



## LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL SUEÑO

### ***Introducción al estudio del ciclo vigilia-sueño***

***Introduction to the study of the sleep-wake cycle***

**Dr. Carlos A. Blanco Centurión**

Department of Neurology. Harvard Medical School. Harvard University.  
Boston, Massachusetts, EUA.

Blanco-Centurión CA. Introducción al estudio del ciclo vigilia-sueño  
Rev Med UV 2008; Sup 2 8(1): 6-18.

#### **RESUMEN**

Los estudios científicos del fenómeno de dormir/despertar tomaron auge sólo hasta el siglo pasado y se han continuado a la fecha con mucho vigor. Tanto la investigación básica como clínica participan conjuntamente en este esfuerzo. Literalmente, cada año cientos de investigadores en muchos países publican reportes en esta materia. Durante las últimas décadas ha sido tal la evolución de las técnicas y conceptos que la cantidad de información generada es abrumadora. De este modo se requiere de una introducción que permita familiarizarse con el estado actual de la investigaciones así como atisbar los desarrollos futuros. Por razones de espacio y dada la multiplicidad de conceptos y metodologías se abordarán cada uno muy sucintamente y con el menor número de ejemplos posible. No todas las técnicas o conceptos son tratados aquí pero se intentó de incluir los más importantes. La bibliografía se dejó al mínimo, concretándose a citar los ejemplos referidos en el texto. En cuanto a conceptos y fenómenos, se introducirán definiciones elementales de sueño y vigilia, los diferentes tipos de sueño/vigilia entre otras definiciones importantes, y se tratará además de la naturaleza cíclica de estos fenómenos, su respuesta homeostática, así como algunos cambios ontogénicos y filogenéticos. En relación con metodologías, técnicas e instrumentación, se hablará ampliamente

desde aquellas que estudian niveles de integración superiores como el cerebro íntegro (polisomnografía, espectro de potencias aplicado al EEG, imagenología, etc.), hasta otras que se enfocan en niveles celulares y subcelulares (registro unitario, trazadores neuronales, imunohistoquímica, lesión, técnicas de biología molecular, etc.).

**Palabras clave:** sueño, vigilia, ritmos, conceptos, metodologías, introducción.

#### **ABSTRACT**

The impetus of the study of sleep and wakefulness began the past century and it continues vigorously to date. Both basic and clinical research contribute to this endeavor. Hundred of researches from several countries publish reports on this topic every year. Because of this trend, the last two decades have witnessed a hasty evolution about concepts and techniques making the understanding of the scientific data an overwhelming task, especially for the novice. Therefore, an introduction is needed that helps the reader to acquaint with the current and upcoming developments in the science of sleep and wakefulness. For the sake of shortness, every concept and methodology is mentioned briefly calling on the least number of examples possible (cited in

the references). Although this is not a comprehensive review, it touches the most relevant material. The main concepts presented herein are the definitions of sleep and wakefulness, the different types of sleep, the rhythm(s) of sleep and wakefulness, and some of its phylogenetic and ontogenetic developments. Regarding methodologies, techniques and instrumentation the scope attained here is broad. It goes from explaining those methodologies focusing on the highest hierarchy integration level such as the polysomnography to those concentrating on the molecular and cellular level (unitary recording, neuronal tracing, molecular biology, etc.)

Aunque frecuentemente la vigilia y el sueño son vistos como fenómenos exclusivamente presentes en la corteza cerebral, deberíamos entender a estos como **conductas o estados de actividad** que se manifiestan en varias partes del organismo como los músculos o el sistema cardiorespiratorio. En homeotermos, a los diferentes estados de actividad cerebral se les conocen como **estados de vigilancia**. Así, al hablar de vigilia y sueño como conductas o estados de actividad, encontraremos que estos fenómenos están presentes también en diversas especies animales que no tienen corteza cerebral, como son invertebrados, peces o anfibios<sup>1</sup>. Aunque en estas especies de poiquilotermos no se presentan los patrones de actividad eléctrica cerebral observada en los mamíferos y aves, estas especies sí presentan conductas características del sueño como inmovilidad, alto umbral de alerta y postura característica. Al estudio del sueño y la vigilia en diferentes especies animales se le conoce como **filogenia del sueño**. Por ejemplo, en los mamíferos marinos como los cetáceos o la foca ártica, el sueño sólo ocurre en un hemisferio cerebral mientras que el otro permanece despierto<sup>2,3</sup>. No en todas las especies de animales se han estudiado el sueño y la vigilia a profundidad. Es muy importante que estos estudios continúen ya que de sus resultados se podrá entender enigmas fundamentales como por ejemplo la función del sueño, los mecanismos celulares o moleculares universales de los estados de vigilancia y cómo el ambiente ha trasformado los patrones de sueño-vigilia.

Por otro lado, los conceptos de sueño-vigilia no se deben aplicar a plantas, ya que estos organismos no tienen tejido nervioso y como tal es inapropiado hablar

de “conductas” de actividad-repozo, aunque las plantas presenten diferentes estados de actividad. Asimismo, se debe poner cuidado para no confundir lo que el lenguaje popular entiende por “sueño”, ya que en este caso se refiere a las **ensoñaciones** o actividad onírica; es decir, las bizarras historias que experimentamos cuando dormimos. Sueño en el lenguaje científico (*sleep* en inglés) se refiere al estado de dormir en general, no sólo a las ensoñaciones. Igualmente, en el lenguaje popular, el término de **vigilia** se usa para denotar cuando *voluntariamente* un sujeto se abstiene de dormir por la noche, pero en el lenguaje de las neurociencias el concepto de vigilia va más allá de estas circunstancias. La vigilia es el estado cuando se está despierto *independientemente* de la hora del día y no necesariamente involucra un acto *volitivo*. Debido a que múltiples conductas se manifiestan cuando se está despierto, se debe ver a la vigilia como una *conducta general* dentro de la cual otras conductas particulares toman cuerpo. En otras palabras, la vigilia debe ser vista como una conducta *sui géneris* ubicada en un nivel jerárquico superior respecto a otras conductas. Dada esta generalidad de la vigilia, en los artículos científicos en inglés se usen varios sinónimos para la vigilia como *wakefulness*, *alerteness*, *vigilance* y algunas veces hasta *consciousness* (*conciencia*). En los textos científicos se evita usar el término de conciencia para referirse a la vigilia en animales. En los humanos se entiende que la conciencia es parte de la vigilia pero no toda la vigilia es conciencia.

Dada la estrecha relación de la vigilia con la conducta y para efectos operativos, frecuentemente se diferencia a la vigilia en dos partes; **vigilia activa** y **vigilia pasiva**. La diferencia entre ambas es que en la vigilia activa se observan conductas o movimientos elaborados (locomoción, ejecución, alimentación, etc.) mientras que en la vigilia pasiva sólo se observan movimientos voluntarios simples o autonómicos como la respiración. Actualmente se ha vuelto común la automatización de la medición de la conducta, de manera que diferentes tipos de sensores permiten cuantificar el grado de movimiento de forma continua. Por ejemplo, en los humanos, acelerómetros colocados en las muñecas registran el nivel de movimiento por días o semanas, y esta información da una pista de cuánto tiempo el sujeto durmió o estuvo despierto<sup>4</sup>.

A esto se le conoce como **actograma** y es muy utilizado por investigadores de los **ritmos biológicos**. Gracias a la automatización de la medición de la actividad, se estudia el sueño y la vigilia en especies como las moscas de la fruta<sup>5</sup>.

Aunque el registro del movimiento o grado de actividad muscular es útil, no es suficiente para medir con precisión la vigilia y el sueño en los homeotermos. Se requiere adicionar una variable *fundamental* que es el registro de la **actividad eléctrica del cerebro**. Así, basado sólo en el nivel de actividad de los músculos esqueléticos, no se puede saber la diferencia entre vigilia pasiva y sueño *quieto*. En ambos, los músculos antigravitatorios muestran muy bajo nivel de actividad pero la actividad eléctrica del cerebro es diferente. En animales, el registro de la actividad eléctrica cerebral se consigue colocando *electrodos* directamente sobre la corteza cerebral en al menos dos diferentes posiciones como sobre la corteza frontal y la occipital. En humanos, los electrodos se colocan sobre el cuero cabelludo sobre las mismas posiciones (pero frecuentemente mas posiciones) y a estos registros se les conoce como **electroencefalograma** o EEG. El registro de la actividad eléctrica continua de los músculos antigravitatorios, típicamente los del cuello (animal) o la mandíbula (humanos), se le conoce como **electromiograma** o EMG. Cada vez más, los laboratorios y clínicas de sueño están adaptando la tecnología digital para el registro del sueño y la vigilia. La señal analógica del EEG+EMG y otras variables se digitaliza y se visualiza en tiempo real en la pantalla de la computadora y además se almacena en el disco duro para su posterior análisis. Antes de la era digital, era necesario registrar estas señales en tiras de papel que pueden llegar a medir cientos de metros y requieren el continuo flujo de tinta a los trazadores.

El EEG y el EMG registran la actividad eléctrica sumada de cientos de neuronas o fibras musculares de manera que muestran un nivel de actividad *poblacional*. Además, es muy común que se registre la actividad eléctrica (como voltaje) de un sitio de la corteza *comparado* con otro sitio, en lo que se conoce como registro bipolar (Ej. Frontal vs. Occipital). Los registros bipolares nos indicarían por tanto la actividad global de la corteza cerebral. Los potenciales eléctricos registrados en el EEG son muy débiles

(microvoltios o  $\mu$ V), y por lo tanto se requiere amplificarlos miles de veces.

El EEG del cerebro **despierto** se caracteriza por ondas de *bajo voltaje y frecuencia rápida* ( $4>\chi<150$  ciclos por segundo o cps y 5-10  $\mu$ V), también conocidas como **desincronizadas**, mientras que al **dormir**, el EEG muestra ondas que gradualmente se *lentifican* (0.5-4 cps) y simultáneamente *crecen en amplitud* (hasta 300  $\mu$ V), a lo que se llama también **sincronización** del EEG. Además, se observan durante el sueño unas ondas conocidas como *husos de sueño*, cuya amplitud crece y decrece dentro de una banda de frecuencia de 12-16 cps. Por otro lado, no siempre un sujeto dormido muestra un EEG sincronizado. Cíclicamente, a lo largo de la fase de sueño se presentan episodios donde el EEG se vuelve muy similar a la vigilia; es decir, la frecuencia se acelera, el voltaje disminuye y desaparecen los husos de sueño. El sujeto no despertó, ya que conductualmente sigue dormido y además presenta un elevado *umbral* para despertar, así como sus músculos antigravitatorios están completamente inhibidos. A este último fenómeno que se le conoce como **atonía muscular**. Muy peculiar de este estado es la presencia de ráfagas de *movimientos oculares rápidos* o MOR. Además, si se despierta al sujeto, muy frecuentemente reportará haber experimentado ensoñaciones. Por todas estas características, a estos episodios de sueño se les conoce como sueño con movimientos oculares rápidos o simplemente **sueño MOR**. Asimismo, debido a la presencia de contracciones súbitas, esporádicas y aisladas de algunos músculos de la cara o extremidades, se le conoce como **sueño activo**. En contraste, al sueño donde se observa un EEG sincronizado, sin atonía muscular, movimientos oculares rápidos o ensoñaciones, se le conoce como **sueño de ondas lentas, sueño no-MOR o sueño quieto**.

El registro *simultáneo* de las variables fisiológicas antes mencionadas como el EEG, el EMG, los movimientos oculares o electro-oculograma (EOG), pero además la respiración, la temperatura corporal, el nivel de saturación de oxígeno en sangre, la actividad eléctrica del corazón (EKG), las vibraciones producidas por las cuerdas vocales (para detectar ronquidos) e incluso la filmación del sujeto al dormir son conocidos como **polisomnograma** o PSG. El PSG con muchos parámetros se utiliza más en la clínica con

fines diagnósticos que en la investigación básica. Así, en la **clínica de sueño**, el PSG permite detectar paros respiratorios o apneas durante el sueño, que inducen microdespertares. A esta patología cada vez más común se le conoce como *apnea de sueño*. En el laboratorio de ciencia básica, donde frecuentemente se usan animales como el gato o la rata, se puede registrar, además del EEG+EMG+EOG, la actividad eléctrica *subcortical* en estructuras como el hipocampo dorsal, el puente o el núcleo geniculado lateral. Durante el sueño MOR el hipocampo muestra una actividad eléctrica conocida como **ritmo teta** hipersincrónico, mientras que en el puente o en el núcleo geniculado lateral (tálamo) electrodos profundos registran ráfagas de potenciales característicos conocidos como **ondas PGO**. Tanto en la clínica como en la investigación básica se divide al PSG en **épocas**, que son segmentos de igual duración a los que se les asigna un estado de vigilancia particular según criterios establecidos. i.e. sueño no-MOR, sueño MOR, vigilia. A este proceso se le conoce como *calificación* y es cada vez más común que se realice en forma *automatizada*. La duración de la época del PSG es diferente para animales y humanos. En animales, es más breve (5-30 seg), ya que el ciclo vigilia-sueño también dura menos mientras que en los humanos la duración de la época va de 30 seg. a 1 min.

El gran énfasis en el registro de la actividad poblacional de la corteza cerebral durante la vigilia y el sueño ha originado que se realice un análisis más profundo del EEG conocido como **espectro de potencias**. El espectro de potencias descompone matemáticamente (análisis de Fourier) las ondas complejas del EEG, en *bandas* de diferentes frecuencias, y determina además la *potencia* de cada banda expresada como potencia al cuadrado ( $\mu\text{V}^2$ ). Si se piensa que el EEG representa la actividad post-sináptica de millones de neuronas donde no toda ésta ocurre a la misma frecuencia, el análisis espectral separaría las diferentes subpoblaciones e indicaría la predominancia de cada una de estas en la totalidad del EEG. Comúnmente se analiza la potencia de la banda *delta* (0.5-4 cps), *teta* (4-8 cps), *alfa* (8-12 cps), *sigma* (12-16), *beta* (14-35 cps), *gamma* (34-45) y *omega* ( $>45$  cps). Debido a que la **potencia delta** o **actividad de ondas lentas** (AOL) se incrementa con la duración de la vigilia y disminuye gradualmente durante el sueño, se cree que está representada un índice de la **necesidad**

o *presión homeostática* para dormir y muy frecuentemente se reporta tanto en estudios clínicos como básicos. Además, es común que la potencia delta se calcule principalmente durante el sueño no-MOR. De hecho, la predominancia de AOL ha servido para establecer diferentes estadios dentro del sueño no- MOR. En los animales se ha dividido el sueño no-MOR en *dos fases*, donde una de ellas presenta menos de 50%/época de AOL (tipo I o sueño ligero) y otra fase donde la AOL es mayor a esta cifra (tipo II o sueño profundo). En los humanos hay cuatro fases de sueño no-MOR siendo las fases II+III equivalentes al sueño ligero en animales, mientras que la fase IV equivaldría a la fase tipo II de los animales. La AOL durante el sueño no-MOR presenta cambios **ontológicos**; o en otras palabras, los cambios de la AOL están relacionados con el desarrollo y el envejecimiento<sup>6</sup>. La potencia de AOL va incrementándose rápidamente a medida que el organismo llega a la infancia, y se mantiene así durante la pubertad, para después disminuir significativamente durante la adolescencia tardía; sigue un decline gradual en la adultez y se exacerba finalmente en la vejez. Dado que la potencia de la AOL durante el sueño no-MOR se correlaciona positivamente con la **profundidad** del sueño, organismos en la infancia son los que presentan el sueño más profundo, mientras que los viejos se despiertan con facilidad<sup>7</sup>. El concepto de profundidad del sueño se refiere al **umbral** que el sujeto tiene para despertar cuando se encuentra en un estado particular de sueño.

Aunque idealmente el diagnóstico de trastornos de sueño se debería hacer basado en datos provenientes del PSG, a veces no es posible o económico hacerlo. De este modo, se recurre a **cuestionarios estandarizados** donde el sujeto indica cuándo y cómo durmió y qué tan alerta se encuentra durante el día. Uno de los cuestionarios más utilizados es el denominado *índice Pittsburgh de calidad de sueño*. Asimismo, para medir la somnolencia diurna se usa frecuentemente la *escala Epworth*. A veces los reportes subjetivos concuerdan con los datos obtenidos en la clínica de sueño pero a veces difieren, ya que un sujeto puede reportar dormir muy mal aunque el PSG muestre lo contrario. También se le puede pedir al paciente que lleve un *diario de sueño* donde registra los tiempos y las horas que durmió, despertares, medicamentos que tomó, etc. El diario de sueño es un historial que el médico puede usar

para el diagnóstico y el tratamiento de los trastornos del sueño-vigilia.

Una característica fundamental de los diferentes estados de vigilancia es que se presentan en forma **cíclica**, de ahí el nombre de ciclo sueño-vigilia. Así, al sueño de ondas lentas le sucede el sueño MOR y éste frecuentemente conduce a un breve despertar que a su vez es seguido por otro episodio de sueño lento, repitiéndose la secuencia entera varias veces a lo largo de la fase de reposo. Esta alternancia de las fases de sueño es conocida como el **ritmo ultradiano** del sueño. A la *secuencia* o patrón temporal de los estados de vigilancia se le conoce como **arquitectura del sueño**. Normalmente, el cerebro despierto transita de la vigilia al sueño de ondas lentas, pero en la narcolepsia se pasa directamente al sueño MOR en lo que se conoce como periodos de inicio de sueño MOR o SOREMPs por sus siglas en inglés.

La vigilia y el sueño también oscilan casi cada 24 hrs, y a esto se le conoce como **ritmo circadiano**. Aunque el ritmo circadiano del sueño y la vigilia está normalmente acoplado a la alternancia del día y la noche, este ritmo se genera endógenamente en el hipotálamo sin necesidad del estímulo luminoso. El sueño ocurrirá predominantemente durante el día o la noche, dependiendo de la especie que se trate. Los humanos y la gran mayoría de primates duermen de noche, mientras que los roedores (ratas, cobayos y ratones) lo hacen de día. Para estudiar estos ritmos, se coloca a los sujetos en condiciones de aislamiento y frecuentemente en oscuridad continua. Bajo estas condiciones, se dice que el ritmo va a correr libremente (*free running*).

La cantidad de sueño o vigilia y el momento para dormir o despertarse resulta de una interacción dinámica entre la **regulación homeostática** o necesidad de dormir y la regulación temporal o **circadiana**. Por ejemplo, en humanos por la *mañana*, la presión homeostática para seguir durmiendo es mínima puesto que ya se durmió toda la noche, mientras que la señal circadiana para mantenerse alerta empieza a incrementarse, lo que da como resultado el despertar.

Por la *tarde* y a consecuencia de permanecer despiertos por varias horas, aumenta la necesidad de dormir pero es contrarrestada por la señal circadiana de alerta que ha alcanzado su punto máximo, de lo cual resulta

que podamos seguir despiertos. Empero, a medida que avanza la *noche*, la presión circadiana para mantenernos despiertos mengua rápidamente, mientras que la necesidad de dormir sigue incrementándose y da como resultado el inicio del sueño. Esta dinámica diaria está estrechamente acoplada con la regulación circadiana de la *temperatura corporal*, ya que el sueño generalmente inicia poco después que la temperatura corporal desciende mientras que por el contrario despertamos cuando está en ascenso. Se sabe que la regulación circadiana del sueño y otras variables fisiológicas la llevan a cabo neuronas del **núcleo supraquiasmático**<sup>8</sup> cuyas neuronas poseen un reloj molecular que oscila casi cada 24 h pero que se sincroniza con la información luminosa proveniente de la retina<sup>9</sup>. Empero, no se sabe a ciencia cierta dónde ni qué neuronas llevan a cabo la regulación homeostática del sueño, aunque se postula factores como la **adenosina**<sup>10</sup> o varios tipos de **citoquinas** como la *interleucina 1 beta* o el *factor de necrosis tumoral alfa*<sup>11</sup>.

Como se acaba de mencionar, una característica fundamental del sueño-vigilia es su regulación homeostática. Esto se refiere a que el cerebro tiene mecanismos que regulan con cierta precisión la *cantidad* de sueño o vigilia que un individuo presenta a diario. Si por alguna razón un sujeto adulto permanece despierto mas allá de 16 h, fenómeno conocido como **privación de sueño**, gradualmente le será más y más difícil mantenerse despierto. De hecho, el incremento continuo en la necesidad de dormir o presión de sueño le hará imposible permanecer despierto en forma indefinida. Asimismo, no se puede dormir indefinidamente ya que normalmente después de 6-8 h de dormir en forma continua, la necesidad de despertarse se vuelve cada vez mayor. La regulación homeostática de la cantidad de sueño implica *compensación* cuando se ha dormido, ya sea muy poco o demasiado, y de esta forma la cantidad de sueño tiende a ser más o menos *constante*. Además, se ha visto que tanto el sueño no-MOR como el sueño MOR están homeostáticamente regulados. Se puede privar selectivamente a humanos y animales de cada uno de estos tipos de sueño y la compensación o **rebote de sueño** también será diferente según el caso. La *privación de sueño total* es un método muy utilizado como una forma de generar y medir la respuesta homeostática. Como el procedimiento

es muy estresante, o letal cuando se prolonga por semanas, generalmente se hace por corto tiempo y de la forma más “gentil” posible. Por ejemplo, en las ratas y ratones se utilizan estímulos suaves de diferentes modalidades cuando el experimentador detecta la presencia de signos de sueño en el EEG o en la conducta<sup>12</sup>. Algunos laboratorios han incluso automatizado esta operación<sup>13</sup>. Para la privación de sueño MOR, se aprovecha la natural ocurrencia de la atonía muscular para colocar a los animales en pequeñas “islas” donde ellos mismos aprenden a reprimir la manifestación este tipo de sueño. Al hacerlo, evitan caer al agua cuando ocurre la atonía muscular del sueño MOR<sup>14</sup>.

Para medir el nivel de somnolencia a lo largo del día se utiliza una prueba conocida como **latencias múltiples de sueño** o MSLT por sus siglas en inglés. En esta prueba a intervalos regulares (cada 2 h) y durante el día se le indica al sujeto que debe irse a la cama en un cuarto oscuro y quieto de manera que pueda medirse el tiempo o *latencia* que tarda en dormirse (tiene electrodos conectados todo el tiempo). Pacientes narcolépticos, con apnea de sueño, con insomnio severo o que se privaron de sueño presentan latencias muy cortas de menos de 5 min. Una variante en las ratas de MSLT consiste en privar de sueño total a los animales a intervalos regulares por 20 min. y después dejarlos dormir por otros 20 min. Esta prueba se hace durante el día que es cuando normalmente duermen las ratas y se mide la latencia, así como la cantidad de cada tipo de sueño, y se observa la dinámica temporal de la somnolencia<sup>12</sup>.

El estudio de la vigilia y el sueño no únicamente abarca el registro de la actividad eléctrica de múltiples unidades neuronales reflejada en el EEG.

Además se puede estudiar, en diferentes partes del cerebro íntegro y sin anestesia, la actividad eléctrica de *unidades neuronales* por separado. A este enfoque se le conoce como registro de **actividad unitaria**. Se ha descubierto que hay neuronas cuyos potenciales de acción (disparo) ocurren preferentemente durante la vigilia en general o están relacionadas con movimientos musculares o actividad sensorial. Estas neuronas dejan de disparar o disparan menos frecuentemente durante el sueño de ondas lentas, aunque muchas de ellas vuelven a disparar durante el sueño MOR<sup>15</sup>. Estas neuronas son muy abundantes en muchas partes del cerebro incluida la

corteza. Hay otras neuronas en núcleos como el rafe dorsal, el locus coeruleus, o el tuberomamilar (TMN) que disparan principalmente durante la vigilia, mucho menos durante el sueño de ondas lentas, y permanecen totalmente silenciosas durante el sueño MOR<sup>16</sup>. Por el contrario, hay otras neuronas localizadas en el cerebro basal anterior que disparan poco antes y durante el sueño de ondas lentas, y también hay neuronas en el tegmento dorsolateral mesopontino que sólo disparan durante el sueño MOR<sup>17</sup>. Por supuesto, hay muchas neuronas cuyo patrón de disparo no guarda relación temporal con los estados de vigilancia; empero, se cree que las neuronas activas, específicamente durante cada estadio del ciclo sueño-vigilia, son las *generadoras* de estos estados. Recientemente, el registro de actividad unitaria ha evolucionado para marcar a las neuronas registradas. Este marcaje conocido como registro **yuxtacelular**, debido a que el electrodo se ubica en estrecho contacto con la membrana celular, lo que permite la identificación ulterior del fenotipo neuronal mediante **imunohistoquímica**. Esto es un avance importante ya que hay zonas como el *cerebro basal anterior* que son heterogéneas, presentando neuronas que se activan con el sueño conjuntamente con otras que se activan al estar despiertos. Usando registros yuxtacelulares en esa zona, se encontró que neuronas que disparan cuando el cerebro está despierto y cuando presenta sueño MOR se marcan para el neurotransmisor *acetilcolina*, lo cual corrobora la hipótesis de que la acetilcolina liberada en la corteza es importante para generar las frecuencias rápidas y de bajo voltaje que se observan en el EEG<sup>18</sup>.

### Imunohistoquímica

La técnica imunohistoquímica ha sido aplicada ampliamente al estudio del sueño mucho antes de usarse para el registro yuxtacelular, para dar pistas acerca de la *identidad neuroquímica* de los grupos neuronales que regulan los estados de vigilancia. La imunohistoquímica utiliza **anticuerpos** específicos para marcar proteínas o moléculas conjugadas a proteínas en tejido fijado. Gracias a este marcaje con anticuerpos, se sabe que las neuronas facilitadoras de la vigilia en el área perifornical del hipotálamo contienen el neurotransmisor oligopeptídico *hipocretina*<sup>19</sup>. Adicionalmente, el marcaje con anticuerpos para el factor de transcripción *c-fos* ha permitido estudiar la

activación neuronal a nivel de todo el cerebro y en relación con los estados de vigilancia. Después de una hora de actividad, muchas neuronas expresan c-fos y por ende se usa esta proteína como marcaje de activación. Utilizando este marcaje, se descubrió que un grupo de neuronas ubicadas en la *parte ventrolateral del hipotálamo anterior* se activan después de que un animal ha dormido por más de una hora<sup>20</sup>.

Una variante de la imunohistoquímica, conocida como **imunofluorescencia**, utiliza anticuerpos que tienen acoplados marcadores fluorescentes. La imunofluorescencia es muy útil cuando se quiere visualizar si en la misma neurona están presentes más de un marcador fenómeno que se llama *colocalización*. Por ejemplo, se puede visualizar si una neurona contiene la enzima para sintetizar un neurotransmisor y además si ha incorporado un trazador (ver más adelante) que indicaría la existencia de una conexión particular. La visualización simultánea de más de un fluoróforo dependerá de que cada marcador emita luz visible de diferente color cuando es excitado con radiación ultravioleta. Así, un marcador puede verse en verde (tiocianato de fluoresina o FITC), mientras otro brillará en rojo (rodamina). Cuando hay colocalización, la neurona brillará en amarillo al sobreponerse ambas imágenes. Este marcaje requiere de un microscopio de fluorescencia simple o uno más complejo, conocido como *microscopio confocal* que elimina gran parte del reflejo y además permite diferenciar diferentes planos de profundidad. Por ejemplo, usando marcaje con imunofluorescencia, se sabe que la zona donde se genera el sueño MOR es inervada simultáneamente por neuronas colinérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas<sup>21</sup>.

La técnica de marcaje neuronal ha evolucionado también con la adición de técnicas de biología molecular. Así, hoy en día es posible hacer que un marcador como la *proteína fluorescente verde* se exprese en un fenotipo neuronal específico. Los ratones transgénicos, expresando este gene en una estirpe neuronal específica, son muy útiles para hacer estudios en *rebanadas* cerebrales. En estos estudios se examinan las propiedades electrofisiológicas de las neuronas fluorescentes, ya sea en su estado basal o cómo estas propiedades cambian cuando al baño se le adicionan diferentes *fármacos*. Aunque hacer electrofisiología en

rebanadas de cerebro no modela plenamente lo que ocurre durante el sueño o la vigilia, es una aproximación y permite saber, por ejemplo, si las neuronas tienen determinado tipo de **receptor**, o entender sus propiedades de excitabilidad intrínseca. Neuronas que sintetizan *ácido gama-amino butírico* (GABA), y a las que se les ha modificado para expresar además la proteína fluorescente verde, han sido registradas en la zona donde se genera el sueño MOR. Se ha observado que algunas de estas neuronas fluorescentes son excitadas por un fármaco que mimetiza los efectos de la acetilcolina llamado *carbacol*<sup>22</sup>. Este estudio confirma la hipótesis acerca de que las neuronas que liberan acetilcolina, así como las que liberan GABA participan regulando el sueño MOR..

Como en toda área de las neurociencias, el estudiar el sueño y la vigilia no sólo involucra saber las propiedades excitables, la identidad química y la localización de las neuronas que regulan estos estados; además se debe conocer las *conexiones* o *circuitos* que regulan estos estados. El conocer los circuitos neurales permite elaborar **modelos** que pretenden explicar cómo se regula los estados de vigilancia. Para esto, desde hace décadas se han utilizado diferentes tipos de **trazadores** neuronales. Estas moléculas, generalmente proteínas, son incorporadas por las neuronas y viajan ya sea de las terminales hacia el soma (retrogrados) o, por el contrario, del soma hacia las terminales (anterogrados). Una vez que el trazador se desplazó a lo largo de las terminaciones nerviosas, se utiliza imunohistoquímica o imunofluorescencia para visualizar las neuronas marcadas. Como ejemplo de un trazador retrogrado, tenemos a la *subunidad B de la toxina colérica* (CTB), y como ejemplo de un trazador anterógrado está la *aglutinina del frijol* o PHA-L. Usando ambos trazadores, se sabe que el *locus coeruleus* envía (proyecta) axones a gran parte del cerebro anterior, incluidas las zonas donde se ubican las neuronas activas durante el sueño en el hipotálamo anterior<sup>23</sup>. A su vez, estos centros del sueño conectan con el *locus coeruleus*, lo cual crea un circuito recíproco que se cree participa en la alternancia del sueño y la vigilia. Hay trazadores que son muy eficaces para marcar varias sinapsis (tras-sinápticos), de manera que pueden trazar más de una conexión o en otras palabras, marcan el *orden* de estas conexiones (1ero, 2do orden, etc.) Un ejemplo de esto

es el virus de pseduorabia porcina (PRV) que viaja en forma retrógrada<sup>24</sup>. Los trazadores neuronales no son específicos para ningún fenotipo neuronal, lo que ha dado lugar al avance en la técnica de trazadores al utilizar herramientas de biología molecular. Recientemente se ha podido inducir la expresión selectiva de una proteína de fusión que consiste en un trazador retrógrado (fragmento carboxílico de la toxina tetánica + la proteína verde fluorescente) en un fenotipo neuronal como las células hipocretinérgicas. Con esta nueva técnica, se sabe exactamente cuáles son los aferentes de primer orden de estas neuronas<sup>25</sup>.

No basta con elaborar modelos de los circuitos que regulan los estados de vigilancia. Es necesario también poner a prueba estos modelos, y una de las maneras más directas y eficaces es haciendo una **lesión** experimental. Esta técnica consiste en *destruir* un grupo(s) de neuronas en una región(es) del cerebro, con la finalidad de observar si, después de ser removidas ciertas neuronas del circuito, se produce efectos sobre los estados de vigilancia, acordes con las predicciones de los modelos establecidos. Por ejemplo, basándose en datos farmacológicos y de registro unitario, se plantea que las neuronas del locus coeruleus son importantes para mantenerse alertas e inhibir el sueño MOR.

Así pues, su destrucción debiera producir un decremento en el nivel de vigilia, sobre todo causado por un incremento de sueño MOR. Resulta que la lesión del *locus coeruleus* no ha dado soporte a esta hipótesis; y por lo tanto, estos estudios demandan que se revise el modelo<sup>26</sup>.

Al igual que otras disciplinas, la lesión experimental ha evolucionado a lo largo del tiempo. Inicialmente, se empezó haciendo *transeciones*, separando áreas muy amplias del cerebro con herramientas como agujas o escalpelos. Por ejemplo, usando transeciones, se descubrió que el sueño MOR se genera en el área del puente. Luego se utilizó corriente eléctrica para destruir áreas mucho más restringidas del cerebro (milímetros). A este tipo de lesiones se les conoce como *electrolíticas*. Las lesiones electrolíticas destruyen tanto neuronas como fibras; y por lo tanto, tienen la desventaja de que afectan a otras neuronas distantes, pero cuyas fibras transitan a través de la zona donde ocurrió la lesión. Como alternativa a la lesión electrolítica, se descubrió que ciertos agonistas para

los receptores glutamatérgicos (kainato, ibotenoato, etc.) producen destrucción de los cuerpos neuronales pero no afectan a las fibras en tránsito. El uso de estas *citotoxinas* modificó profundamente los modelos de circuitos reguladores del sueño. Basándose en lesiones electrolíticas y registros unitarios, se creía que la formación reticular medial del puente era crucial para generar el sueño MOR, sin embargo, luego de las lesiones citotóxicas de esta región, se descubrió que no era así. Usando kainato, se encontró que la zona generadora del sueño MOR estaba localizada en la parte *dorsolateral del tegmento mesopontino*<sup>27</sup>.

Las lesiones citotóxicas tienen la desventaja de no discriminar entre diferentes fenotipos neuronales, y además no todas las neuronas son susceptibles de ser destruidas con ellas; por ejemplo TMN, o el *locus coeruleus*. Estas limitaciones dieron origen al desarrollo de otras citotoxinas más específicas para determinados fenotipos neuronales. Se han sintetizado toxinas más específicas que afectan a neuronas catecolaminérgicas (dopamina y noradrenalina; 6-OHDA) o serotoninérgicas (5,7-DHT). La desventaja de éstas es que predominantemente destruyen las terminales; y en consecuencia, con el tiempo los cuerpos neuronales regeneran sus fibras. Como alternativa para destruir cuerpos y fibras neurales en forma específica, en la década pasada se empezaron a utilizar *anticuerpos* conjugados a la toxina *saporina*. El principio de estas *imunotoxinas* es que los anticuerpos se unen a moléculas en la superficie de la membrana celular (Ej. receptores), presentes sólo en un fenotipo neuronal. Así, cuando la neurona incorpora estas moléculas ingresará, también el anticuerpo conjugado a la toxina, lo que da como resultado la muerte celular. Un ejemplo muy usado de imunotoxina es *192-IgG-saporina*. Ésta reconoce a un receptor presente casi exclusivamente en las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior. Se postulaba que estas neuronas eran importantes para el mantenimiento de la vigilia y para la respuesta homeostática del sueño. Sin embargo, la destrucción selectiva de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior con 192-IgG-saporina no fue seguida de un incremento en el sueño o una merma del rebote de sueño<sup>12</sup>. Más recientemente y usando herramientas de biología molecular, se han creado *lesiones genéticas*. En éstas, se inserta un gene letal como el fragmento de poliglutamina (ataxina) al promotor

de un gene que se expresara solamente en un fenotipo neuronal; como por ejemplo el gene que codifica para la hipocretina. En estos ratones trasmisores, sólo las neuronas hipocretinérgicas morirán a causa de la expresión del gene de ataxina<sup>28</sup>. Estos ratones trasmisores han confirmado que la degeneración específica de estas neuronas produce síntomas de **narcolepsia**.

Fundamental para entender cómo se regula el sueño y la vigilia es saber además qué *neurotransmisores*, *neuromoduladores* u *hormonas* están involucrados en estos fenómenos. Recuérdese que, en general, la señal nerviosa tiene un componente eléctrico que es estudiado por la **electrofisiología**, pero además tiene un componente humoral que es investigado por la **bioquímica**. Inicialmente, los estudios bioquímicos del sueño fueron rudimentarios y analizaban *homogenados* de partes del cerebro, lo que incluye el contenido intracelular y el extracelular. Posteriormente, se refinó el análisis para estudiar principalmente las concentraciones *extracelulares* ya que son éstas las más relevantes en la transmisión nerviosa. Para ello se colectan muestras de líquido extracelular mediante una técnica conocida como **microdiálisis**. La microdiálisis permite además estudiar cómo los neuromoduladores son liberados durante los estados de vigilancia *in vivo*, a diferencia del análisis *postmortem* que se hacia anteriormente. La microdiálisis funciona con base en el principio de difusión pasiva de moléculas a favor de un *gradiente de concentración* y atravesando una membrana semipermeable. Las moléculas difunden hacia dentro de la membrana o sonda de microdiálisis, y como el líquido dentro de ésta fluye continuamente, se colectan estas moléculas fuera del cerebro. Para analizar, identificar y cuantificar los múltiples neurotransmisores colectados, se inyectan las muestras de microdiálisis en cromatógrafos líquidos de alta presión o HPLC. Usando estos métodos, se ha corroborado que, por ejemplo, la *serotonina*, que es una sustancia involucrada en la vigilia y que además inhibe al sueño MOR presenta en efecto niveles máximos en el cerebro cuando el animal está despierto, y mínimos cuando est{a en sueño MOR<sup>29</sup>.

Asimismo, también se analizan las concentraciones de algunos neuromoduladores peptídicos presentes en el líquido extracelular o en el líquido cefalorraquídeo con

otras técnicas como **radioimunoensayo** (RIA), o la técnica de **ELISA**. Radioimunoensayo y ELISA, utilizan *anticuerpos* para detectar y cuantificar polipéptidos específicos, como sería la hipocretina. La diferencia entre ambos es que uno usa anticuerpos acoplados a átomos radioactivos (radioimunoensayo), mientras que en la técnica ELISA los anticuerpos se acoplan a enzimas que producen un colorante o que se ligan a un marcador fluorescente. Usando RIA y analizando el líquido cefalorraquídeo de sujetos con narcolepsia o en ratas con lesión genética de las neuronas de hipocretina, se observa que presentan niveles muy bajos o de plano no se detecta en ellos este péptido<sup>30</sup>. El análisis *postmortem* con imunohistoquímica de pacientes ha confirmado que la razón de esto es porque las neuronas hipocretinérgicas degeneraron en algún momento de la vida de estos pacientes<sup>31</sup>.

Los neurotransmisores que regulan el sueño o la vigilia, o cualquier otro fenómeno cerebral, actúan a través de múltiples **receptores** pre y/o postsinápticos. La **farmacología** permite estudiar la función de estos receptores. Existen numerosos tipos de receptores aun para el mismo neurotransmisor. En algunos casos, la activación de un tipo de receptor inhibe el impulso nervioso, mientras que el otro tipo lo facilita. Así pues, se necesita estimular o bloquear *selectivamente* sólo a un tipo para poder entender su papel. Para ello, la farmacología ha producido y sigue produciendo cientos de moléculas sintéticas que estimulan selectivamente a los múltiples tipos de receptores hallados en el cerebro. Los que activan el receptor se llaman *agonistas*, mientras que los que los inactivan se llaman *antagonistas*. La farmacología del sueño es una de las áreas mas investigadas y sus resultados son bastante profusos. En general, se puede afirmar que esta disciplina ha corroborado que los agonistas de los receptores para las *monoaminas* (noradrenalina, serotonina, histamina y dopamina) promueven la vigilia, mientras que los agonistas para los receptores para GABA o para la adenosina facilitan el sueño. Muchos de los hipnóticos mas usados basan su efectividad en reforzar la transmisión GABAérgica o bloquear los receptores para histamina tipo H<sub>1</sub> (difenhidramina). Asimismo, la estimulación de los receptores colinérgicos, en zonas específicas del tallo cerebral, induce sueño MOR mientras que los antidepresivos que favorecen la

transmisión de serotonina y/o noradrenalina inhiben este tipo de sueño.

La farmacología también ha posibilitado la aplicación de técnicas de **Imagenología** al estudio del sueño. Por ejemplo, usando un radioisótopo conocido como [<sup>18</sup>F] fluorodeoxiglucosa en combinación con tomografía de emisión de positrones/cranial computarizada, o **PET/CT**, se puede detectar en forma no invasiva y en tiempo real el consumo de glucosa en el cerebro. Se postula que la incorporación de fluorodeoxiglucosa se correlaciona con el grado de actividad neuronal. Usando PET/CT, también se puede producir imágenes en tiempo real de la activación de receptores cerebrales como receptores a dopamina o receptores para serotonina. Asimismo, se ha usado el **PET/CT** para medir el flujo sanguíneo regional en el cerebro, inyectando H<sub>2</sub><sup>15</sup>O. Se postula que el flujo sanguíneo también se correlaciona con el grado de actividad neuronal. Al respecto, la resonancia magnética funcional, o **fMRI**, produce imágenes en tiempo real, en relación con cambios en el consumo de oxígeno y el flujo sanguíneo cerebral (contraste **BOLD**). Con estas técnicas, se sabe, por ejemplo, que cuando un sujeto presenta sueño de ondas lentas, el consumo de glucosa *disminuye* en muchas áreas del cerebro, aunque aumenta en otras como el hipotálamo o la amígdala, entre otras<sup>32</sup>.

En las últimas dos décadas, la biología molecular también ha tenido gran impacto en el desarrollo de la farmacología, a través de generar ratones transgénicos que no expresan un determinado tipo de receptor o neurotransmisor. A estos animales mutantes se les conoce como “**knockouts**” o **KOs**. Los KOs permiten corroborar hipótesis acerca de la función de un tipo específico de receptor, ya que cada gen codifica para un solo tipo de receptor, enzima o neurotransmisor en, el caso de los péptidos. Por ejemplo, se postula que la *cafeína* produce alertamiento a través de la inactivación de los receptores para adenosina. Sin embargo, hay dos tipos de receptores para adenosina que se han involucrado en la inducción del sueño, i.e. el tipo A<sub>1</sub> y el tipo A<sub>2A</sub>. Usando ratones KOs se encontró que es el bloqueo del receptor A<sub>2A</sub> el principal responsable del efecto de alertamiento de la cafeína, ya que los mutantes para ese receptor no se alertan, a diferencia de lo que ocurre en los KOs para el receptor A<sub>1</sub><sup>33</sup>. Por supuesto

que la misma información se puede obtener usando antagonistas selectivos para cada receptor antes de la inyección de cafeína, siempre y cuando estos antagonistas sean verdaderamente selectivos. En general, se considera que los KOs producen datos más confiables.

Otro ejemplo de la utilidad de los KOs son los ratones mutantes para el gen que codifica para la hipocretina. Fue gracias al estudio de estos ratones transgénicos que accidentalmente se descubrió que la etiología de **narcolepsia/cataplexia** tiene mucho que ver con la deficiencia en la sinapsis mediada por hipocretina<sup>34</sup>.

Los ratones KOs no expresan el gen en cuestión de manera *constitutiva*, es decir, desde el desarrollo embrionario y por ende esta mutación está presente en todos los tejidos del organismo. Esto ha dado origen a que muchos de estos animales no sean viables o más frecuentemente no presenten cambios significativos en su fisiología o conducta, ya que otros genes análogos compensan la pérdida. Por ejemplo, la estimulación del receptor A<sub>1</sub> en el cerebro basal anterior induce sueño, mientras que el ratón mutante para este receptor duerme la misma cantidad que un ratón silvestre y no menos, como debiera de esperarse basándose en los datos farmacológicos<sup>35</sup>. Así pues, últimamente se están desarrollando KOs **condicionales** donde se inactiva el gen de manera local y a voluntad, de manera que se pueda saber si en verdad son los receptores de este tipo reguladores del sueño en el área del cerebro anterior<sup>36</sup>. Al respecto, también se ha estado trabajando con la técnica de la inactivación parcial y local del ARN mensajero que finalmente producirá una disminución significativa en la proteína que trascibe. A esta técnica se le conoce como ARN de **interferencia** o **iRNA** por sus siglas en inglés. Debido a que el desarrollo de los KOs condicionales o del ARN de interferencia es muy reciente, casi no se han aplicado para estudiar la regulación del sueño y la vigilia, pero sin duda se usarán más y más en el futuro.

Las técnicas de biología molecular han contribuido además a *mapear* receptores u otras proteínas en el cerebro. El mapeo de receptores se suele hacer mediante **hibridación in situ** o **ISH**, y es muy utilizado cuando no existe un buen anticuerpo para marcar al receptor. La **ISH** se basa en el acoplamiento de una secuencia complementaria para el ARN mensajero que trascibirá a la proteína que

se desea mapear. La tradicional ISH utiliza secuencias complementarias marcadas con isótopos radiactivos, mientras que recientemente se usan marcadores fluorescentes o anticuerpos que permiten obtener una mejor resolución a nivel celular. Gracias a la ISH se ha podido mapear la ubicación de los receptores a hipocretina, ya que los anticuerpos no son suficientemente específicos<sup>37</sup>. Por otro lado, la ingeniería genética posibilita ahora estimular fenotipos neuronales específicos gracias a la expresión ectópica de *fotorreceptores*. A esta novedosa técnica se le conoce como **fotoestimulación optogenética**. Recientemente se crearon ratones transgénicos cuyas neuronas hipocretinérgicas expresan los fotoreceptores *rodopsina-2*. Así utilizando un rayo luminoso sobre estas neuronas trasfectadas, se logró estimularlas exclusivamente, y al hacerlo se observó que la latencia al despertar se redujo significativamente<sup>38</sup>.

Por supuesto que no se puede dejar de mencionar que la biología molecular ha comenzado a estudiar muy recientemente la expresión genética que está regulando el sueño y la vigilia. Con la ayuda de la técnica de los **microarreglos** o “chips” genómicos, se está estudiando esta expresión en cientos de miles de genes que se expresan en el cerebro de los roedores. En estos microchips se han fijado fragmentos de cADN o cARN para miles de genes, muchos de ellos cuya función no se conoce aún. El ARN mensajero total se extrae de una o más partes de tejido cerebral en diferentes condiciones experimentales (ej. vigilia vs. sueño) y luego se trascibe en forma reversa. Durante el mismo proceso, se puede marcar cada condición diferencialmente. Luego se expone este cADN a los fragmentos fijados en el microchip para que la unión específica ocurra; y finalmente, con la ayuda de lectores láser se cuantifican los niveles de expresión génica. Usando estos microchips genómicos, se ha descubierto que, en varias especies, la privación de sueño produce que cientos de genes aumenten su expresión a nivel de la corteza cerebral. De entre los más destacados, están los genes que participan en el metabolismo energético, la respuesta al estrés celular y la potenciación sináptica<sup>39</sup>. Finalmente se está abriendo otra frontera metodológica para estudiar los cientos de miles de proteínas que son sintetizadas por las neuronas. Dado que son las proteínas las que llevan a cabo

las funciones celulares, el enfoque **proteómico**, como se le llama, será fundamental para entender más aún sobre cómo se regula el sueño y la vigilia.

Como podrá verse, el campo de estudio del sueño y la vigilia es amplísimo y se sigue expandiendo. En los artículos subsecuentes, se revisarán con más detalle algunos tópicos fundamentales de esta disciplina de las neurociencias.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Campbell S.S. and Tobler I. (1984) Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8, 269-300.
2. Lyamin O.I., Mukhametov L.M., Siegel J.M., Nazarenko E.A., Polyakova I.G., and Shpak O.V. (2002) Unihemispheric slow wave sleep and the state of the eyes in a white whale. *Behav. Brain Res.* 129, 125-129.
3. Mukhametov L.M., Lyamin O.I., and Polyakova I.G. (1985) Interhemispheric asynchrony of the sleep EEG in northern fur seals. *Experientia* 41, 1034-1035.
4. Yoon I.Y., Kripke D.F., Youngstedt S.D., and Elliott J.A. (2003) Actigraphy suggests age-related differences in napping and nocturnal sleep. *J Sleep Res.* 12, 87-93.
5. Greenspan R.J., Tononi G., Cirelli C., and Shaw P.J. (2001) Sleep and the fruit fly. *Trends Neurosci.* 24, 142-145.
6. Smith J.R., Karacan I., and Yang M. (1977) Ontogeny of delta activity during human sleep. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 43, 229-237.
7. Klerman E.B., Davis J.B., Duffy J.F., Dijk D.J., and Kronauer R.E. (2004) Older people awaken more frequently but fall back asleep at the same rate as younger people. *Sleep* 27, 793-798.
8. Mistlberger R.E. (2005) Circadian regulation of sleep in mammals: role of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 429-454.
9. Hastings M.H. and Herzog E.D. (2004) Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol. Rhythms* 19, 400-

- 413.
10. Basheer R., Strecker R.E., Thakkar M.M., and McCarley R.W. (2004) Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog. Neurobiol.* 73, 379-396.
  11. Krueger J.M., Obal F.J., Fang J., Kubota T., and Taishi P. (2001) The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933, 211-221.
  12. Blanco-Centurion C., Xu M., Murillo-Rodriguez E., Gerashchenko D., Shiromani A.M., Salin-Pascual R.J., Hof P.R., and Shiromani P.J. (2006) Adenosine and sleep homeostasis in the Basal forebrain. *J. Neurosci.* 26, 8092-8100.
  13. Guzman-Marin R., Suntsova N., Methippara M., Greiffenstein R., Szymusiak R., and McGinty D. (2005) Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2111-2116.
  14. Blanco-Centurion C. and Salin-Pascual R.J. (2001) Extracellular serotonin levels in the medullary reticular formation during normal sleep and after REM sleep deprivation. *Brain Res.* 923, 128-136.
  15. Detari L., Juhasz G., and Kukorelli T. (1984) Firing properties of cat basal forebrain neurones during sleep-wakefulness cycle. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 58, 362-368.
  16. McGinty D.J. and Harper R.M. (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res.* 101, 569-575.
  17. el Mansari M., Sakai K., and Jouvet M. (1989) Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp. Brain Res.* 76, 519-529.
  18. Lee M.G., Hassani O.K., Alonso A., and Jones B.E. (2005) Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J. Neurosci.* 25, 4365-4369.
  19. Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G., and Kilduff T.S. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996-10015.
  20. Sherin J.E., Shiromani P.J., McCarley R.W., and Saper C.B. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271, 216-219.
  21. Semba K. (1993) Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 330, 543-556.
  22. Brown R.E., McKenna J.T., Winston S., Basheer R., Yanagawa Y., Thakkar M.M., and McCarley R.W. (2008) Characterization of GABAergic neurons in rapid-eye-movement sleep controlling regions of the brainstem reticular formation in GAD67-green fluorescent protein knock-in mice. *Eur. J. Neurosci.* 27, 352-363.
  23. Luppi P.H., Aston-Jones G., Akaoka H., Chouvet G., and Jouvet M. (1995) Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 65, 119-160.
  24. Kerman I.A., Bernard R., Rosenthal D., Beals J., Akil H., and Watson S.J. (2007) Distinct populations of presynaptic-premotor neurons express orexin or melanin-concentrating hormone in the rat lateral hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 505, 586-601.
  25. Sakurai T., Nagata R., Yamanaka A., Kawamura H., Tsujino N., Muraki Y., Kageyama H., Kunita S., Takahashi S., Goto K., Koyama Y., Shioda S., and Yanagisawa M. (2005) Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron* 46, 297-308.
  26. Blanco-Centurion C., Gerashchenko D., Salin-Pascual R.J., and Shiromani P.J. (2004) Effects of hypocretin2-saporin and antidopamine-beta-hydroxylase-saporin neurotoxic lesions of the dorsolateral pons on sleep and muscle tone. *European Journal of Neuroscience* 19, 2741-2752.
  27. Webster H.H. and Jones B.E. (1988) Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II.

- Effects upon sleep-waking states. *Brain Res.* 458, 285-302.
28. Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T., Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M., and Sakurai T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30, 345-354.
29. Portas C.M., Bjorvatn B., and Ursin R. (2000) Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog. Neurobiol.* 60, 13-35.
30. Zhang S., Lin L., Kaur S., Thankachan S., Blanco-Centurion C., Yanagisawa M., Mignot E., and Shiromani P.J. (2007) The development of hypocretin (orexin) deficiency in hypocretin/ataxin-3 transgenic rats. *Neuroscience* 148, 34-43.
31. Thannickal T.C., Moore R.Y., Nienhuis R., Ramanathan L., Gulyani S., Aldrich M., Cornford M., and Siegel J.M. (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27, 469-474.
32. Maquet P. (2000) Functional neuroimaging of normal human sleep by positron emission tomography. *J. Sleep Res.* 9, 207-231.
33. Huang Z.L., Qu W.M., Eguchi N., Chen J.F., Schwarzschild M.A., Fredholm B.B., Urade Y., and Hayaishi O. (2005) Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat. Neurosci.* 8, 858-859.
34. Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., and Yanagisawa M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98, 437-451.
35. Stenberg D., Littonius E., Halldner L., Johansson B., Fredholm B.B., and Porkka-Heiskanen T. (2003) Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J. Sleep Res.* 12, 283-290.
36. Scammell T.E., Arrigoni E., Thompson M.A., Ronan P.J., Saper C.B., and Greene R.W. (2003) Focal deletion of the adenosine A1 receptor in adult mice using an adeno-associated viral vector. *J. Neurosci.* 23, 5762-5770.
37. Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M., and Elmquist J.K. (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp Neurol.* 435, 6-25.
38. Adamantidis A.R., Zhang F., Aravanis A.M., Deisseroth K., and de Lecea L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450, 420-424.
39. Cirelli C. (2006) Cellular consequences of sleep deprivation in the brain. *Sleep Med. Rev.* 10, 307-321.

Autor responsable:

**Dr. Carlos A. Blanco Centurión**

Harvard Medical School/ Boston VA HealthCare System.

1400 VFW Parkway Bld. 3 Rm. 2C-109

Boston, MA. USA 02132

Tel. (001)-857-203-6161

Fax. (001)-857-203-5717

carlos\_blanco-centurion@hms.harvard.edu