía un significativo efecto hipnogénico en períodos de luz sobre las ratas tratadas, aumentando las

cuotas de sueño MOR en un 15% y manteniéndose sin cambios el porcentaje para el sueño lento. El efecto que el VIP ejercía aplicado en períodos nocturnos en que las ratas son más activas provocaba cambios aún más patentes en el sueño. La vigilia disminuyó el 12% aumentando el SL y el MOR en 18 y 65% respectivamente. Este incremento fue debido a un mayor número de períodos MOR y a la duración promedio de éstos.

Además, el VIP mostro tener la propiedad de revertir los efectos del PCPA y CAP en las ratas tratadas con estos fármacos, llegando a alcanzar casi totalmente los niveles basales de sueño.

Dado que algunos estudios previos han sugerido que la síntesis de proteínas puede estar relacionada con los mecanismos que accionan al sueño MOR (Drucker Colin y Valverde, 1983) y que la única substancia que ha provocado un incremento en el sueño MOR conocida hasta ahora es la hormona de crecimiento, la relación que el VIP puede tener con este fenómeno marca una pauta importante dado que es el primer péptido que se propone como un posible inductor de sueño MOR.

El VIP fue aislado inicialmente del duodeno de los porcinos y está constituido por una cadena de 28 aminoácidos. Su presencia a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) fue descubierta hace pocos años (Loren et al., 1979) y a

partir de entonces se ha demostrado que ejerce diferentes efectos biológicos. El VIP posee una potente acción vasodilatadora en las arterias del cerebro; estimula la liberación hipofisiaria de la HC, la hormona luteinizante (HL), la prolactina y ACTH y también estimula la contracción cardíaca, secreción pancreática y la actividad adenilato ciclasa.

Se ha encontrado que el polipéptido intestinal vasoactivo se encuentra diferencialmente distribuido en el SNC y que se encuentra en altas concentraciones en vesículas de terminaciones nerviosas.

Se encuentran altas concentraciones de VIP en la corteza cerebral, el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala. En cuanto a las regiones periventriculares, se encuentran algunos cuerpos celulares y terminales nerviosas que contienen VIP en los núcleos hipotalámico, preóptico, supraóptico y supraquiasmático.

Jia-Yi Wang y sus colaboradores (1983), encontraron que las concentraciones del VIP se elevan en la corteza (2 a 30 pmol/g de tejido) y en algunas estructuras por debajo de los ventrículos como el hipotálamo, tálamo anterior, núcleos caudado y accumbens. En condiciones de estimulación también eran altas las concentraciones de VIP en perfusados de corteza y ventriculares (31.6 +/- 5 fmol/30 min).

El hecho de que el VIP provoque sueño en ratas cuando se aplica intraventricularmente (Riou et al., 1982) parece

estar relacionada con el hecho de que esta región está adyacente a zonas con terminaciones nerviosas que se sabe contienen concentraciones significativas de VIP (Jia-Yi Wang et al., 1983).

Algunas evidencias indican que el VIP podría ser un neurotransmisor excitatorio o neuromodulador en ciertas conexiones sinápticas del SNC (Bryant, 1976), pues se ha visto que excita a las células corticales piramidales cuando se aplica iontoforéticamente. Algunas fibras que contienen VIP se prolongan hacia varios núcleos hipotalámicos relacionados con el control de varias hormonas lo que podría indicar una función neuroendócrina controladora para este péptido (Roberts, 1980).

Después del artículo publicado por Riou en 1982, se realizó otro trabajo concerniente a los efectos del VIP como factor hipnogénico. Drucker Colin y sus colaboradores (1984) aplicaron VIP al III ventrículo de gatos en concentraciones de 10 ng/20 ml y 100 ng/20 ml. Estos investigadores no encontraron efectos del VIP en concentraciones de 10 ng, sin embargo con aumento de dosis a 100 ng se observó un incremento en el sueño MOR. El aumento no se debió en particular ni al incremento en períodos ni a la duración promedio de éstos sino a una combinación de ambos. Así mismo, cuando aplicaron dosis de 100 ng a gatos previamente tratados con CAP, no se previno la aparición de insomnio.

Drucker-Colin y sus colaboradores señalan que los resultados del pequeño efecto observado del VIP y su ineficacia para prevenir al sueño MOR de los efectos del CAP en los gatos pudieron deberse al sitio de la inyección. Se ha demostrado recientemente (Kaji et al., 1983) que la liberación del VIP en el líquido cefalorraquídeo está limitada al IV ventrículo. Estos autores demostraron que la estimulación colinérgica con fasiostigmina en la rata incrementa la liberación del VIP hacia el IV ventrículo, pero no hacia el III ventrículo o los ventrículos laterales. Además un exámen de la distribución de VIP en el tallo cerebral mostró que las concentraciones más altas de péptidos se localizan en las estructuras que están debajo del IV ventrículo (Eiden, 1982). Las áreas del tallo cerebral que están alrededor del IV ventrículo son conocidas por tener funciones importantes en la generación del sueño MOR y, más aún, cuando se les excitan colinérgicamente producen sueño MOR.

Para poder observar claramente los efectos sueño-inductores de cualquier substancia que no sea anestésico, y por consiguiente del VIP, es necesario que los animales experimentales estén en condiciones determinadas. En el caso de las ratas por ejemplo, dado que presentan una mayor actividad nocturna, se puede usar este período para determinar una influencia sueño-inductora del VIP más clara, como se puede

observar en los experimentos realizados por Riou.

Dado que los gatos presentan policiclicidad en cuanto al fenómeno sueño-vigilia, no es factible como en las ratas utilizar los períodos de mayor actividad pues no se presentan al menos tan marcadamente.

El hecho de que el gato sea introducido en una caja de registro de 50 x 50 cm durante un período de 8 horas puede hacer que los porcentajes de sueño se eleven al disminuir la actividad de este y que en las horas posteriores al registro se mantengan más bien activos. Es posible también que el grado en que el VIP afecte al MOR sea distinto en gatos, por lo que es necesario disminuir las cuotas normales diarias de sueño para poder distinguir los efectos del VIP en un momento dado.

EL EFECTO DE INSOMNIO PRODUCIDO POR LESIONES DEL AREA PREOPTICA.

Por la manera en la que se habían realizado los estudios del sueño, se había puesto mayor atención a las estructuras del tallo cerebral que a las encontradas en el cerebro anterior, sin embargo, con el desarrollo de aparatos electrónicos para registrar y estimular distintas partes del cerebro comenzaron a incorporarse nuevos datos a este campo.

Varios estudios de estimulación en regiones del cerebro anterior (Sternman y Clemente, 1962) se realizaron usando

bajos voltajes y frecuencias. Encontrando que los gatos mostraban comportamientos similar al sueño y que se relacionaban directamente con la estimulación.

Las regiones involucradas eran la mitad ventral de la masa intermedia del hipotálamo, incluyendo al área preóptica y supraóptica.

Algunos registros con lesiones también involucraban a la mitad rostral del hipotálamo, sobre todo a las áreas supraquiasmática y preóptica, como estructuras nerviosas de importancia específica para la capacidad de sueño (Sternman y Shouse, 1985).

Sternman y Shouse (1985), mapearon anatómicamente la región que provocaba dicha respuesta y encontraron que ésta incluía el área anterior preóptica y tejido telencefálico lateral y rostral adyacente.

A partir de entonces, ha habido varios estudios tendientes a examinar los efectos de las lesiones provocadas al área preóptica.

Sternman et al, (1964) reportaron que las lesiones electrolíticas bilaterales ubicadas en el área preóptica, producían un efecto progresivo de insomnio que alcanzaba su máximo entre los 7 y 10 días siguientes a la lesión, y que atenuaba al sueño lento y MOR de una manera significativa.

Sin embargo, las lesiones unilaterales no presentaban un efecto significativo en el sueño. Después de las lesiones bilaterales, los animales se volvían hipermotrices y muestra-

ban un constante movimiento alrededor de la caja de registro. Los animales iban con mucha frecuencia al bebedero y comedero y no respondían a estímulos sensoriales. Cuando se presentaba algún lapso de sueño, no estaba precedido por una conducta preparatoria normal tal como el bostezo, la selección de un sitio específico y la postura adecuada. En su lugar, el animal parecía colapsarse en sueño en el momento en que su movimiento cesara. Este comportamiento se presentaba en mayor o menor grado en estudios posteriores en que hacían lesiones grandes o pequeñas.

Algunos experimentos adicionales mostraron que el calentamiento localizado de esta región produce también una conducta de sueño (Roberts y Robinson, 1969) y que la microinyección de sustancias colinérgicas produce sueño (Hernandez-Peon et al., 1963).

En las preparaciones de lesión del cerveau isole, el EEG del cerebro anterior recupera gradualmente la capacidad de organizar espontáneamente tanto patrones sincronizados como desincronizados. Así pues, el cerebro anterior aislado parece ser capaz de al menos presentar conductas rudimentarias de vigilia y sueño lento (McGinty y Beahn, 1984).

La eliminación de sueño MOR en los estudios antes mencionados parece deberse más bien a que con las lesiones se evita que el sueño lento se presente y, dado que esta

fase es indispensable para que también se manifieste el sueño MOR, el resultado es la disminución de ambas fases del ciclo del sueño.

Por lo anteriormente señalado, la lesión del área preóptica resulta muy adecuada al tratar de estudiar los efectos del VIP como factor inductor del sueño o sustancia sueño-inductora, dado que como se ha reportado, el VIP parece provocar un incremento más específico en la fase de sueño MOR (Riou et al., 1982; Drucker Colin et al., 1984). De esta manera las estructuras más directamente relacionadas con el sueño MOR que se encuentran en el tallo cerebral quedan intactas y en posibilidades de ejercer su influencia en el animal.

EL ACIDO KAINICO COMO INSTRUMENTO EN NEUROBIOLOGIA.

El ácido kaínico (AK), desde su purificación, ha sido ampliamente estudiado por su efecto excitatorio a nivel neuronal. Su parecido químico con el L-glutamato (Glu) fue el que llevó a los investigadores a estudiarlo como sustancia excitatoria, dado que el Glu es conocido por ser un estimulador poderoso de las neuronas de varias partes del Sistema Nervioso Central de los mamíferos.

Inicialmente se encontró que el ácido kaínico tenía una fuerte acción excitatoria que era aún más potente que el Glu y cualquier otro neuro excitador conocido. Además se le re-

conoció una acción neurotóxica que se propuso era debida a una despolarización prolongada y al incremento paralelo en la permeabilidad de la membrana (Takemoto, 1978). El descubrimiento de las propiedades neurotóxicas del ácido kaínico le ha dado nuevas aplicaciones en el campo de la neurobiología.

La manera en la que el ácido kaínico afecta tóxicamente a las neuronas parece deberse a que causa destrucción de únicamente los cuerpos celulares que se encuentran en el área de inyección, dejando intactos los axones de paso y las terminales nerviosas aferentes. Esto es especialmente útil en el sentido de que se pueden resolver algunas dudas de si el tipo de estructura que se encuentra involucrada en los efectos neuroquímicos o conductuales que provocan las lesiones electrolíticas se originan en el sitio del área lesionada, en las proximidades del área o únicamente pasan por el sitio de la lesión.

Un ejemplo de la importancia del ácido kaínico como instrumento de experimentación se puede observar en los estudios por Assaf y Miller (1978), en los cambios de la actividad eléctrica del hipocampo inducida por estimulación eléctrica del núcleo del tallo cerebral. La estimulación de varias regiones del tallo cerebral produce descargas de actividad rítmica en las células del hipocampo, mientras que la estimulación del Raphe produce inhibición de las células

granuladas. En estos experimentos ha existido la controversia de si cualquiera o ambos efectos eran dependientes de la intervención de las neuronas mediales y septales del hipocampo. Las lesiones electrolíticas del área medial y septal eliminaban ambos efectos, pero estas lesiones destruyen tanto a las neuronas septales y mediales como a los axones de paso.

Las inyecciones intraseptales de ácido kaínico (4-7 nmoles en 1 ml) se presentaron eliminando la actividad rítmica pero no tuvieron efecto en la inhibición mediada por el Raphe, sugiriendo que las neuronas septales eran necesarias para la actividad rítmica pero no para la inhibición.

La estabilidad de las soluciones del ácido kaínico depende mucho del tiempo que transcurre entre que se prepara y se utiliza. Se ha visto que la actividad es mucho mayor con las soluciones preparadas en el momento de usarse que con las que han sido almacenadas por algún tiempo a 4 °C o continuamente congeladas y descongeladas. Algunos autores han visto que la pérdida de toxicidad con el tiempo a 4 °C parece ser particularmente notable a bajas concentraciones (1-3 μ moles/ml) de ácido kaínico y que esta toxicidad se puede mantener si las concentraciones son de 10 a 20 μ moles/ml cuando se almacena a -20 °C, descongelandose inmediatamente antes de usarse.

Algunos estudios de microscopia electrónica en el hipotálamo y tejido neocortical (NCP) y algunos estudios bioquímicos, indican que inyecciones de 5 a 10 nmoles de ácido kaínico en 1 μ l causa la destrucción de todos los cuerpos celulares neuronales dentro de un radio de 1 a 1.5 mm del sitio de la inyección. Sin embargo algunos otros experimentos realizados en cerebelo e hipocampo indican que algunos tipos celulares son más sensibles que otros a los efectos tóxicos del AK, al parecer, las neuronas dopaminérgicas de determinadas regiones son de alguna manera menos sensibles que las colinérgicas o GABAérgicas de esas mismas regiones (McGeer, et al., 1978).

No se encontró bibliografía en la cual se analizara el efecto del ácido kaínico en el área preóptica, pero por las ventajas que implica el usar este método nos inclinamos a su empleo.

El objetivo de este trabajo es el de determinar las propiedades hipnagógicas del péptido intestinal vasoactivo (VIP) aplicado en el IV ventrículo de gatos con insomnio producido por lesiones del área preóptica.

MATERIALES Y METODOS:

El planteamiento general del trabajo consistió en:

- 1) La implantación de electrodos por el método estereotáxico en distintas zonas del cerebro de gatos, la implantación de una cánula guía al IV ventrículo para posteriores aplicaciones de VIP durante los registros y la lesión bilateral del área preóptica con ácido kaínico.
- 2) El registro subsecuente de los animales implantados y la lectura de dichos registros.
- 3) La realización de estudios histológicos de los cerebros de los animales para la corroboración de los datos electrofisiográficos.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 15 gatos callejeros tratados y desparasitados con pesos aproximados entre 2,500 y 3,500 gramos sin importar el sexo. Un día antes de las implantaciones se mantenía a los gatos en ayuno para evitar los efectos de la anestesia. Los animales eran anestesiados con Pentobarbital en dosis de 35 mg por Kg de peso y mientras el anestésico surtía efecto los electrodos y cánulas eran calibrados en el estereotáxico.

En cada implantación se aplicaban 4 electrodos de tornillo para registros EEG de corteza, 2 electrodos de tornillo para el registro de electro-oculograma implantados

en el canto interior y exterior del ojo, 2 electrodos de alambre colocados en los músculos del cuello para el registro de EMG, y 1 electrodo tripolar en el cuerpo geniculado lateral para el registro de las ondas PGO. Las cánulas implantadas se utilizaron para introducir posteriormente el VIP, éstas eran de calibre 21G y tenían una longitud de 25 mm. Estas cánulas se colocaba de manera que quedara 1 mm arriba del IV ventrículo para evitar que el líquido cefalorraquídeo drenara hacia afuera después de las implantaciones. Las cánulas contaban con un mandril que les servía a la vez de tapón y evitaba que se taparan con cualquier elemento que pudiera introducirse en ellas. Las coordenadas utilizadas inicialmente para introducir las cánulas al IV ventrículo fueron las siguientes:

Anteroposterior (AP)=-2, Lateral (L)=0, y Vertical (V)=4.5.

Una vez hechas las calibraciones en el estereotáxico, se preparaba la solución de ácido kaínico con la que se producían inicialmente las lesiones del Area Preóptica (AP). En 2.5 ml de una solución de suero salino se disolvían 10 mg de ácido kaínico y se llevaba a un pH entre 7.2 y 7.4, neutralizado con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N.

Una vez que el animal habia entrado en anestesia, se montaba al estereotáxico, se fijaba por medio de las barras y se procedía a la implantación. Con un bisturí se cortaba la piel que cubre el craneo en forma longitudinal y el cráneo se exponía retirando el músculo y los ligamen-

tos por medio de un elevador periosteal y se marcaban los sitios de trepanación, según la calibración previamente realizada. Posteriormente se hacían los orificios por donde se introducirían cánulas, los electrodos, etc.

Las lesiones del Area Preóptica se realizaron química y electrolíticamente. En el caso de los gatos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 las lesiones se hicieron con ácido kaínico. Con una microjeringa previamente calibrada en las coordenadas AP=16, L= +/- 3, y V=4 se inyectaba 1 μ l de solución de ácido kaínico en un lapso de 10 min, a una razón de 0.1 μ l/min para evitar daño del tejido cerebral por presiones del inyectado. Una vez inyectada toda la solución, se dejaba la jeringa durante 10 min más para que difundiera bien. La jeringa se volvía a llenar con 1 μ l de solución de ácido kaínico y se lesionaba entonces el Area Preóptica del hemisferio cerebral opuesto, siempre siguiendo el mismo procedimiento. Debido a los efectos postoperatorios provocados por el ácido kaínico en varios animales se optó por aplicar lesiones electrolíticas en los gatos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15. Estas lesiones se realizaron con una pila voltaica inyectando 2 mA de corriente en cada uno de los sitios correspondientes al Area Preóptica durante un lapso de 2 minutos en cada caso.

Una vez realizadas las lesiones se procedía a tapar los orificios con cera para hueso y se colocaban los electrodos de tornillo y EMGs. Por último, se colocaba el

electrodo tripolar al cuerpo geniculado y la cánula al IV ventrículo fijandolas con acrílico dental. Una vez fija la cánula se retiraban las torres y se soldaban los electrodos a un conector tipo hembra de 15 entradas, siguiendo siempre un orden para la entrada de los polígrafos. Las entradas 1, 2, 3 y 4 eran soldadas a las cortezas anterior y posterior, las entradas 5 y 6 a los electrodos de movimientos oculares (MO), las entradas 7 y 8 a electromiogramas (EMG), y las entradas 9, 10 y 11 eran del electrodo tripolar para el registro de las ondas PGO.

Al finalizar, la herida y los alambres eran cubiertos con acrílico, dejando sólo expuesta la parte de entrada del conector y la cánula. Los gatos se dejaban recuperar de 6 a 8 días dependiendo del animal y se procedía a efectuar los registros polisomnográficos durante períodos de 8 horas procurando comenzar siempre a la misma hora del día.

La información obtenida de los registros era separada por horas a partir del inicio del registro. Dado que la velocidad de corrimiento del papel en el polígrafo siempre era de 2.5 mm/seg cada hora de registro se marcaba con la hora correspondiente de 2 en 2 minutos. Así al comienzo y final de cualquier fase del ciclo de sueño-vi-

gilia se apuntaba la hora a la que había sucedido. A la fase de vigilia se le designó como fase 1, al de sueño lento como 2 y al de movimientos oculares rápidos como 3. La información de los registros era vertida en un programa de computadora que proporcionaba la siguiente información: duración promedio, porcentaje y frecuencia de cada una de las fases del ciclo sueño-vigilia, así como el tiempo total de registro en minutos.

Una vez realizados los registros apropiados se perfundían los animales para obtener los cerebros y corroborar anatómicamente los resultados obtenidos electrofisiográficamente. Para la perfusión se preparaba 1 litro de formalina al 10% y 1 litro de solución salina al 0.9% con 0.2 ml (1000 U/L) de heparina para evitar la coagulación de la sangre. Se inyectaba al animal con 5 ml de anestésico (dosis letal) intraperitonealmente y cuando caía en anestesia se fijaba a una rejilla con el pecho y vientre expuestos hacia arriba, la piel del pecho era cortada así como el esternón para localizar el corazón, el cual se dejaba libre, se cortaba la aorta descendente y se hacía fluir una solución salina y después una solución al 10% de formol.

Una vez perfundido el animal, se procedía a extraer el cerebro utilizando gubias de varios tamaños y pinzas. Cuando el cerebro se encontraba liberado de la tapa craneal, se desprendía la duramadre, se cortaban los nervios ópticos y demás nervios y se separaba con un corte de la médula espinal. Finalmente el cerebro era extraído y

se cortaba dejando el area de lesion únicamente (Area Preóptica) en cubos de aproximadamente 2 cm por lado y posteriormente se dejaban en formalina al 10 % para que se fijaran.

Para realizar los estudios histológicos fueron utilizadas 2 técnicas de inclusión. La primera fue inclusión en parafina, en la que el tejido fue colocado en alcoholes graduales (40', 50', 60', 70', 80', 90', 95', y Absoluto) en el transcurso de tres días. En el 4o día el tejido se cambió a cloroformo dandole varios lavados con el mismo, y en el 5o día se cambió a parafina para ser incluido finalmente. En el microtomo de parafina los cortes que se realizaron fueron de 5 μ m de grosor.

La segunda técnica de corte fue por congelación, en la que el tejido cerebral era puesto a lavar en agua corriente durante aproximadamente media hora para eliminar la formalina. Posteriormente se dejaba en una solución al 30 % de sacarosa para evitar cristalización excesiva del tejido al momento de la congelación. A las 24 horas siguientes se preparaba el corte y se montaba en el Crióstato, haciendo los cortes a la temperatura de -12 °C. El grosor de los cortes en este aparato fueron de 20 μ m. Estas técnicas fueron aplicadas según el tipo de lesión del que se trataba.

La técnica de tinción utilizada fue la de Kluver - Barrera que tiñe diferencialmente a las fibras de los

cuerpos celulares en el tejido cerebral. Los cortes que se habían hecho en el microtómo de parafina eran desparafinados en xilol durante 15 y 10 minutos, cambiando el xilol y luego en alcohol absoluto durante 15 minutos más, posteriormente se pasaba al alcohol de 95° durante 10 minutos para finalmente introducir las laminillas con los cortes a las cajas de tinción con luxol. A partir de este paso, el procedimiento para cortes por congelación y parafina era el mismo. Las preparaciones permanecían en luxol durante toda la noche en un horno a 56°C. A la mañana siguiente se sacaban del colorante y se lavaban 2 minutos en alcohol de 96° dos veces, en seguida se lavaban en alcohol de 70° y posteriormente en agua destilada. En seguida los cortes se diferenciaban en carbonato de litio (LiCO_3) hasta que se obtenía el color deseado de las fibras, pasandose entonces al colorante violeta de cresilo. El tiempo en este colorante era muy variable por lo que había que revisar los cortes (cada 2 min) y el tiempo no era constante para determinar el grado de tinción. Finalmente, los cortes eran pasados nuevamente por alcoholes graduales hasta llegar a xilol y las preparaciones se montaban con bálsamo de Canadá. Los portaobjetos durante el proceso de corte de la preparación eran debidamente marcados y numerados. Una vez contando con las preparaciones se localizaba el área de la lesión.

RESULTADOS:

Los gatos registrados se dividieron prácticamente en 3 grupos, en los que difería el tipo de lesión, del 2 al 7 con ácido kaínico, del 8 al 11 con corriente eléctrica (2mA/2 min) y del 12 al 15 también con corriente eléctrica (3 mA/1min) pero a través de electrodos bipolares que se dejaron implantados para lesionar posteriormente a la operación.

Las diferencias en cuanto al tipo de lesiones surgieron a partir de la dificultad que presentaban los animales para recuperarse después de haber sido lesionados con ácido kaínico. Al despertar totalmente de la anestesia, generalmente al día siguiente, los gatos presentaban conductas agresivas seguidas de convulsiones y posteriormente morían a los 2 ó 3 días de la implantación, esto debido a la toxicidad de la solución. Por esta causa se decidió cambiar la lesión por la de tipo electrolítico.

De los animales implantados murieron cuatro que en orden de implantación fueron 3, 4, 6 y 7. El gato No. 11 perdió el capuchón a las 3 semanas de implantado y los datos de registro no pudieron ser incorporados. La cuenta de los animales comenzaba en el No. 2, ya que el primero se utilizó para ensayar la técnica de implantación únicamente.

Los resultados de los registros en los gatos restantes fueron los siguientes:

Se utilizaron 2 gatos como controles, los cuales presentaron valores aproximados uno con otro en cuanto al porcentaje de sueño MOR en cada registro, y sólo en un registro se observó una diferencia respecto a los otros en el porcentaje de vigilia y sueño lento.

Fase	gato 1	gato 2	gato 1	gato 2	X +/- D.S.
Vigilia	24-31	18-95	21-36	37-00	25.4 +/- 8.00
S. L.	52-39	48-91	53-06	39-35	48.42 +/- 6.30
MOR	23-30	32-14	25-38	23-65	26.11 +/- 4.11

Tabla 1: Porcentajes y Promedios de Vigilia, S L y MOR en registros de 8 horas de gatos control

Estos porcentajes se encuentran un poco elevados con respecto a los reportados en la literatura (alrededor de 19%), sin embargo fueron los que se tomaron como parámetros.

Las tablas 2 y 3 muestran los porcentajes de sueño MOR de los gatos con lesiones tanto kaínicas como electrolíticas. En el primer grupo (tabla 2) se observa que en los gatos 2, 5, 9 y 10 se encontró un incremento en la fase MOR en relación a los controles. En estos casos, los valores de las fases de vigilia y sueño lento no eran constantes entre los registros de cada animal, sin embargo las fases de MOR mostraron un rango más o menos aproximado.

El gato 8 por el contrario mostró una marcada disminución en la fase de MOR.

No- Registro	gato 2	gato 5	gato 8	gato 9	gato 10
1	: 31-0	: 29-53	: 9-12	: 34-24	: 34-8
2	: 32-34	: 32-37	: 9-29	: 26-44	: 26-17
3	:	: 36-56	: 9-65	: 34-99	: 38-74
4	:	:	: 7-68	: 32-61	: 34-72
5	:	:	:	: 37-33	: 25-86
6	:	:	:	: 39-65	:

Tabla 2: Porcentajes de sueño MOR en registros de 8 horas de los gatos 2, 5, 8, 9 y 10. Lesionados en Area Preóptica

El segundo grupo (tabla 3) se comparó contra su propio control (tabla 4) y los resultados fueron distintos para cada caso. El gato 12 observó un ligero incremento en la fase de sueño MOR después de efectuada la lesión, el gato 13 tuvo un ligero decremento, el animal número 14 mostró también una disminución del MOR más acentuada, y el gato 15 mostró aumento. Sin embargo, se trataba de un animal sumamente nervioso, en el cual sus valores controles de MOR se encontraban sumamente disminuidos. El incremento de MOR que este animal presentó después de la aplicación de la lesión, se encontraba todavía por debajo de los valores promedio para los controles de la tabla 1.

Registro	gato 12	gato 13	gato 14	gato 15
1	33-37	19-52	18-09	9-94
2	33-16	25-65	12-25	8-28
3	25-03	19-97	14-67	20-96
4	23-78	29-44	11-79	24-26
5	28-20	23-7	26-30	

Tabla 3: Porcentajes de sueño MOR en animales lesionados con electrodos permanentes

Registro	gato 12	gato 13	gato 14	gato 15
1	27-93	24-25	25-22	18-74
2	27-74	21-08	23-45	18-74
3	22-58	27-30	25-56	4-27
4	25-78	31-08	23-44	
5	25-73	31-48	19-39	

Tabla 4: Porcentajes y Promedios de sueño MOR en gatos sin lesión de Area Preóptica y con electrodos implantados permanentemente

El análisis estadístico de los resultados obtenidos (tabla 5) indicaron una disminución significativa del sueño MOR para los gatos 8 y 14 y un incremento para los gatos 2, 5, 9, 10 y 12. Los gatos 12 y 14 comparados contra sus propios controles (tabla 6).

Gato	Promedios y DS
2	31.67 +/- 0.94
5	32.82 +/- 3.53
8	8.93 +/- 0.86
9	34.21 +/- 4.53
10	32.05 +/- 5.75
12	29.51 +/- 3.64
13	23.64 +/- 4.76
14	16.62 +/- 5.96
15	15.86 +/- 7.94
Control	26.11 +/- 4.10

Tabla 5: Promedios y Desviaciones Estandar de los porcentajes de la fase de sueño MOR en gatos con Lesión (Química o Electro-lítica) del Area Preóptica

12	26 +/- 2.15
13	27 +/- 4.45
14	23.4 +/- 2.45
15	8.56 +/- 8.83

Tabla 6: Promedios y Desviación Estandar del sueño MOR en gatos sin lesiones del Area Preóptica.

Con base en los resultados obtenidos en el gato número 8 se procedió a la aplicación del VIP y a la realización de registros. Los resultados obtenidos de estos

registros no mostraron información concluyente sobre el efecto hipnogénico del VIP, exceptuando a uno de los 4 experimentos efectuados. Se realizaron registros controles sin VIP alternados con los del VIP, y como se puede apreciar en la tabla 7 este efecto pareció mas bien deberse a una recuperación paulatina del animal en los niveles de sueño, dado que éste llevaba 2 meses de experimentación desde que había sido implantado.

Fechas:	22/03:	29/03:	02/04:	08/04:	10/04:	12/04:	26/04:	10/05:
VIP :	9-85:	3-62:		20-55:		13-44:		:
S/VIP :	:	:	13-52:		14-91:		18-39:	22-8

Tabla 7: Porcentajes de sueño MOR por fechas de registros con VIP y sin VIP del gato No. 8. Con Lesión de Area Preóptica

Se trató de identificar la causa del aumento en la fase del sueño MOR de los gatos 2, 5, 9 y 10 y ver si este se debía al incremento en la duración o a la frecuencia de aparición a lo largo del ciclo sueño - vigilia durante los registros. En los registros de los gatos 2, 5 y 10, el incremento en las cantidades de sueño MOR se debieron principalmente al aumento en la frecuencia de aparición de éste. En la Tabla 7 se puede observar que la frecuencia de los registros controles osciló entre 16 y 21, con una duración promedio entre 5.5 y 7 min.

Los registros del gato No. 9 mostraron un comportamiento distinto al señalado para el 2, 5 y 10. En

este caso el aumento observado de sueño MOR se debió al incremento en la duración de cada una de estas fases manteniéndose la frecuencia similar al de los controles.

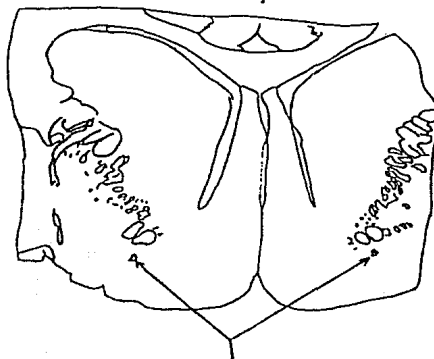
En el caso del gato No. 8 se observó que la hiposomnia se debió principalmente a la disminución de la frecuencia de aparición del MOR, y en menor grado a la disminución de la duración de este.

Gato	Duración X	Frecuencia
control:	6.27 +/- 0.88	18.6 +/- 2.5
2	4.06 +/- 0.61	36.5 +/- 4.9
5	5.18 +/- 0.65	27 +/- 1
8	4.3 +/- 1	10.5 +/- 2.38
9	9 +/- 1.2	18.33 +/- 2.42
10	5.44 +/- 0.44	28 +/- 4.24

Tabla 8: Promedios de la Duración y Frecuencia de sueño MOR de los registros polisomnográficos de gatos con lesiones de Area Preóptica

En la histología realizada posteriormente se encontró que las lesiones tenían una ubicación que distaba del Area Preóptica. La coordenada anteroposterior se ubicaba en un intervalo entre 16 y 17 y la vertical, igualmente, se encontró desplazada hacia arriba dejandola ubicada entre las coordenadas -3.5 y -2.5.

Hemisferio
Derecho

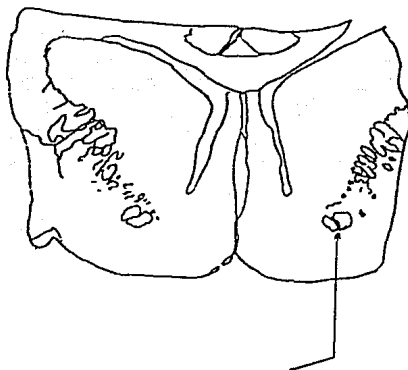


Hemisferio
Izquierdo

Lesión con Acido Káínico

Figura 1: Lesiones con Acido Káínico en el gato No. 5

Hemisferio
Derecho



Hemisferio
Izquierdo

Lesión con Acido Káínico

Figura 2: Lesiones con Acido Káínico en el gato No. 2

En la histología de los gatos 2 y 5 las lesiones con ácido kaínico se apreciaban como 2 áreas de tejido con fibras y orificios en los que se encontraban los cuerpos celulares, que era lo que se esperaba en este tipo de lesión (figuras 1 y 2). En los gatos 9 y 10, debido a la lesión electrolítica, lo que se encontró en el sitio de lesión fueron oquedades con gliosis muy marcadas y con un mayor tamaño que las de ácido kaínico.

La histología del gato No. 8 corroboró los resultados electroencefalográficos. Se encontró que el hemisferio izquierdo contenía una lesión al nivel del Area Preóptica, y se observó claramente una gliosis por el tipo de lesión electrolítica (figura 3), sin embargo la lesión no se encontró ubicada bilateralmente, es decir, la lesión del lado derecho no correspondía al sitio del Area Preóptica por lo que suponemos que a ello se debió que el efecto de hiposomnia en este gato no fuera total. Al realizar la perfusión se encontró también la razón por la que el VIP no hizo efecto en los experimentos en que se aplicó, ya que la localización de la cánula guía al IV ventrículo no era la adecuada. En realidad esta nunca quedó situada en el IV ventrículo, debido a que en el ángulo que entraba cuando era implantada quedaba bloqueado su paso hacia el IV ventrículo por la tienda, y las primeras veces que sucedía esto en las implantaciones, la cánula era recorrida de su coordenada original hasta 2 mm quedando totalmente fuera de lugar.

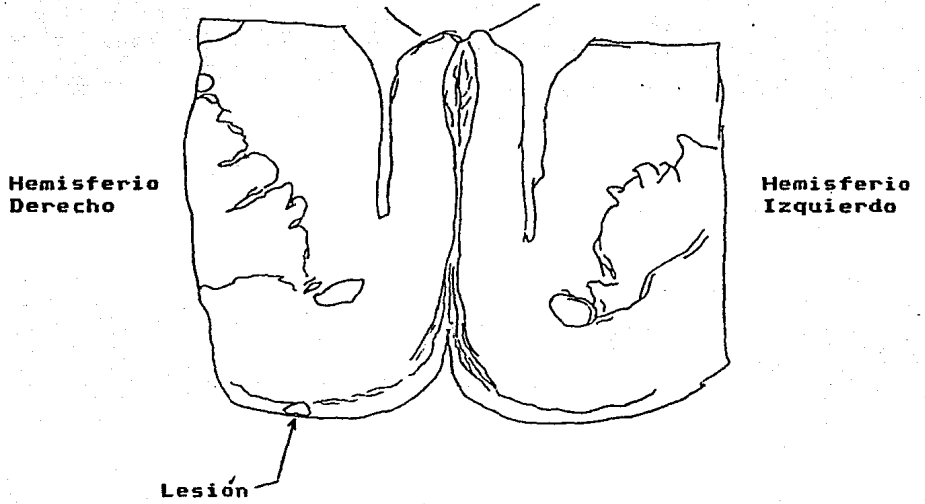


Figura 3: Lesión Electrolytica en el gato No. 8

Posteriormente se calcularon nuevas coordenadas y se corrigió este problema. Cabe hacer notar que las coordenadas de implantación fueron proporcionadas por el laboratorio en el que trabaja el Dr. McGinty y que éstas difirieron en cuanto a las encontradas con la histología. Fue posteriormente que el cálculo para la cánula guía se hizo en el laboratorio, y se localizaron las coordenadas adecuadas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES:

Las perspectivas del trabajo que se realizó cambiaron drásticamente como puede observarse en los resultados presentados anteriormente. El incremento en los porcentajes y por lo tanto en los promedios de sueño MOR fueron contrarios al efecto que se esperaba de la lesión del Area Preóptica. En un inicio se pensó en desechar a los animales que no presentaran el efecto de insomnio desde los primeros registros, pero como se trabajaba con 3 ó 4 gatos a la vez la repetición del efecto de hipersomnia en éstos hizo que se continuara haciendo los registros.

Las diferencias que existen en las ubicaciones de las lesiones en los distintos gatos van de acuerdo con los resultados obtenidos electroencefalográficamente.

Aunque no en todos los casos se encontró un aumento significativo en las fases de sueño MOR, se puede decir que hubo una tendencia a éste. Con base en lo revisado en la literatura, los datos obtenidos de los registros no coinciden con lo reportado por los distintos autores, pues se considera al MOR como un proceso activo que no es posible de reproducir a partir de lesiones en el sistema nervioso central (Moruzzi, 1964; McGinty y Beahm, 1984).

Aunque las lesiones no son exactas, en la mayoría de los casos se encuentran localizadas en o cerca del nucleus accumbens y el fenómeno de incremento de sueño MOR

podría deberse a esta localización.

Parecería ser que de alguna manera lesionando esta área el mecanismo que regula al MOR, o determina sus cuotas diarias altera su nivel basal o disminuye en su control permitiendo que ocurran un mayor número de eventos MOR que en condiciones normales.

Por otro lado, si consideramos que el sueño es un sistema tan diverso como ha mostrado ser y con tanta importancia en la sobrevivencia de los organismos (McGinty y Beahn, 1984) entonces podríamos considerarlo como un sistema multirreceptor que puede ser activado por la alteración de alguna señal que sea consecuencia de un desequilibrio fisiológico en el organismo. La lesión por consiguiente del nucleus accumbens puede no intervenir o estar relacionada directamente con los mecanismos del sueño.

Cabe hacer notar que en los casos que se aplicaron lesiones electrolíticas más intensas los efectos no fueron lo significativos que en los casos que se aplicó ácido kaínico o lesiones electrolíticas menores. Como se mencionó en la pagina 51, las lesiones electrolíticas tienen la desventaja de destruir tanto cuerpos celulares como axones de paso y quizás la gran destrucción de axones de paso no favoreciera la observación del incremento de MOR. Sin embargo los datos arrojados por las lesiones de ácido kaínico y las pequeñas electrolíticas no indican que se deba

a tal causa la diferencia existente entre esos registros.

Actualmente se sigue trabajando con ácido kaínico en el laboratorio y la recuperación de los gatos no es satisfactoria, dado que aún se presentan las muertes después de convulsiones y conductas agresivas de estos animales.

Otro enfoque que podría darse al estudio del VIP como sustancia que juega un papel importante en el ciclo sueño-vigilia podría ser el de la extracción de líquido cefalorraquídeo del IV ventrículo durante el ciclo sueño-vigilia de los gatos por el método de la cánula push-pull. Un análisis bioquímico podría indicar los niveles de VIP que se encuentran en cada una de las distintas fases del ciclo.

Aunque se ha planteado que este tipo de análisis presenta problemas serios porque la extracción a través de la cánula push-pull provee cantidades muy bajas de material (Drucker-Colin, 1981), probablemente el hecho de que se tenga identificada a la sustancia que se quiere purificar simplifique dicha tarea.

Para seguir la misma técnica en el estudio del VIP con lesiones del área preóptica se sugiere hacer una implantación con las coordenadas que el atlas estereotáxico indican para el área preóptica. La lesión inicial se sugiere que sea electrolítica para que sea fácilmente distinguible.

Una vez que el animal se recupere de la implantación se puede proceder a realizar la histología para determinar la ubicación de las lesiones. De esta manera se pueden ir mapeando las coordenadas del área preóptica por la técnica de ensayo y error.

La introducción de la cánula al IV ventrículo se debe de hacer evitando que sea de manera vertical debido a la obstrucción que presenta la tienda. Esta debera de ser introducida diagonalmente desde la nuca en un ángulo de 45°.

Una vez obtenidas las coordenadas entonces se estará en posición de trabajar con grupos de gatos en números de 3 a 4 a la vez.

En conclusión los datos obtenidos de los registros polisomnográficos y del análisis histológico indicaron que el efecto de insomnio no se logró debido a la localización de la lesión en el cerebro.

Comparando los datos de los registros con los cortes histológicos el incremento del MOR parece deberse a la localización de la lesión que abarca la region del Nucleus Accumbens del cerebro.

Pareceria ser que de alguna manera, lesionando esta área el mecanismo que determina las cuotas diarias de sueño altera su nivel basal elevandolo y permitiendo que ocurran un mayor número de eventos MOR que en condiciones normales.

BIBLIOGRAFIA:

Adam, K. y Oswald, I. (1977). Sleep is for tissue restoration. J. R. Coll. Physicians Lond, 11:376-388.

Allison, T. y Van Twyver, H. (1970). The evolution of sleep. Nat. Hrst. 79:59-65.

Assaf, S. A., y Miller, J. J. (1978). A comparison of the effects of electrolytic and kainic acid-induced lesion of the septal area on hippocampal electrical activity. In: Canadian Federation of Biological Sciences, London, Ontario, June 20-23 (abstract).

Bantini, C., Moruzzi, G., Palestini, M., Rossi, G. F., Zanchetti, A. (1958). Science, 128, 30.

Berger, R. J. (1975). Bioenergetic functions of sleep and activity of rhythms and their possible relevance to aging. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 34:97-102.

Brazeau, P., Vale, W., Burgess, R., Ling, N., Blutcher, M., Rimer, J., Guillemin, R., (1973). Hypothalamic peptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science 179: 77-79.

Bryant, M. G., Polak, J. M., Modlin, I., Bloom, S. R., Abou-querque, R. H. y Pearse, A. b. E. (1976). Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. Lancet, 991-993.

De Andres, I., Gutierrez-Rivas, E., Nava, E., Reinoso-Suarez, F. (1976) Independence of sleep-wakefulness cycle in an implanted head "encephale isole". Neurosci Lett. 2: 13-18.

Dement, W. (1958). The occurrence of low voltage, fast electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 10:291-296.

Dement, W. y Kleitman, N. (1975). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility and dreaming. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 9:673-690.

Dorbyshire, A. J., Rempel, B., Forbes, A. y Lambert, G. F. (1936). The effects of anesthetics on action potentials in the cerebral cortex of the cat. Amer. J. Physiol., 116:577-596.

Drucker-Colin, R. R., Rojas-Ramirez, J. A., Vera-Trueba, J., Monroy-Ayala, G. y Hernandez-Peon, R. (1970). Effect of crossed-perfusion of the midbrain reticular formation upon sleep. Brain Res., 23:269-273.

Drucker-Colin, R. R. (1973). Crossed perfusion of a sleep inducing brain tissue substance in conscious cats. *Brain Res.*, 56:123-134.

Drucker-Colin, R. R., Spanis, L. W., Cotman, C. W. y McGaugh, J. L. (1975). Changes in protein in perfusates of freely moving cats: relation to behavioral state. *Science*, 187:963-965.

Drucker-Colin, R. R., Gutierrez, M. C. (1976). Effects of forebrain lesions on release of proteins from the midbrain reticular formation during the sleep-wake cycle. *Exp. Neurol.*, 52:339-344.

Drucker-Colin, R. R. y Spanis, L. W. (1976). Is there a sleep transmitter?. *Prog. Neurobiol.*, 6:1-22.

Drucker-Colin, R. R., Zamora, J., Bernal-Pedroza, J., Sosa, B. (1979). Modification of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors. *Exp. Neurol.*, 63:458-463.

Drucker-Colin, R. R., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gutierrez, M. C., Dreyfus-Cortes, G. (1980). Immunological approach to the study of neurohumoral sleep factors: effects on REM sleep of antibodies to brain stem proteins. *Exp. Neurol.*, 69:563-575.

Drucker-Colin R. 1981. Endogenous Sleep Peptides
Psychopharmacology of Sleep. Ed. by David Wheatley. Raven Press, New York. p 53 - 72.

Drucker-Colin, R. y Valverde-R., C. (1983). Endocrine and peptide functions in the sleep-waking cycl.

Drucker-Colin R., Bernal-Pedroza J., Fernandez-Cancino F. y Oksenberg A. 1984. Is Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) a Sleep Factor?. *Peptides*, 5: 837 - 840.

Durle, D. J., Adam, K., Flynn, I. W. y Oswald, I. (1978). Cellular energy change and metabolic regulation during sleep and wakefulness. *Sleep Res.* 7:66.

Eiden, L. E., Nilaver, G. y Palkowitz, M. (1982). Distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat brain stem nuclei. *Brain Res.* 231:472-477.

Ekstrand, B. R., Barrett, R. R., West, J. N. y Maier, W. G. (1977). The effect of sleep on human long term memory. In *Neurobiology of sleep and memory*. Edited by R. R. Drucker-Colin and J. L. McGaugh. Academic Press, New York, pp. 419-443.

- Fencf, V., Koski, G. y Pappenheimer, J. R. (1971). Factors in cerebrospinal fluid from coats that affect sleep and activity in rats. *J. Physiol. (Lond.)*, 216:565-589.
- Fishbein, W. y Gutwein, B. (1977). Paradoxical sleep and memory storage processes. *Behav. Biol.* 19:425-462.
- Fisher, L.A., Spinderl, E. R. y Fernstiom, J. D. (1980). Nonapeptide content of the bovine pineal gland. 66th. Annual Meeting of Endocrine Society, Washington, pp. 103, Abstract 11.
- Fure, K., Ogren, S.O., Agnati, L., Jonhson, G. (1978). Further evidence that methergoline is a central 5-hidroxi-tryptamine receptor blocking agent. *Neurosci Lett.*, 9: 195-200.
- Hartmann, E. (1973). *The Functions of Sleep*. Yale University Press, New Haven, Conn., p. 478.
- Havlicek, V., Resek, M., Friesen, H. (1976). Somatostatin and thyrotropin releasing hormone: central effect on sleep and motor system. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 4:455-459.
- Hernandez-Peon, R., Chavez-Ibarra, G., Morgane, P. y Timolarea, C. (1963). Limbic cholinergic pathways involved in sleep and emotional behavior. *Exp. Neurol.* 8:93-111.
- Hess Jr., R., Koella, W. P. y Akert, K. (1953). Cortical and subcortical recordings in natural and artificially induced sleep in cats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 5:75-90.
- Hess, W. R. (1954). The diencephalic sleepcenter. In *brain Mechanisms and Consciousness*. Edited by J. Delafresnaye. Chas. C. Thomas, Springfield, Ill., p.286.
- Horne, J. A. (1978). Areniem of the biological effects of total sleep deprivation in man. *Biol. Psychol.* 7:55-102.
- Horne, J. A. (1980). "Restitution" and sleep: some qualifications. *Sleep Res.* 9:19.
- Jouvet, M. (1961). Telencephalic and thombencephalic sleep in the cat. In G.E.W. Wolstenholme and M. O'connor (editors), *the nature of sleep*. Churchill, London, 1961: 188-208.
- Jouvet, M. (1969). Biogenic Amines and the States of Sleep. *Science* 163: 32 - 40.

Jouvet, M. (1978). Does a genetic programming of the brain occur during paradoxical sleep. In: Duser, H. Rougent-Buser, M. (eds). Cerebral correlates of conscious experience. Elsevier, Amsterdam, pp. 245-261.

Kaji, H., Chichara, K., Ninamitani, N., Kodama, H., Yanaihara, H. y Fujita, T. (1983). Release of vasoactive intestinal polypeptide into the cerebrospinal fluid of the fourth ventricle of the rat: Involvement of cholinergic mechanism. Brain Res. 269: 303-310.

Karacan, I., Rosenbloom, A. L., Williams, R. L., Finley, W. W., Nirsch, C. J. (1971). Slow wave sleep deprivation in relation to plasma growth hormone concentration. Behav. Neurophysiatry., 2:11-14.

Kincl, F. A., Chang, C. C. y Zbuzkova, V. (1970). Endocrinology 87: 38-42.

Kroll, F. W. (1933). Veber das vorko von ubertragbarren schlafzerzeugenden stoffen im hirn schlafendertiere. Z. Ges. Neurol. Psychiatr., 146: 208-218.

Krueger, J. M., Pappenheimer, J. R. y Karnovsky, M. L. (1978). Sleep promoting factor S: purification properties. Proc. Natl, Acad. Sci. U.S.A., 75: 5235-5238.

Legendre, R. y Pieron, H. (1910). Le probleme des facteurs du sommeil: resultats d-injections vasculaires et intracerebrales des liquides insomniaques. C. R. Soc. Biol. (Paris), 68: 1077-1078.

Legendre, R. y Pieron, H. (1911). Du developpment au cours de l'insomnie experimental, des proprietes hypnotoxiques de humeurs en relation avec le besoin croissant de sommeil. C. R. Soc. Biol. (Paris), 70: 190-192.

Legendre, R. y Pieron, H. (1912). De la propriete hypnotoxique des humeurs developpes au cours d'une veille prolongee. C. R. Soc. Biol. (Paris), 72:210-212.

Lenard, H. G. y Schulte, F. J. (1972). Polygraphic sleep study in cranopagus tawins. J. Neurosurg. Psychiatry, 35: 756-760.

Loren, I., Emson, P. C., Fahrenkrug, J. (1979). Distribution of VIP in the rat and mouse brain. Neuroscinece 4: 1953-1976.

McGaugh, J. L., Jensen, R. A. y Martinez, J. V. (1979)- Sleep, brain state and memory. In the functions of sleep. Edited by R. R. Drucker-Colin, M. Shkurovick and M. B. Sternman. Academic Press, New York, pp. 295-301.

McGeer, P. L., McGeer, E. G. y Hattori, T. (1978)- Kainic acid as a tool in neurobiology. In kainic acid as a tool in neurobiology. Edited by E. G. McGeer et al. Raven Press, New York. pp. 123-138.

McGinty D.-J. (1971)- Encephalization and the neural control of behavior. In Brain Development and Behaviour. Edited by M. B. Serman, D. J. McGinty and A. M. Adnolfi. Academic Press. New York. pp. 335-357.

McGinty, D. J., Harper, R. M. y Fairbanks, M. K. (1974). Neuronal unit activity and the control of sleep research. Edited by E. D. Weitzman. Spectrum Publications, New York. pp. 173-216.

McGinty D.-J. y Beahn E.-K. 1984. Neurobiology of Sleep. In Sleep and Breathing. Ed: N.-A. Saunders and C.-E. Sullivan. Marcel Dekker. New York. pp. 1-58.

Meddis, R. (1975). On the function of sleep. Anim. Behav. 23: 676-691.

Menaker, M. (1974). In "the neurosciences: third study program". Edited by F. O. Schmidt and P. G. Worden. MIT Press, Cambridge, Mass. pp. 479-489.

Mendelson, W. B., Seater, S., Gold, P. y Gillin, J. C. (1980). The effect of growth hormone administration on human sleep: a dose-response study. Biol. Psychiatry, 15: 613-618.

Mendelson, W. B., Gillin, J. C. y Wyatt, R. J. (1981). Where is the hypnotoxin ?. Sleep Res. 10:94.

Monnier, M., Koller, T., Graber, S. (1963) Humoral Influences of induced sleep and arousal upon electrical brain activity of animals with crossed circulation. Exp. Neurol. 8: 264-277.

Monnier, M. y Hosli, L. (1964)- Dialysis of sleep and waking factors in blood of the rabbit. Science, 146:796-798.

Monnier, M. y Hosli, L. (1965)- Humoral transmission of sleep and wakefulness. Itemodialysis of a sleep inducing humor during stimulation of the thalamic somnogenic area. Pflugers Arch, 282:60-75.

- Monnier, M. y Hatt, A. M. (1971)- Humoral transmission of sleep- v. new evidence from production of pure sleep hemodiatyzate. Pfluegers Arch., 329: 231-234.
- Monnier, M. Hatt, A. M., Cueni, L. B. y Schoenenberg, F. A. (1972)- Humoral transmission and assessment of a hypnogenic fraction of "sleep dialysate" (factor delta). Pfluegers Arch., 331:257-265.
- Monnier, M., Dudler, L. y Schoenenberg, F. A. (1973). Humoral transmission of sleep- VIII- Effects of the "sleep factor delta" on cerebral, motor and visceral activities. Pfluegers Arch., 345: 23-35.
- Monnier, M., Dudler, L., Gachter, R., Maier, P. F., Tobler, H. J. y Schoenenberg, F. A. (1977). The delta sleep inducing peptide (DSIP): comparative properties of the original and synthetic nonapeptid Experientia., 33: 548-552.
- Moruzzi, G., y Magoun, H.W. (1949). Brainstem reticular formation and activation of the EEG. Electroenceph- clin- Neurophysiol. 1: 455-473.
- Moruzzi, G. (1964). Reticular Influences on the EEG. Electroenceph- Clin- Neurophysiol., 16: 2-17.
- Moruzzi, G. (1966). The functional significance of sleep with particular regard to the brain mechanisms underlying consciousness. In the Brain and Conscious Experience. Edited by J. C. Eccles Springer, New York., pp. 345-388.
- Moruzzi, G. (1972). The sleep-waking cycle. Ergbn. Physiol., 64: 1-165.
- Nagasaki, H., Irik, M., Indue, S. y Vchizona, K. (1974). The presence of a sleep promoting material in brain of sleep-deprived rats. Proc. Jpn. Acad. 50: 241-246.
- Nagasaki, H., Irik, M. y Vchizona, K. (1976). Inhibitory effect of the brain extract of sleep-deprived rats (BE-SAR) on the spontaneous discharges of cray fish abdominal ganglion. Brain Res., 109: 202-205.
- Oswald, I. (1970). Sleep the great restorer. New Scientist 46: 170-172.
- Oswald, I. (1974). Sleep- Penguin Books, Harmondsworth, Middlesex, p- 215.

- Pappenheimer, J. R., Miller, T. B., Goodrich, C. A. (1967). Sleep promoting effects of cerebrospinal fluids from sleep-deprived goats. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58: 513-517.
- Pappenheimer, J. R., Koski, G., FencI, V., Karnovsky, M. L., y Krueger, J. (1975). Extraction of sleep promoting factors from cerebrospinal fluid and from brains of sleep deprived animals. *J. Neurophysiol.*, 38: 1299-1311.
- Pavel, S., Goldstein, E., Ghinea, E., y Calb, M. (1977)a. Chromatographic evidence of vasotocin biosynthesis by cultured pineal ependymal cells from rat fetuses. *Endocrinology*, 100: 205-208.
- Pavel, S., Psatta, y Goldstein, R. (1977)b. Slow wave sleep induced in cats by extremely small amounts of synthetic and pineal vasotocin injected into the third ventricle of the brain. 2: 251-254.
- Pavel, S. (1979). Pineal vasotocin and sleep: involvement of serotonin containing neurons. *Brain. Res. Bull.*, 4: 731-734.
- Pearlman, C. A. (1971). Latent learning impaired by REM sleep deprivation. *Psychonom. Sci.* 25: 135-137.
- Pieron, H. (1913). *Le probleme Physiologique de sommeil.* Masson, Paris.
- Polc, P., Schneebergen, J. y Haefely, W. (1978). Effect of the delta sleep-inducing peptide (DSIP) on the sleep-wakefulness cycle of cats. *Neurosci. Lett.*, 9: 33-36.
- Rezek, M., Haulicek, V., Hughes, K., Friesen, H. (1976). Cortical administration of somatostatin (SRIF): effect on sleep and motor behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 5: 73-77
- Ringle, D. A., y Herndon, B. L. (1968). Plasma dialyzates from sleep-deprived rabbits and their effect on the electrocorticogram of rats. *Pfluegers Arch.*, 303: 344-349.
- Ringle, D., y Herndon, B. (1969). Effects on rats of CSF from sleep-deprived rabbits. *Pfluegers Arch.*, 306: 320-328.
- Riou, F., Caspuglio, R., y Jouvett, M. (1982). Endogenous peptides and sleep in the rat: III the hypnogenic properties of vasoactive intestinal polypeptide. *Neuropeptides*. 2: 265-277.

Roberts, G. W., Woodhams, J. M. (1980). VIP in the rat brain: evidence for a major pathway linking the amigdala and hypothalamus via the stria terminalis. *Histochemistry*. 65: 103-119.

Roberts, W. W., y Robinson, T. C. L. (1969). Relaxation and sleep induced by warming of preoptic region and anterior hyputhalamus in cats. *Exp. Neurol.* 25: 282-294.

Roffwarg, H. P., Muzio, J. N., y Dement, W. C. (1966). Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science*. 152: 602-619.

Rojas-Ramirez, J. A., Aguilar-Jimenez, E., Posada-Andrews, A., Bernal-Pedroza, J., y Drucker-Colin, R. R. (1977). The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep-wake cycle of rats. *Psychopharmacology*, 53: 147-150.

Rossi, G. F., Favale, E., Hara, T., Giussani, A. (1961). And underlying deep sleep in the cat. *Arch. Ital. Biol.*, 99: 270-292.

Sassin, J., Parker, D. C., Johnson, L. C., Rossman, L. G. Male, J. W., Gotlin, R. W. (1969). Effects of slow wave sleep deprivation in human growth hormone release in sleep: preliminary study. *Life Sci.* 8: 1299-1307.

Schmidt, F. O. (1962). In *macro-molecular specificity and biological memory*. Edited by F. O. Schmidt. MIT. Press, Cambridge.

Schnedorf, J. G., y Ivy, A. C. (1939). An examination of the hypnotoxin theory of sleep. *Am. J. Physiol.*, 125: 191-205.

Schoenenberg, G. A., y Monnier, M. (1977). Characterization of a delta-election encephalogram (sleep) inducing peptide. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 1282-1286.

Schoenenberg, G. A., Maier, P. F., Tobler, H. J., Wilson, K., y Monnier, M. (1978). The delta EEG (sleep) inducing peptide (DSIP). 1. Aminoacid analysis, sequence, synthesis and activity of the nonapeptide. *Pfluegers Arch.*, 378: 119-129.

Sterman, M. B., y Clemente, C. D. (1962). Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Exp. Neurol.* 6: 103-117.

Sterman, M. B., Krauss, T. K., Lehmann, D., y Clemente, C. D. (1964). Fed. Proc., 23: 209.

Sterman, M. B. (1979). Ontogeny of sleep implications for function. In the functions of sleep. Edited by R. Drucker-Colin, M. Shkurovich, and M. B. Sterman. Academic Press, New York, pp: 207-232.

Sterman, M. B., y Shouse, M. N. (1985). Sleep "centers" in the brain: the preoptic basal forebrain area revisited. In Brain Mechanisms of sleep. Edited by D. J. McGinty et al. Raven Press, pp: 277-297.

Stern, W. C., Milles, F. P., Cox, R.H., y Marckel, R. P. (1971). Brain norepinephrine and serotonin levels following REM sleep-deprivation in the rat. Psychopharmacology. 22: 50-55.

Stern, W. C., Jalowice, E., Shabshalowitz, H., y Morgane, P. J. (1975). Effects of growth hormone on sleep-waking patterns in cats. Horm. Behav., 6: 189-196.

Stern, W. C., y Morgane, P. J. (1977). Sleep and memory: effects of growth hormone on sleep, brain biochemistry and behavior. In: Neurobiology of sleep and memory, edited by R. R. Drucker-Colin and J. L. McGaugh, pp-373-410. Academic Press. New York.

Snyder, F. (1966). Toward an evolutionary theory of dreaming. Amer. J. Psychiat. 123: 121-142.

Takahashi, Y., Ebihaba, S., Nakamura, Y., y Takahashi, K. (1978). Sleep related growth hormone secretion in dogs after 8 hr. forced wakefulness. In: Integrative control functions of the brain. Edited by N. Tsukahara, K. Kubata, and K. Yagi, pp. 389-391. Elsevier, Amsterdam.

Takemoto, T. (1978). Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory aminoacid. In kainic acid as a tool in neurobiology. Edited by E. G. McGeer et al. Raven Press, New York. pp: 1-24.

Tata, J. R. (1968). Hormonal regulation of growth and protein synthesis. Nature 219: 331-337.

Tobler, I., y Borbely, A. (1980). Effect of delta sleep inducing peptide (DSIP) and arginine vasotocin (AVT) on sleep and motor activity in the cat. Waking sleeping, 4: 139-153.

Vogel, G-W. (1975). A review of REM sleep deprivation. Arch-Gen. Psychiatry, 32: 749-761.

Vogel, G-W. (1979). A motivational function of REM sleep. In the functions of sleep. Edited by R. Drucker-Colin, M. Mhkurovich, and M-B. Sterman. Academic Press, New York, pp. 233-250.

Walker, J-M., Goltzbach, S-F., Berger, R-J., y Heller, H-C. (1977). Sleep and hibernation in ground squirrels (cirellus spp): electrophysiological observations. Am. J. Physiol. 233: R213-R221.

Walker, J-M., Garber, A., Berger, R-J., y Heller, H-C. (1979). Sleep and estivation (shallow topor): continuous processes of energy conservation. Science 204: 1098-1100.

Walker, J., y Berger, R. J. (1980). Sleep as an adaptation for energy conservation functionally related to hibernation and shallow topor. In adaptative capabilities of nervous system, vol. 53. Edited by P. S. McConnell, G. J. Boer, H. I. Romijn, N-E. Van de Poll and M-A. Corner. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 255-278.

Wang, J-Y., Yaksh, T-L., y Go, V-W. (1983). In vivo studies on the basal and evoked release of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide from cat cerebral cortex and periventricular structures. Brain Research, 280: 105-117.

Webb, W. B. (1974). Sleep as an adaptative response. Percept. Motor Skills. 38: 1024-1027.

Webb, W. B. (1975). Sleep the gentle tyrant. Prentice-Hall, Englewood, NI.

Zepelin, H., y Rechtschaffen, A. (1974). Mammalian sleep, longevity and energy metabolism. Brain Behav. Evol. 10: 425-470.

Zepelin, H. (1980). REM sleep and the altricial precocial dimension. Sleep Res. 9:114.