

Medición de acetilcolina y patrones relacionados al sueño

Alfonso Alfaro-Rodríguez, * Rigoberto González-Piña, ** Antonio Bueno-Nava, ***
Alberto Ávila-Luna, * Emilio Arch-Tirado ****

Resumen

Introducción: la acetilcolina es un neurotransmisor esencial en el sistema nervioso central, ya que tiene un efecto sobre el sueño, la memoria y aprendizaje. La Microdiálisis intracerebral es una técnica quirúrgica *in vivo* que se usa para medir la concentración de sustancias en el espacio extracelular.

Material y métodos: las ratas fueron implantadas estereotáxicamente con una cánula de microdiálisis dirigida al área preóptica medial hipotalámica y con electrodos bipolares para obtener registros de sueño simultáneamente con las muestras de microdiálisis durante 24 horas expuestas al aire limpio seguido por 24 horas de exposición a ozono. Las fracciones de microdiálisis fueron inyectadas al sistema de cromatografía.

Resultados: los resultados mostraron que el sueño paradójico y la vigilia disminuyó 54.2% y 27.9% respectivamente, mientras que el sueño de ondas lentas aumentó 35.1% durante la exposición al ozono y disminución concomitante de acetilcolina extracelular de 56.2% fue observada durante la fase de luz y oscuridad.

Conclusión: el método quirúrgico empleado usando la microdiálisis intracerebral y la electroencefalografía permiten la cuantificación de acetilcolina extracelular y simultáneamente con los patrones relacionados con el sueño. Proponemos que la disminución en el sueño paradójico es la expresión conductual de la alteración de la modulación colinérgica, y que los efectos post exposición observados en el área preóptica medial hipotalámica pueden ser explicados en base a la participación del hipotálamo en el ciclo sueño-vigilia.

Palabras clave: acetilcolina, microdiálisis, cromatografía líquida de alta resolución, electroencefalografía.

Abstract

Introduction: Acetylcholine is an essential neurotransmitter in the central nervous system as it has an effect on sleep, memory and learning. Intracerebral microdialysis is an *in vivo* surgical technique that is used to measure the concentration of substances in the extracellular space.

Methods: The rats were stereotaxically implanted with microdialysis cannulae guided to the hypothalamic medial preoptic area and bipolar stainless steel electrodes to obtain sleep records simultaneously with microdialysis samplings during 24 hours exposed to clean air followed by 24 hours of exposure to ozone. Microdialysis fractions were injected into chromatograph system.

Results: Results showed that paradoxical sleep and wakefulness decreased by 54.2% and 27.9%, respectively, while slow wave sleep increased by 35.1% during the ozone exposure phase and a concomitant decrease of extracellular acetylcholine of 56.2% was observed during the light-dark phase.

Conclusion: That surgical method employed using electroencephalography and intracerebral microdialysis allows the quantification of extracellular acetylcholine and simultaneously with patterns related to sleep. We propose that the decrease in paradoxical sleep is the behavioral expression of disruptions of cholinergic modulation and, that post-exposure effects observed in the hypothalamic medial preoptic area can be explained on the basis of the hypothalamic role in the sleep-wake cycle.

Key words: Acetylcholine, microdialysis, high-performance liquid chromatography, electroencephalography.

* Laboratorio de Neuroquímica.

** Laboratorio de Neuroplasticidad

*** Laboratorio de Cromatografía y Microdiálisis.

**** Laboratorio de Bioacústica

Instituto Nacional de Rehabilitación.

Correspondencia:

Alfonso Alfaro Rodríguez

Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación.

Calz. México-Xochimilco 289 Col. Arenal de Guadalupe

Deleg. Tlalpan. C.P. 14389. D.F. México.

Tel. (55) 59991000 ext. 19303.

Correo electrónico: alfa1360@yahoo.com.mx

Recibido para publicación: 22-12-2011

Aceptado para publicación: 02-04-2012

Introducción

La medicina del sueño requiere del conocimiento de la neurobiología para establecer estrategias durante el tratamiento del trastorno del sueño, como el tipo de fármacos que deben ser utilizados después de una lesión cerebral.^{1,2} Se ha reportado que la administración de fármacos antidepresivos a los pacientes con daño cerebral, se les reduce el sueño paradójico.³⁻⁵

Los estudios sobre los circuitos neuronales y la neuroquímica del sueño, han mostrado que los sistemas neuroquímicos, como el colinérgico, participa en la vigilia y el sueño paradójico.⁶

La determinación de los niveles basales de acetilcolina sigue siendo un desafío para los neuroquímicos, y las mediciones de rutina por lo general requieren la administración de un inhibidor de la acetilcolinesterasa, como la neostigmina.⁷ Se han desarrollado diferentes métodos simultáneos de cuantificación bioquímica y electroencefalográfica, dentro de los cuales se encuentran actualmente la microdiálisis y la electroencefalografía. La técnica quirúrgica de microdiálisis es un método que nos proporciona un instrumento de medición confiable y muy sensible para la medición de neurotransmisores a nivel intracerebral.⁸

Para cuantificar simultáneamente la actividad bioquímica y electroencefalográfica, se deben registrar las áreas relacionadas con los estados de vigilia. Se ha mostrado, que las estructuras encargadas del mantenimiento del sueño paradójico, se encuentran en el área de los núcleos tegmentales colinérgicos laterodorsal y pedunculopontino.⁹ Por otro lado, se propone la hipótesis de la "interacción recíproca", en donde el tallo cerebral contiene dos poblaciones de neuronas; una población colinérgica, que es activa durante el sueño paradójico, a la cual se le llama "MOR-on", y otra población serotoninérgica que es de tipo inhibitoria, y se le conoce como "MOR-off".^{9,10} También, se sabe que los mecanismos que contribuyen a la generación del sueño paradójico se localizan en el área pontina del tallo cerebral.^{9,11} Se ha mostrado que las lesiones provocadas en los núcleos tegmental laterodorsal y tegmental pedunculopontino, reducen la ocurrencia de ondas pontogeniculooccipitales y el sueño paradójico.⁷

El área preóptica medial del hipotálamo juega un papel importante en la regulación de diferentes funciones fisiológicas, particularmente el control del sueño y la temperatura cortical.¹² Estas estructuras son innervadas por gran cantidad de proyecciones histaminérgicas¹³ y serotoninérgicas¹⁴ provenientes principalmente del núcleo rafe dorsal. Además, el área preóptica medial del hipotálamo recibe aferencias de los núcleos colinérgicos del puente¹⁵ y es importante enfatizar su relación con los centros reguladores de los ritmos circádicos.

Se ha reportado que la lesión del área preóptica medial del hipotálamo, causa alteraciones en el sueño de ondas lentas y en el sueño paradójico.¹⁶ También se ha demostrado que cuando se inyectan tanto el péptido muramil,¹⁷ carbaol,¹⁸ como la prostaglandina D₂^{12,19} y E₂²⁰ dentro del área preóptica medial del hipotálamo inducen tanto el sueño de ondas lentas como sueño paradójico, y que la estimulación de receptores colinérgicos en el área supraóptica medial afecta el sueño y la temperatura cortical.²¹

Los resultados obtenidos de los diferentes estudios sobre la generación del sueño paradójico fisiológico y colinérgicamente inducido, es mediado por el subtipo M₂ de los receptores muscarínicos, en las diversas áreas del cerebro

relacionadas con la inducción del sueño (en el sueño de ondas lentas y en el sueño paradójico)^{22,23} y puede ser bloqueado por una microinyección local de agonistas de los receptores muscarínicos como la atropina y la escopolamina.²²

La importancia de estudiar el área preóptica medial del hipotálamo se basa en la relación que mantiene con los núcleos supraquiasmáticos, estructura nerviosa encargada de la regulación temporal de algunas conductas circádicas, como el ciclo sueño-vigilia.^{24,25} En mamíferos, los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo funcionan como osciladores circádicos;²⁶ la evidencia que apoya esta afirmación se basa en experimentos de lesión cerebrovascular,²⁷ lesión con estimulación química, o lesión con estimulación eléctrica del núcleos supraquiasmáticos.²⁶

Evidencias experimentales, han mostrado que la exposición al ozono (O₃) induce alteraciones funcionales del sistema nervioso central; como el ciclo sueño-vigilia. Sin embargo, aún no se han evaluado las posibles alteraciones observadas en el sueño paradójico de los animales expuestos a diferentes concentraciones de O₃, y la relación con los niveles cerebrales de acetilcolina.

En el presente trabajo realizamos una correlación bioquímica y electroencefalográfica *in vivo* de la actividad del sueño con los niveles de acetilcolina mediante la técnica quirúrgica de microdiálisis, utilizando al O₃ como un factor de variabilidad tanto de los diferentes estados de vigilia así como de la concentración de acetilcolina extracelular de regiones intracerebrales específicas, como el área preóptica medial del hipotálamo, utilizando neostigmina como inhibidor específico de la colinesterasa.^{22,28}

Material y métodos

Se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar de 280 a 300 g, las cuales fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) por la vía intraperitoneal (i.p.). Transcurridos 5 minutos de la inyección del fármaco se comprobó gradualmente el grado de sensibilidad al comprimir el último tercio de la cola de la rata, o puncionando los cojines plantares de las extremidades, hasta que la rata alcanzó el periodo de anestesia quirúrgica. Después de rasurar y lavar el área de incisión (hueso frontal al hueso occipital), las ratas fueron montadas al equipo estereotáxico (Stoelting Corp., Wood Dale, IL) y la temperatura corporal, fue monitoreada y regulada con el equipo para ratas CMA/150 (temperature controller). Posteriormente se aplicó solución antiséptica de yodo en el área de incisión y ésta se realizó con una hoja de bisturí del No. 15, para obtener de un solo corte craneocaudal, una incisión en la piel de ~1.0 cm de longitud a nivel del hueso frontal, al hueso occi-

pital y una vez expuesto el cráneo, se marcó un punto sobre el cráneo de acuerdo a coordenadas preestablecidas para el área preóptica medial hipotalámica (posterior a bregma, AP = 8.6; lateral, L = 0.7; y dorso ventral, DV 2.0) según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson.²⁹

Después de marcar sobre el cráneo las coordenadas, se realizó un trépano de ~ 0.07 mm de diámetro con una pieza de mano eléctrica (OSADA, XL-30W). Después del trepano, para la determinación de la actividad de la acetilcolina, a cada animal se le implantó una cánula guía de microdialísis intracerebral (CMA/12, guide cannula) que se dirigió a las coordenadas preestablecidas (dorso ventral, DV = 2.0) con respecto a bregma (Figura 1). La guía de microdialísis fue fijada al cráneo con acrílico dental. Además, las ratas fueron implantadas con un electrodo bipolar de acero inoxidable en la corteza sensoriomotora para el registro electroencefalográfico. Asimismo, se colocaron otros dos electrodos de acero inoxidable en los músculos del cuello, para registrar el electromiograma. Después, la incisión realizada fue suturada con hilo no absorbible de nailon monofilamento de calibre 2/0 con aguja cuerpo estriado longitudinal (SC-26) de 26 mm de 3/8 de círculo punta reverso cortante. Cabe mencionar que durante la incisión y la sutura, se aplicó lidocaína al 10% (cada 100 g contiene 10 g de lidocaína base) con atomizador (cada pulsación de la válvula libera 10 mg). Finalmente se aplicó furazolidona con atomizador durante 7 días (cada 100 g contiene 7.5 g de furazolidona). Después de la intervención quirúrgica, las ratas se dejaron recuperar durante 7 días. Los animales tuvieron libre movimiento, libre acceso a comida y agua con un periodo de iluminación de 12:00-12:00, el cual se inicio a las 7:00 a.m. Después de un periodo de habituación a las condiciones arriba descritas, se realizaron los registros. Para el registro bioquímico

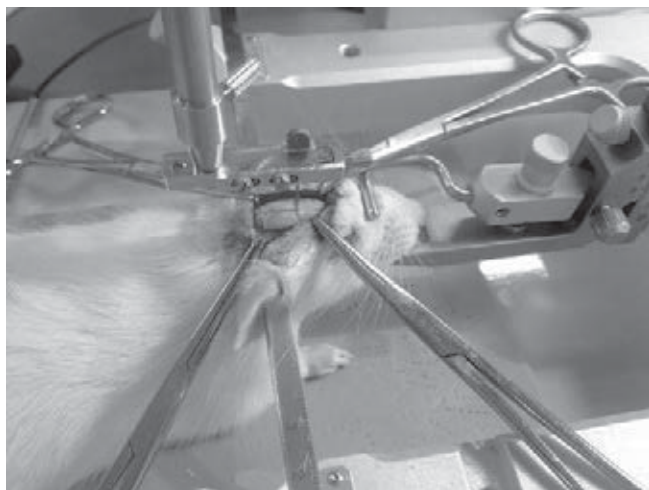


Figura 1. Implantación de los electrodos mediante cirugía estereotáxica

se les introdujo a las ratas una cánula CMA/11 (compatible con la guía implantada) que tiene una punta de membrana de 1 mm de longitud y 0.24 mm de diámetro para extraer el dializado, compuesto por líquido cefalorraquídeo artificial con 10^{-5} M de bromuro de neostigmina como inhibidor de la colinesterasa para evitar la degradación de la acetilcolina, según el método de Williams, et al.³⁰ El muestreo de acetilcolina se realizó durante 48 horas.

El análisis de la acetilcolina se realizó por la técnica de microdialísis acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; Alltech, Modelo: 626) con un detector electroquímico coulométrico (ESA, Modelo: Coulochem III) y con un loop de 20 μ l. Las muestras de los dializados fueron obtenidas en intervalos de 20 minutos en un colector de fracciones a 4°C (CMA 470, refrigerated fraction collector) y fueron inyectadas al sistema microdialísis acoplada a cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de acetilcolina. Para la cuantificación de acetilcolina se utilizaron dos columnas conectadas en serie; una columna analítica polimérica, la cual separa colina y acetilcolina, en donde la retención es regulada por fuerza iónica, la segunda columna, con un reactor inmovilizador de enzima, se une al final de la primera columna (columna analítica). La fase móvil que se utilizó, consistió de 6.06 g de tris base, 7.02 g de perclorato de sodio, 5 ml de solución de Kathon CG al 1% aforados con agua desionizada a un litro. Las condiciones de detección fueron las siguientes: celda analítica (ESA 5011A) con potenciales = 350 mV, 200 mV = E1 y E2 = -200 mV. Los picos fueron analizados por el programa EZCrom (versión 3.2.1) con un flujo de trabajo de 1.0 ml/min. Para determinar las concentraciones de acetilcolina, los cromatogramas de las muestras se interpolaron con cromatogramas de cinco muestras estándar con concentraciones conocidas de acetilcolina. Simultáneamente al análisis bioquímico se realizó el registro del electroencefalograma por medio de un polígrafo marca Nicolet-Viasys-VikingQuest, con el cual se registró durante 48 horas continuas. Para integrar los diferentes estados de vigilia se utilizó un dispositivo MFPE (mod. 110) (Figura 2).

Bajo anestesia general con pentobarbital (50 mg/kg de peso), las ratas se perfundieron por vía intraventricular con solución salina y buffer-formalina (pH 7.2) al 10%. Se disecaron los cerebros y se realizaron cortes coronales (11 μ m) para su procesamiento por medio de la técnica de Klüver-Barrera para la confirmación histológica de la ubicación de la cánula.³¹

Los resultados obtenidos en el estudio poligráfico y en el estudio bioquímico, se analizaron por medio de la prueba de análisis de "t" de Student para grupos correlacionados en donde la significancia estadística fue igual o menor de 0.05.

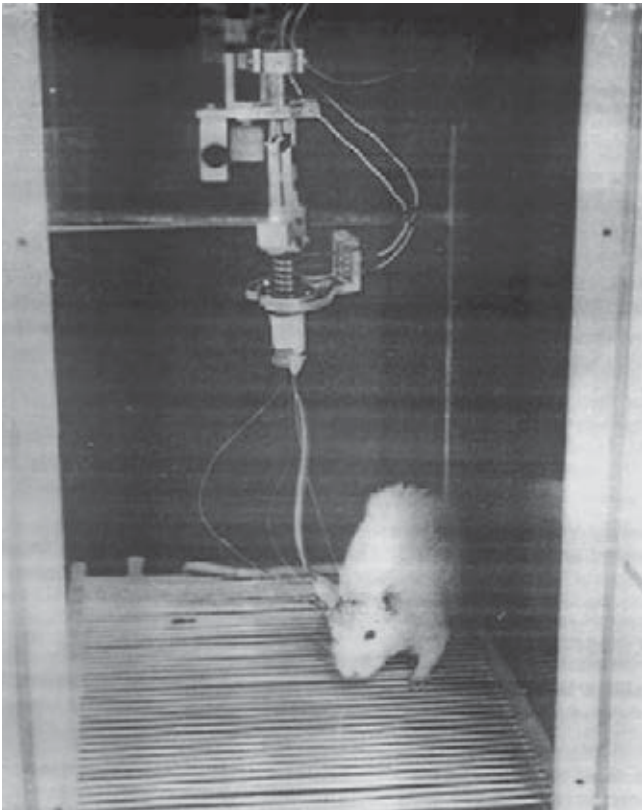


Figura 2. Sistema *in vivo* utilizado para el registro simultáneo de los dializados y la electrofisiología.

Resultados

En un corte cerebral coronal observado con un microscopio óptico se muestra que la punta de la cánula guía de microdialísis se encuentra en la parte superior del área preóptica medial del hipotálamo ($n = 10$), lo que prueba que la membrana semipermeable de la cánula dializó en el área preóptica medial del hipotálamo, como se ilustra en la figura 3. En cuanto a los patrones de sueño y los parámetros bioquímicos, se compararon entre los grupos de exposición a 24 horas de aire limpio frente a 24 horas de exposición a 0.5 ppm de O_3 . Se encontró una disminución significativa del 56.2% en la concentración total de acetilcolina extracelular cuando los animales fueron expuestos a O_3 en comparación con el control (Figura 4). De la misma manera encontramos que el tiempo total de vigilia y sueño paradójico disminuyó significativamente 27.9% y 54.2% respectivamente, cuando los animales fueron expuestos al O_3 , compensado con un aumento del 35.1% de sueño de ondas lentas durante las 24 horas de exposición a O_3 (Figura 5). En relación a la estandarización de la técnica quirúrgica de microdialísis, encontramos que la tasa de recuperación de

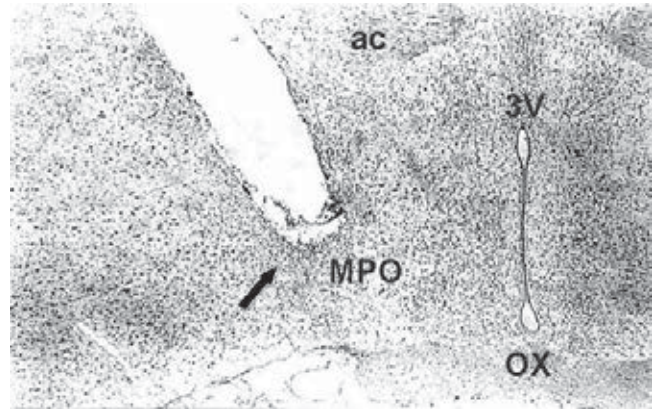


Figura 3. Fotomicrografía de un corte coronal que muestra la localización histológica de la cánula de microdialísis en el área preóptica medial, en las coordenadas: AP-8.6, L-0.7 y D.V 2.0.

MPO: área preóptica medial; ac: comisura anterior; OX: quiasma óptico; 3V: tercer ventrículo.

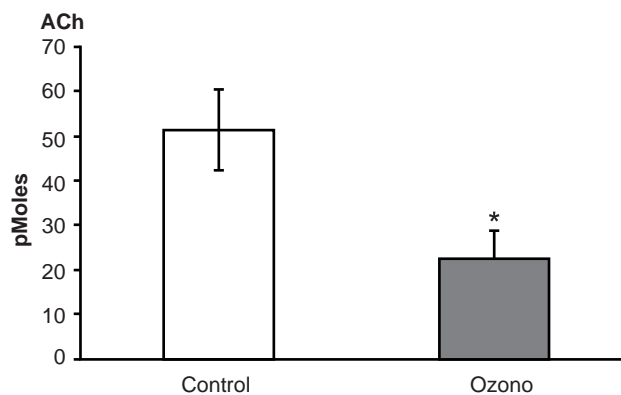


Figura 4. Efecto de la exposición al ozono (O_3 a 0.5 ppm) sobre la concentración de la acetilcolina (ACh) dializados en el área preóptica medial de hipotálamo (MPO) ($n = 10$).

Cada barra indica media \pm S.E.M. Se utilizó la prueba "t" de Student, y se muestran las diferencias significativas (* $p < 0.05$) en comparación con el grupo control.

acetilcolina por la membrana de diálisis fue de $18.0 \pm 2.3\%$ en el área preóptica medial del hipotálamo, considerado como una variabilidad biológica normal del experimento de microdialísis *in vivo*.⁷ La liberación de acetilcolina es mayor en la etapa de luz y menor en el periodo de oscuridad en condiciones control, pero bajo la exposición al O_3 disminuye la liberación de acetilcolina tanto en el periodo de luz como en el de oscuridad. El sueño paradójico mostró aumento significativo durante el periodo de luz y disminución en el periodo de oscuridad en el registro control, pero se mantuvo disminuido durante las 24 horas de exposición a O_3 . El sueño paradójico y la concentración de acetilcolina

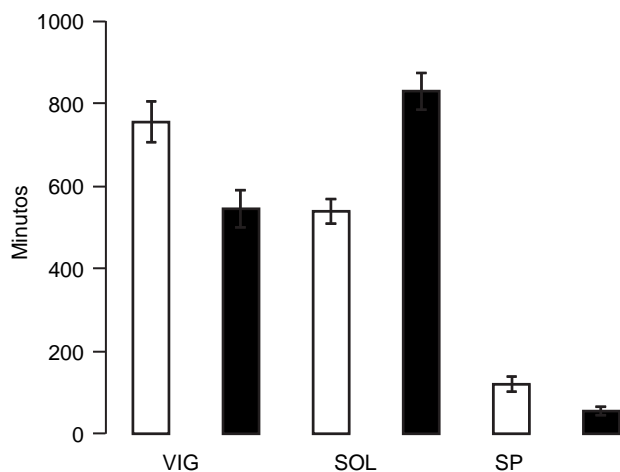


Figura 5. Se muestra cada parámetro del sueño en ratas expuestas a Ozono (0.5 ppm), en comparación al grupo control (n = 10). Las barras muestran la media \pm S.E.M. SP: sueño paradójico; SOL: sueño de ondas lentas; VIG: vigilia. Los resultados se compararon estadísticamente mediante la prueba "t" de Student donde la significancia fue de * $p < 0.05$.

mostraron las diferencias más significativas, principalmente durante las fases de luz y oscuridad durante la exposición al O_3 con respecto al control (Cuadro I).

Discusión

El área preóptica medial del hipotálamo juega un papel importante en el control del sueño-vigilia.¹² Esta estructura recibe aferencias de los núcleos colinérgicos pontinos.¹⁵ El sueño paradójico es promovido por neuronas de naturaleza colinérgica provenientes del puente.³²

Se ha encontrado que el O_3 atmosférico afecta el sistema nervioso central de los seres humanos³³ y los síntomas reportados son: fatiga, letargo y dolor de cabeza; que podrían ser consecuencia de las alteraciones del sueño como se ha reportado en animales expuestos al O_3 .³⁴ Nuestros resultados demuestran que la exposición a O_3 produce alteración del sueño, principalmente una reducción en el tiempo total del sueño paradójico y la alteración de la vigilia, así como un incremento en el sueño de ondas lentas. El electroencefalograma a 48 horas mostró alteración de la concentración de acetilcolina en la región preóptica del hipotálamo. El O_3 fue empleado para interrumpir el ciclo de sueño-vigilia y se relacionan estos cambios con los trastornos concomitantes en la concentración de acetilcolina dializada del área preóptica medial del hipotálamo. Se observó un patrón circadiano de la concentración de acetilcolina en los dializados de área preóptica medial del hipotálamo y también, en el sueño pa-

radójico, en el sueño de ondas lentas y la vigilia de las ratas expuestas a aire filtrado.

Los resultados muestran, que el método de perfusión cerebral *in vivo* (microdiálisis), es una técnica quirúrgica que abre la posibilidad de muestrear sustancias del espacio extracelular de cualquier tejido del cerebro sin removerlo. Como se describió previamente, la cánula está constituida de una membrana de diálisis semipermeable, que presenta un sistema cerrado de perfusión cerebral y proporciona un lavado constante del tejido.³⁵

La técnica de microdiálisis y el uso del sistema de microdiálisis acoplada a cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica, proporcionan un método con sensibilidad elevada y la selectividad necesaria para detectar concentraciones muy bajas de monoaminas endógenas en el espacio cerebral extracelular.³⁶ El método de microdiálisis acoplada a cromatografía líquida de alta resolución tiene un alto grado de versatilidad no encontrado en otros sistemas cromatográficos pues es un método rápido para el análisis continuo, ya que permite analizar varias sustancias simultáneamente mientras el experimento está en proceso. Las condiciones experimentales más usadas en microdiálisis acoplada a cromatografía líquida de alta resolución para la separación de monoaminas y sus metabolitos, son la fase reversa y la de intercambio iónico.

Para la obtención del dializado es necesario tener en cuenta la capacidad de la membrana de diálisis, para la transferencia de sustancias entre el fluido extracelular y el medio de perfusión, debido a que la permeabilidad de la misma varía de acuerdo a las dimensiones y peso molecular, además de existir un equilibrio definido por cambios netos de concentración. La recuperación es menor en condiciones *in vitro* que *in vivo*, ya que *in vivo* el tejido presenta cierta resistencia al soluto.³⁷

En nuestros resultados histológicos observamos que durante la liberación de acetilcolina *in vivo*, la implantación intracerebral de la cánula induce cambios en los tejidos circunvecinos, daño a la barrera hematoencefálica y disrupción en el metabolismo de la glucosa, el cual se revierte después de unos minutos u horas dependiendo del daño, además de gliosis con inflamación del tejido.³⁸ Esta clase de daño es inevitable cuando se lleva a cabo un implante y se refleja en las altas concentraciones de monoaminas medidas en el dializado extraído inmediatamente después de insertada la cánula, y hasta una hora después encontramos altas concentraciones de monoaminas en el dializado derivadas del daño que se produce en la implantación de la cánula.

Los resultados del presente estudio sugieren que la disminución en la fase de sueño paradójico, las alteraciones en la vigilia y en el sueño de ondas lentas, tienen una correlación con la reducción en los niveles de acetilcolina del

Cuadro I. Concentración de acetilcolina y parámetros del sueño (media \pm SEM), registro de 24 horas control y 24 horas con exposición al Ozono (O₃) (n = 10).

	Control		0.5 ppm de O ₃	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
ACh (pmol)	27.46 \pm 4.4	20.09 \pm 0.98 ^a	9.81 \pm 0.74 ^{a,b}	10.44 \pm 1.04 ^{ab}
VIG (min)	46.46 \pm 2.45	24.02 \pm 1.52 ^a	15.70 \pm 0.72 ^{a,b}	12.00 \pm 1.72 ^{abc}
SOL (min)	391.00 \pm 16.37	234.58 \pm 14.35 ^a	401.50 \pm 10.87 ^b	403.30 \pm 18.11 ^b
SP (min)	283.14 \pm 16.07	464.70 \pm 15.70 ^a	302.80 \pm 11.87 ^b	304.60 \pm 16.64 ^b

ACh: acetilcolina; O₃: ozono; VIG: vigilia; SOL: sueño de ondas lentas; SP: sueño paradójico. Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de Friedman y se utilizó un nivel de probabilidad menor de 0.05.

^a Estadísticamente diferente con respecto a los datos de control de la luz.

^b Estadísticamente diferente con respecto a los datos de control de la oscuridad.

^c Estadísticamente diferente con respecto a los datos de la luz O₃ 0.5 ppm.

área preóptica del hipotálamo. Con base en lo anterior observamos que la vigilia y el sueño paradójico, son los más susceptibles a los efectos nocivos del O₃ causando alteraciones del metabolismo colinérgico y presumiblemente por las alteraciones en la regulación del sueño de ondas lentas. Estos hallazgos proporcionan un marco útil para comprender los trastornos del sueño y los efectos de algunas sustancias como el O₃ en el sueño-vigilia y sus implicaciones neuroquímicas.

Conclusiones

El método descrito aquí proporciona una precisión suficiente para los estudios neuroquímicos exploratorios que se centran en los niveles extracelulares de acetilcolina, además proporciona una estimación directa y fiable de los niveles de acetilcolina en cerebro por medio de los dializados en el cerebro de la rata, y estos a su vez se correlacionaron con los patrones de sueño en un modelo de alteración del sistema nervioso central por medio de la exposición al O₃.

Referencias

1. Yamuy J, Fung SJ, Xi M, Morales FR, Chase MH. Hypoglossal motoneurons are postsynaptically inhibited during carbachol-induced rapid eye movement sleep. *Neuroscience* 1999;94(1):11-15.
2. Gompf HS, Mathai C, Fuller PM, Wood DA, Pedersen NP, Saper CB, et al. Locus Ceruleus and Anterior Cingulate Cortex Sustain Wakefulness in a Novel Environment. *J Neurosci* 2010;30(43):14543-14551.
3. Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB. Effect of Lesions of the Ventrolateral Preoptic Nucleus on NREM and REM Sleep. *J Neurosci* 2000;20(10):3830-3842.
4. Imeri L, Opp MR. How (and why) the immune system makes us sleep. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(3):199-210.
5. Wilson S, Argyropoulos S. Antidepressants and Sleep: A Qualitative Review of the Literature. *Drugs* 2005;65(7):927-947.
6. Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fà M, Giagheddu M, et al. Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* 1995;671(2):329-332.
7. Prokai L, Zharikova AD. Neuropharmacodynamic evaluation of the centrally active thyrotropin-releasing hormone analogue [Leu2] TRH and its chemical brain-targeting system. *Brain Res* 2002;952(2):268-274.
8. Zhu Y, Wong PS, Cregor M, Gitzen JF, Coury LA, Kissinger PT. In vivo microdialysis and reverse phase ion pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination and identification of acetylcholine and related compounds in rat brain. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14(18):1695-1700.
9. Semba K, Fibiger HC. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and anterograde transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 1992;323(3):387-410.
10. Steriade M, McCarley RW. *Brain Control of Wakefulness and Sleep*. New York: Plenum, 1990 p. 326-353.
11. Jones BE. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 1991;40(3):637-656.
12. Szymusiak R, McGinty D. Control of slow wave sleep by thermoregulatory mechanisms. *Prog Clin Biol Res* 1990;345:53-64.
13. Lin JS, Sakai K, Jouvét M. Hypothalamo-preoptic histaminergic projections in sleep-wake control in the cat. *Eur J Neurosci* 1994;6(4):618-625.
14. Houdouin F, Cespuglio R, Jouvét M. Effects induced by electrical stimulation of the nucleus raphe dorsalis upon hypothalamic release of 5-hydroxyindole compounds and sleep parameters in the rat. *Brain Res* 1991;565(1):48-56.
15. Kása P. The cholinergic systems in brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 1986;26:211-272.
16. Asala SA, Okano Y, Honda K, Inoué S. Effects of medial preoptic area lesions on sleep and wakefulness in unrestrained rats. *Neurosci Lett* 1990;114(3):300-304.
17. García-Arriar JE, Pappenheimer JR. Site of action of sleep-inducing muramyl peptide isolated from human urine: microinjection studies in rabbit brains. *J Neurophysiol* 1983;49(2):528-533.

18. Talwar A, Kumar VM. Effect of carbachol injection in the medial preoptic area on sleep-wakefulness and body temperature in free moving rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1994;38(3):163-168.
19. Gross KB, White HJ, Sargent NE. The effect of ozone inhalation on metabolic functioning of vascular endothelium and on ventilatory function. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;109(2):336-351.
20. Onoe H, Watanabe Y, Ono K, Koyama Y, Hayaishi O. Prostaglandin E2 exerts an awaking effect in the posterior hypothalamus at a site distinct from that mediating its febrile action in the anterior hypothalamus. *J Neurosci* 1992;12(7):2715-2725.
21. Imeri L, Bianchi S, Angeli P, Mancia M. Stimulation of cholinergic receptors in the medial preoptic area affects sleep and cortical temperature. *Am J Physiol* 1995;269(2):R294-R299.
22. Velazquez-Moctezuma J, Gillin JC, Shiromani PJ. Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res* 1989;503(1):128-131.
23. Imeri L, Bianchi S, Angeli P, Mancia M. Muscarinic receptor subtypes in the medial preoptic area and sleep-wake cycles. *Neuroreport* 1996;7(2):417-420.
24. Inouye ST. Does the ventromedial hypothalamic nucleus contain a self-sustained circadian oscillator associated with periodic feedings? *Brain Res* 1983;279(1-2):53-63.
25. Pittendrigh CS. Temporal Organization: Reflections of Dawinian Clock-Watcher. *Annu Rev Physiol* 1993;55:17-54.
26. Ruzak B, Groos G. Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science* 1982;215(4538):1407-1409.
27. Ruzak B, Zucker I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* 1979;59(3):449-526.
28. Damsma G, Westerink BHC. A microdialysis and automated on-line analysis approach to study central cholinergic transmission "in vivo". En: Robinson TE, Justice J, editores. *Microdialysis in the neurosciences*. Amsterdam: Elsevier, 1991 p. 237-252.
29. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4 th ed. New York: Academic Press, 1998 p. 84-121.
30. Williams JA, Comisarow J, Day J, Fibiger HC, Reiner PB. State-dependent release of acetylcholine in rat thalamus measured by in vivo microdialysis. *J Neurosci* 1994;14(9):5236-5242.
31. Klüver H, Barrera E. A Method for the Combined Staining of Cells and Fiber in the Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953;12(4):400-403.
32. España RA, Scammell TE. Sleep neurobiology from a clinical perspective. *Sleep* 2011;34(7):845-858.
33. Hackney JD, Linn WS, Karuza SK, Buckley RD, Pedersen EE, Law DC, et al. Effects of ozone exposure in Canadians and Southern Californians. *Arch Environ Health* 1977;32(3):110-116.
34. Huitrón-Reséndiz S, Custodio-Ramírez V, Escalante-Membrillo C, González-Piña R, Paz C. Sleep alterations and brain regional changes of serotonin and its metabolite in rats exposed to ozone. *Neurosc Lett* 1994;177(1-2):119-122.
35. Zetterström T, Sharp T, Marsden CA, Ungerstedt U. In Vivo Measurement of Dopamine and Its Metabolites by intracerebral Dialysis: Changes After d-Amphetamine. *J Neurochem* 1983;41(6):1769-1773.
36. Marsden CA, Macdonald IA, Joseph MH, Perrett D. Electrochemical detection, HPLC and in vivo monitoring in the biosciences. *J Neurosci Methods* 1990;34(1-3):1-2.
37. Dykstra KH, Hsiao JK, Morrison PF, Bungay PM, MefFord IN, Scully MM, et al. Quantitative Examination of Tissue Concentration Profiles Associated with Microdialysis. *J Neurochem* 1992;58(3):931-940.
38. Benveniste H. Brain microdialysis. *J Neurochem* 1989;52:1667-1679.