



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA

**EFFECTOS EN EL CICLO VIGILIA-SUEÑO  
PRODUCIDOS POR ADMINISTRACIÓN DE  
HISTAMINA EN REGIONES COLINOCEPTIVAS  
DEL TEGMENTO PONTINO. ESTUDIO  
EXPERIMENTAL EN EL GATO DE  
LABORATORIO.**

**TESIS DOCTORAL**

**Cristina Bódalo Tejedor**

**Madrid, enero 2013**

**EFFECTOS EN EL CICLO VIGILIA-SUEÑO  
PRODUCIDOS POR ADMINISTRACIÓN DE  
HISTAMINA EN REGIONES COLINOCEPTIVAS DEL  
TEGMENTO PONTINO. ESTUDIO EXPERIMENTAL  
EN EL GATO DE LABORATORIO.**

Trabajo de investigación que presenta

**Cristina Bódalo Tejedor**

para optar al grado de Doctor por la Universidad  
Autónoma de Madrid en el Programa de  
Doctorado de Neurociencia

Dirigido por la Doctora

**Isabel T. de Andrés**

Catedrática del Departamento de Anatomía  
Histología y Neurociencia  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

Enero, 2013

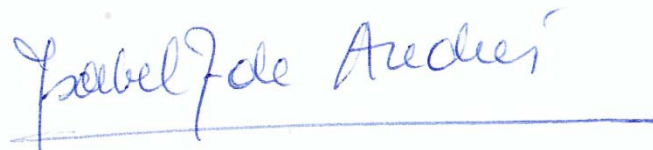
**Isabel T. de Andrés**, Catedrática del Departamento de Anatomía,  
Histología y Neurociencia de la Universidad Autónoma de Madrid

HACE CONSTAR: que **Doña Cristina Bódalo Tejedor** ha realizado  
bajo mi dirección el trabajo de su Tesis Doctoral  
titulada "Efectos en el Ciclo Vigilia-Sueño Producidos  
por Administración de Histamina en Regiones  
Colinérgicas del Tegmento Pontino. Estudio  
Experimental en el Gato de Laboratorio", que ha  
terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo original de investigación,  
quedo conforme con su presentación para ser juzgado  
como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo  
firmo en

Madrid a 11 de enero de 2013



Isabel T. de Andrés

El presente trabajo se ha realizado con la  
subvención:

FPU 2009-06991 del Ministerio de Ciencia e  
Innovación

---



Asumimos que vivimos despiertos  
ya que sólo al despertar  
somos conscientes  
de que hemos dormido  
e incluso soñado..

Pero pudiera ser  
que viviésemos dormidos..  
y soñásemos que despertamos

---

## Agradecimientos

Quiero empezar los agradecimientos por alguien que no está porque de alguna manera siento que me puso en este camino que parece que termina. Así que me quiero acordar de ella en este momento porque sé que estaría compartiéndolo conmigo si pudiese. Gracias por todo lo que me diste y lo que no me pudiste dar. Gracias por toda la alegría y el cariño que me regalaste. Te quiero y te querré siempre Mónica.

Y por supuesto *quiero agradecer a* Isabel de Andrés el haber confiado en mí .Por haberme enseñado tanto y tan bien. Sin todo tu apoyo, tu ayuda, tu sabiduría y tu generosidad, nada de esto hubiese sido posible. Nunca podré agradecértelo bastante y solo espero que no haya sido muy duro aguantarme. Ha sido un placer tenerte como directora de tesis tanto en el plano académico como en el personal.

Y gracias también a toda la gente del departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. A Marta por su forma de hacer las cosas sin perder nunca los nervios y estar siempre dispuesta a echarme una mano. A Miguel Garzón por prestarme su ayuda siempre que la he necesitado y por haberme enseñado. . A Marga, porque me gusta la gente que me hace reír y se ríe un poco de la vida, ha sido un placer cada ratito que he pasado contigo. Y a Lucía Prensa por esa dulzura que tiene y reparte. A Don F. Reinoso por su increíble depósito de artículos antiguos que me han fascinado y porque es un placer siempre escucharle y aprender de él. A Angel Nuñez por ser siempre amable. A todos los compañeros de la pecera que tan buenos momentos me han dado y en general a toda la gente del departamento por hacer de los años que he rondado por allí que todo sea tan agradable. A todos Gracias de verdad.

Y como no a mí familia que me han apoyado siempre. A mi padre por repetirme desde pequeña que lo único que no me podrían quitar nunca es lo que hubiese aprendido, por estar siempre ahí para arreglarlo todo. No sé como sería mi vida sin ti.

A mi madre, porque te adoro. Porque eres la única que aún me hace sentir que a veces yo también necesito que me cuiden como a una niña. Porque me quieres más que nadie, a mí y a mis hijos. Porque eres un ser bondadoso donde los haya.

Y a tí Angeli porque ya sabes todo lo que eres para mi...

A tí Alvarito no solo por tu ayuda técnica en esta tesis sino por tu apoyo y tu compañía en esta vida. Tus consejos siempre han sido los mejores. Gracias a tí y a tu pequeña familia... a Zule por sus correcciones y por hacerte feliz y a mi niña Flavia a la que adoro sin más. Os quiero.

Y a tí Jorge (hermano) por tu carisma y tu sensibilidad que me sigue recordando que no hay que olvidar los sueños. A mi Nurí por su portada y por estar siempre, sin juzgarme, queriéndome así...como soy. Y A tí Carlos porque no hay un solo día que no piense en ti y tenga ganas de darte un abrazo, ya sabes que eres mi otro hermano.

.

Muchísimas gracias a ti, mi compañero de vida, Jorge, por soportar todo lo malo de mí y quererme hasta en mis defectos. Por hacerme la vida divertida cada día. Te quiero más allá de ser pareja y por eso sé que siempre estaremos cerca. Gracias por apoyarme en este sueño que he cumplido y en todos los otros que soñamos juntos.

Y dejo para el final a las dos personitas más importantes de este mundo. Mis niños. Sé que si algo hay algo que merezca la pena en esta vida es teneros cerca cada día e intentar devolveros un poquito de la felicidad que me dais cada día tan solo por existir. Os quiero con toda mi alma y a vosotros os dedico esta tesis porque el tiempo que he invertido en ella os lo he robado a vosotros. Por vosotros soy.

Y gracias a todos los que no estáis aquí de forma expresa porque necesitaría otra tesis como esta para agradecerlos uno a uno todo lo que me dais cada día solo por estar ahí, a mi lado, os necesite o no. A todos los que formáis parte de mi vida..**Gracias.**

---



*A Mateo y Pablo*

---

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introducción</b>  | <b>1</b>  |
| El ciclo vigilia-sueño: características bioeléctricas y bases neurobiológicas de sus distintos estados |           |
| La vigilia   | 4         |
| El sueño lento   | 8         |
| Sueño REM  | 12        |
| <b>El sistema histaminérgico</b>   | <b>16</b> |
| Metabolismo de la histamina  | 16        |
| Anatomía del sistema histaminérgico  | 17        |
| Receptores de histamina  | 20        |
| <b>La histamina y el ciclo vigilia-sueño</b>   | <b>23</b> |
| Histamina y vigilia  | 23        |
| Histamina y sueño lento  | 24        |
| Histamina y sueño REM  | 25        |
| <b>Planteamiento y objetivos</b>   | <b>28</b> |
| La región dorsal del tegmento pontino oral (TPD)   | 29        |
| La región ventral del núcleo reticular oral del puente (VRPO)  | 30        |
| El núcleo reticular del puente caudal (RPC)  | 32        |
| Objetivos  | 36        |
| <b>Material y métodos</b>  | <b>37</b> |
| 1. Animales de experimentación   | 37        |
| 2. Medidas estereotáxicas para la implantación de las cánulas y los electrodos subcorticales           | 37        |
| 3. Cirugía   | 40        |
| 4. Cuidados postquirúrgicos  | 43        |
| 5. Registros poligráficos y tratamientos farmacológicos  | 44        |
| 6. Lectura y Análisis de los registros   | 46        |
| 7. Comprobación histológica  | 50        |
| <b>Resultados</b>  | <b>52</b> |
| Efectos de la administración de pirilamina intraperitoneal en el ciclo vigilia-sueño                   | 52        |
| Grupo I. Inyecciones localizadas en la región dorsal del tegmento pontino oral (TPD).                  |           |
| 1. Tiempo de permanencia en los distintos estados del ciclo vigilia sueño                              |           |
| 1. A. Experimentos con administración de histamina en el TPD   | 54        |
| 1. B. Experimentos combinados pirilamina+ histamina en el TPD  | 56        |
| 1. C. Experimentos con administración de nitroprusiato (vasodilatador) en el TPD                       | 58        |

|  |    |
|--|----|
| 2. Cambios en la arquitectura del ciclo vigilia-sueño tras la administración de histamina en el TPD -----                                  | 60 |
| 2. A. Cambios en la duración y número de los episodios de los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el TPD----- | 60 |
| 2. B. Cambios en las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el TPD-----                   | 62 |

## Grupo II. Inyecciones localizadas en la región ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO)

|  |    |
|--|----|
| 1. Tiempo de permanencia en los distintos estados del ciclo vigilia sueño -----  | 65 |
| 1. A. Experimentos con administración de histamina en el vRPO-----   | 65 |
| 1. B. Experimentos combinados pirilamina+ histamina en el vRPO-----  | 67 |
| 1. C. Experimentos con administración de nitroprusiato (vasodilatador) en el vRPO -----  | 69 |
| 2. Cambios en la arquitectura del ciclo vigilia-sueño tras la administración de histamina en el vRPO -----                                   | 71 |
| 2. A. Cambios en la duración y número de los episodios de los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el vRPO ----- | 71 |
| 2. B. Cambios en las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el vRPO -----                   | 75 |

## Grupo III. Inyecciones localizadas en el núcleo reticular caudal del puente (RPC)

|   |    |
|---|----|
| 1. Tiempo de permanencia en los distintos estados del ciclo vigilia sueño -----   | 80 |
| 1. A. Experimentos con administración de histamina en el RPC-----   | 80 |
| 1. B. Experimentos combinados pirilamina+ histamina en el RPC-----  | 82 |
| 1. C. Experimentos con administración de nitroprusiato (vasodilatador) en el RPC -----  | 84 |
| 2. Cambios en la arquitectura del ciclo vigilia-sueño tras la administración de histamina en el RPC-----                                    | 86 |
| 2. A. Cambios en la duración y número de los episodios de los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el RPC ----- | 86 |
| 2. B. Cambios en las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el vRPO -----                  | 88 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Discusión</b> .....   | <b>91</b>  |
| Microinyecciones intracerebrales.....                                      | 91         |
| Administración de nitroprusiato .....                                      | 93         |
| Los efectos de la histamina en las distintas areas microinyectadas.....    | 94         |
| <i>Experimentos con pirilamina y combinados pirilamina-histamina</i> ..... | 100        |
| Mecanismos celulares.....  | 104        |
| <br>   |            |
| <b>Conclusiones</b> .....  | <b>110</b> |
| <br>   |            |
| <b>Referencias</b> .....   | <b>113</b> |
| <br>   |            |
| <b>Anexo (figuras)</b>   |            |

---



## Abreviaturas

---

**A1 (receptor)**- subtipo de receptor A para para adenosina

**ANOVAs**- análisis de las varianzas

**AP**- plano antero posterior

**BC**- braquio conjuntivo

**BP**- braquio pontis

**CI**- colículo inferior

**CNQX** -antagonista de receptores glutamatérgicos No-NMDA

**CVS**-ciclo vigilia-sueño

**D<sub>1</sub> (receptor)**-subtipo de receptor 1 de dopamina

**D<sub>2</sub> (receptor)**-subtipo de receptor 2 de dopamina

**DAO**- enzima diamino-oxidasa

**DNR**- núcleo dorsal del rafe

**EEG**- Electroencefalograma

**EMG**-electromiograma

**EOG**-electrooculograma

**EPSPs**-potenciales sinápticos excitatorios

**GABA**- acido gamma amino butírico

**GABA<sub>A</sub> (receptor)** -subtipo de receptores tipo A para GABA

**H1(receptor)**- subtipo de receptores de histamina de tipo 1

**H2(receptor)** - subtipo de receptores de histamina de tipo 2

**H3(receptor)** - subtipo de receptores de histamina de tipo 3

**H4(receptor)** - subtipo de receptores de histamina de tipo 4

**HA**-histamina

**Hcrt 1**- hipocretina 1

**Hcrt 2** -hipocretina 2

**Hcrt/Ox**- hipocretina/orexina

**HDC**-enzima L-histidina descarboxilasa

**HNMT** -enzima N-metiltransferasa

**i.c.**-administración intracraneal

**i.p.**- administración intraperitoneal

**IMA**-acido 4-acético imidazol

**IPSPs**-potenciales sinápticos inhibitorios

**LC / Lc<sub>α</sub>** - locus coeruleus/ α

**Ldt**- núcleo laterodorsal tegmental

**L**-plano lateral

**MAO-B**- enzima monoamino oxidasa-B

**MnPN**- núcleo preóptico medial

**MORs (REMs)**- movimientos oculares rapidos

**MoV**- núcleo motor del trigémino

**NGL**-núcleo geniculado lateral del tálamo

**OS**- oliva superior

**P**-tracto piramidal

**PGO's**- ondas ponto-geniculo-occipitales

**PG-on**: neuronas cuyo disparo está asociado a la generación de las ondas PGO

**PLC<sub>α</sub>**- región del perilocus coeruleus α

**PPT**- núcleo tegmentopedunclopontino

**Receptores 5-HT1**-receptores subtipo 1 para serotonina

**Receptores 5-HT2**- receptores subtipo 1 para serotonina

**REM**-“Rapid Eye Movements”

**REM-off**- neuronas que se muestran silentes en sueño REM

**REM-on**: neuronas que descargan activamente en sueño REM

**Rf**- núcleo del rafe

**RPC** –núcleo reticular caudal del puente

**RPO**-núcleo reticular oral del puente

**SL**- sueño lento o sueño no-REM

**SNC**-sistema nervioso central

**TMN**-núcleo tuberomamilar del hipotálamo

**TPD**- región dorsal del tegmento pontino oral

**V**- vigilia

**vLPO**- región preóptica ventrolateral de hipotálamo

**V**-plano vertical

**vRPO** -parte ventral del núcleo reticular oral del puente

**WAKE-on**- neuronas que descargan activamente en vigilia

# Introducción

---

## El ciclo vigilia-sueño: características bioeléctricas y bases neurobiológicas de sus distintos estados.

---

Antes de que se iniciara el estudio científico del sueño se creía que éste era un estado “pasivo”, en el cual se interrumpía la actividad del organismo y su comunicación con el ambiente. Estas teorías pasivas del sueño derivaron de las antiguas hipótesis de Aristóteles, Platón y Galeno sobre el sueño y prevalecieron hasta principios del siglo XIX. A principios del siglo XX Pierón en una de las primeras aproximaciones al estudio del sueño lo describió como un comportamiento caracterizado por un estado de reposo durante el que no hay conciencia y se eleva el umbral de activación por estímulos sensoriales externos, siendo un estado reversible que cesa espontáneamente. Sugirió una relación entre ciertas sustancias químicas corporales y el estado del sueño (*Ramos Platón 1996b*).

Hans Berger realizó en 1924 el primer registro encefalográfico en humanos. Esto permitió el registro de las señales eléctricas del encéfalo durante el sueño (*Próspero García y Drucker Colín 1996*). Asimismo, observó que existía una correspondencia entre las características del EEG y los niveles de conciencia. Caracterizó los patrones de actividad  $\alpha$  y  $\beta$  y describió que durante la vigilia activa había un trazado del EEG con ondas rápidas y de pequeño voltaje (actividad  $\beta$ .) mientras que, a medida que se profundizaba en el sueño el EEG se lentificaba. En 1929 y oponiéndose a las teorías pasivas, Von Economo, en base a sus observaciones de las alteraciones del sueño manifestadas por los pacientes con encefalitis letárgica, así como del análisis del cerebro de estos enfermos tras su muerte, fue el primero en proponer que los sistemas que controlaban el estado de sueño y de vigilia se localizaban en distintas regiones del encéfalo. Dado que la hipersomnolencia se asociaba a lesiones del hipotálamo posterior y el insomnio era producido por lesiones en el hipotálamo anterior y el área preóptica, se postulaba la existencia de un centro promotor del sueño (*Jones 2011; Ramos Platón 1996b*).



A mediados de los años 30, Loomis estableció una correlación entre las etapas de vigilia y sueño en humanos y la actividad registrada en el EEG. Señaló que existían cuatro etapas desde la vigilia al sueño real. Una etapa A de vigilia con reposo donde se observaba un ritmo alfa. Un estado B1 de somnolencia donde se apreciaban ondas de bajo voltaje pero se perdía el ritmo alfa. Un estado B2 intermedio al sueño donde empezaban a aparecer ondas de bajo voltaje (ondas  $\delta$ ) y un estado  $\epsilon$ , que denominaba de "sueño real", donde se apreciaban husos de sueño y una cantidad moderada de ondas delta (*Davis et al. 1937*).

Por esta época, Bremer realizó estudios de sueño en gatos seccionando a distintos niveles del tronco del encéfalo. Observó que en los animales en los que se había realizado una transección a nivel bulbo-espinal se presentaba un registro EEG propio del estado de vigilia. Sin embargo, si la transección se hacía a nivel mesencefálico, el animal presentaba un EEG característico de sueño. Bremer interpretó estos hechos considerando el sueño como un fenómeno pasivo, consecuencia de la desafereñación cortical de los impulsos sensoriales que ascienden por el tronco del encéfalo (*Bremer 1936*).

Estas teorías pasivas se vieron potenciadas durante los años 40 por los trabajos de Moruzzi y Magoun, quienes consiguieron revertir el estado de sueño y sus manifestaciones en el EEG, estimulando la formación reticular del tronco del encéfalo. En base a sus hallazgos estos autores, describieron el llamado sistema reticular ascendente de activación como sustrato anatómico a la vigilia, de forma que siguieron considerando al sueño como un fenómeno pasivo, como consecuencia de la cesación de la vigilia por inactivación del sistema reticular ascendente de activación (*Moruzzi y Magoun 1949*). No fue hasta unos años después cuando este mismo grupo descubrió que existía también a nivel bulbar un área que al ser estimulada eléctricamente daba lugar a la aparición de sueño. Esto indicaba que existían en el SNC regiones hipnogénicas donde el sueño se generaba y que éste era, por tanto, un fenómeno activamente promovido por el SNC. Años antes; al igual que Von Economo, Nauta y Hess habían propuesto al prosencéfalo basal y al hipotálamo anterior como zonas de generación activa del sueño pero sus ideas habían sido

relegadas por el auge de las teorías pasivas del sueño. En los años 50 por fin queda zanjada la polémica y se confirma que el sueño es un fenómeno activo con regiones encefálicas encargadas de generarlo aunque para la aparición del sueño se necesita también que exista un nivel bajo de actuación del sistema responsable de vigilia (*De Andrés 1998*).

Eugene Aserinsky y Nathaniel Kleitman describen por primera vez en 1953 la existencia de una fase de sueño con movimientos oculares rápidos que se asocia a los ensueños y que se presenta a lo largo de la noche de una forma no azarosa sino con una ritmicidad. Describen, además, que durante esta fase del sueño la actividad cerebral es de baja amplitud y de frecuencia irregular y por tanto activada (*Aserinsky y Kleitman 1953*). Esta etapa de sueño pasa a ser llamada sueño REM (“rapid eye movements”) (*Aserinsky 1965*). Posteriormente fué descrito por Michel Jouvet en gatos denominándolo sueño paradójico. En el año 1968 Rechtschaffen y Kales designaron los criterios poligráficos que definen los estados del CVS en el hombre (*Próspero García y Drucker Colín 1996*). Estos criterios, con ciertas modificaciones introducidas muy recientemente (*Iber et al. 2007*) siguen siendo usados y dotaron de un *standar* universal para el análisis de los registros de sueño.

Por tanto; como se ha ido demostrando a lo largo de las últimas décadas, el sueño es un estado o una conducta que difiere cualitativamente del estado de vigilia y que está íntimamente relacionado con ella (*Ramos Platón 1996a*). Es un fenómeno activo, necesario, periódico, variado y complejo. Por otro lado el ciclo vigilia-sueño (CVS) es un ciclo circadiano -próximo a las 24 horas- en el que se pueden distinguir bioeléctrica y comportamentalmente principalmente tres fases: vigilia, sueño no-REM (o sueño lento) y sueño REM (o sueño paradójico). Este ciclo esta sustentado en una extensa red neuronal en la que participa de forma directa o indirecta todo el SNC. Sin embargo, existen estructuras nerviosas necesarias para que se organicen cada una de las fases del ciclo que utilizan distintos neurotransmisores y que están estrechamente conectadas entre sí. Mediante complejos patrones de conexiones y en un ejercicio de excitación/inhibición se produce la alternancia de las fases del ciclo, siempre regidos por el dador de tiempo circadiano, el núcleo supraquiasmático,

y modulados por las conexiones que reciben desde otras estructuras del SNC (*Reinoso-Suárez 2005*).

### La Vigilia

En la vigilia de humanos se diferencian dos estados: el de vigilia activa y el de vigilia tranquila (*De Andrés 1998*). En la vigilia activa, mientras el individuo se muestra con los ojos abiertos, la actividad del EEG muestra ondas rápidas de bajo voltaje de la banda beta (por encima de 13 Hz). Se ha descrito, asimismo, que durante los momentos en el que se precisa atención o se está ejecutando un procesamiento motor aparece una actividad rítmica gamma (de 30 a 60 Hz) en todas las áreas de la corteza cerebral (*Reinoso-Suárez et al. 2011*). En el electrooculograma (EOG), dependiendo del grado de exploración visual, aparecen algunos o muchos movimientos oculares rápidos y en el electromiograma (EMG) el grado de tono muscular es alto. En la vigilia tranquila, con ojos cerrados, la actividad del EEG presenta un patrón formado por una actividad mixta en la que destaca el ritmo alfa (8-13 Hz, 20-50  $\mu$ V) en corteza occipital (*De Andrés 1998; Reinoso-Suárez et al. 2011*). Da paso al adormecimiento. En el EOG predominan los movimientos oculares lentos pendulares (*Ramos Platón 1996a*) o están ausentes (*Reinoso-Suárez et al. 2011*) y en el EMG el tono muscular va moderándose según aumenta el nivel de relajación (*Ramos Platón 1996a*).

En el gato, que es la especie que se ha utilizado como modelo experimental en esta tesis también se divide la vigilia en dos estados. Un estado de vigilia 1 que se corresponde con el estado de vigilia activa y un estado de vigilia 2 también llamado somnolencia que se corresponde con el estado de vigilia tranquila en el cual no se observa un ritmo alfa continuo en el EEG como en humanos sino un patrón intermitente con ondas de alto voltaje de la banda theta que constituyen los llamados ritmos de relajación (*Ursin y Sterman 1981*). Esto se mezcla con una actividad de fondo de bajo voltaje (podemos encontrar la descripción más detallada

de las características poligráficas y posturales en esta especie en el apartado de materiales y métodos).

Los estudios de Von Economo indicando que lesiones del hipotálamo posterior producían un estado de hipersomnolencia señalaron la importancia de esta región en el mantenimiento del estado de vigilia. Además, Moruzzi y Magoun (1949) demostraron que los impulsos responsables de la vigilia procedían de la formación reticular del encéfalo que actúa sobre el tálamo y la corteza cerebral activando el EEG.

**El sistema reticular ascendente de activación** que se prolonga hasta el hipotálamo posterior y lateral (Reinoso-Suárez 2005; Reinoso-Suárez et al. 2011) incluye las siguientes estructuras:

1.- Grupos serotoninérgicos del tronco del encéfalo. Situados dentro y fuera de los núcleos del rafe que proyectan sobre diencefalo, telencefalo y estructuras troncoencefálicas además de vías directas a corteza cerebral (Reinoso-Suárez 2005). Estas neuronas están muy activas en vigilia y su descarga está asociada a la actividad motora de la vigilia especialmente a la que presenta patrones rítmicos como la automoción. De hecho desde los núcleos del rafe bulbares existe una amplia inervación sobre las astas medial y dorsal de medula espinal. La serotonina puede inhibir estas neuronas a través de los receptores 5-HT<sub>1</sub> o activarlas a través de los receptores 5-HT<sub>2</sub> (Jones 2005).

2.- Grupos noradrenérgicos del locus coeruleus. Estas neuronas descargan activamente en vigilia y presentan proyecciones ascendentes a prosencéfalo (entre las que se encuentran proyecciones directas a corteza cerebral) y descendentes a médula espinal (Reinoso-Suárez 2005). Ejercen diferentes efectos a través de sus distintos receptores. Por una parte a través de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  estas neuronas activan neuronas talámicas, hipotalámicas (promoviendo la activación cortical) y motoneuronas (promoviendo su actividad y por tanto el tono muscular en vigilia). Por otro lado a través de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  son capaces de

inhibir a neuronas promotoras del sueño del telencéfalo basal y a neuronas colinérgicas promotoras del sueño REM (*Jones 2005*).

3.-Grupos dopaminérgicos de la sustancia negra y el área tegmental ventral. Estas neuronas proyectan particularmente sobre el cuerpo estriado (desde sustancia negra) y a tálamo, corteza y neuronas colinérgicas del telencéfalo basal (desde el área tegmental ventral) (*Reinoso-Suárez 2005; Reinoso-Suárez et al. 2011*). Actúan a través de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> y parecen estar involucradas en el comportamiento de vigilia más que en la activación cortical. Aunque hay controversia al respecto parece la actividad de las células dopaminérgicas no solo está relacionada con la vigilia sino también con el sueño REM y debido al importante papel de la dopamina en el sistema límbico se considera que podrían mediar en los aspectos emotivos de los estados de ensoñación y vigilia (*Jones 2005*).

3.-Grupos colinérgicos de los núcleos tegmentopedunculopontino (PPT) y laterodorsal (Ldt) y del complejo del locus cerúleus (Lc) (*Reinoso-Suárez 2005*). Aunque en un principio se propuso a la acetilcolina como el principal neurotransmisor del sistema reticular ascendente de activación, estudios más tardíos demostraron que las neuronas colinérgicas quedaban restringidas a unas pocas zonas dentro del tronco encefálico. Estas neuronas son activas en vigilia y en sueño REM y descargan en asociación con una actividad rápida del EEG (*Jones 2005*). Tienen proyecciones principalmente ascendentes a tálamo y activan sistemas específicos e inespecíficos de proyección talamocorticales, aunque también proyectan por la vía ventral extratálmica a hipotálamo posterior (*Reinoso-Suárez et al. 2011*). Otro importante grupo colinérgico se extiende desde el mesencéfalo basal en lo que originalmente se llamaba el núcleo basal magnocelular de Meynert en primates. Estas células proveen de una rica inervación colinérgica a hipocampo y corteza y su activación parece asociada a la actividad rápida de la corteza cerebral, particularmente en el rango gamma (30-60 Hz) y negativamente correlacionada con la gamma delta característica del sueño lento (*Jones 2005; Reinoso-Suárez et al. 2011*).

4.- Neuronas glutamatérgicas que se encuentran en los tegmentos pontino y mesencefálico además de en hipotálamo lateral y posterior (*Reinoso-Suárez 2005; Reinoso-Suárez et al. 2011*). Al igual que las neuronas colinérgicas son activas en vigilia y en sueño REM, tienen proyecciones principalmente ascendentes a tálamo y corteza y descargan en asociación con una actividad rápida del EEG. El glutamato se considera el neurotransmisor principal del sistema reticular ascendente de activación y las neuronas glutamatérgicas se concentran principalmente en el puente oral y la formación reticular mesencefálica aunque también están presentes en la formación reticular bulbar. Estas neuronas proyectan tanto de manera ascendente a núcleos talámicos (los cuales a su vez proyectan a corteza con un sistema de proyección tálamo-cortical de manera profusa) y a hipotálamo (a nivel del prosencéfalo basal). A nivel de mesencéfalo estas neuronas glutamatérgicas descargan a su tasa más alta asociadas al nivel de activación de la corteza cerebral tanto en vigilia como en sueño REM. Por otro lado existe otra densa proyección descendente sobre todo desde los niveles del puente caudal y medular hacia medula espinal. La actividad de estas neuronas se asocia con los movimientos durante la vigilia y los movimientos fásicos del sueño REM. Entremezcladas con estas neuronas glutamatérgicas se encuentran también neuronas que sintetizan GABA y glicina cuya frecuencia de disparo aumenta durante el sueño lento y es baja durante las fases de vigilia y sueño REM (*Jones 2005*).

5.-Neuronas orexinérgicas (hipocretinérgicas) de hipotálamo posterior. (*Reinoso-Suárez 2005*). Las neuronas que contienen orexina (o hipocretina) están situadas fundamentalmente en la región perifornical pero también están dispersas en otras áreas del hipotálamo dorsal y lateral como en el núcleo dorsomedial hipotalámico (*Reinoso-Suárez et al. 2011*). Constituyen un sistema único que pese a estar representado por un número relativamente pequeño de células, sus proyecciones se distribuyen ampliamente por todo el sistema nervioso central. Aunque las hipocretinas no fueron formalmente descritas por dos grupos de investigación hasta el año 1998 (*De Lecea et al. 1998; Peyron et al. 1998*). Estas moléculas fueron aisladas en el año 1996 desde una sustracción hipotalámica (*Kilduff y Peyron 2000*). Son dos subtipos de péptidos excitatorios llamados hipocretina 1 (Hcrt 1) e

hipocretina 2 (Hcrt 2). Hay dos tipos de receptores hipocretinérgicos/ orexinérgicos. Las neuronas Hcrt/OX descargan de forma activa y a su tasa máxima durante la vigilia activa cuando el tono muscular es alto, su disparo decrece significativamente en la transición a vigilia tranquila y continua bajando durante las transiciones a sueño lento y están prácticamente silentes en sueño REM aunque comienzan a disparar entre unos 2 y 7 segundos antes de que se recobre el tono muscular y antes de que en el EEG se vea una atenuación del ritmo theta propio de esta fase REM (Lee et al. 2005). El déficit del sistema hipocretinérgico (bien por degeneración de sus neuronas o por ausencia de sus receptores) está asociado a la narcolepsia (Chemelli et al. 1999; Lin et al.1999), lo cual puede ser explicado porque las proyecciones Hcrt/Ox sobre la región pontina generadora del sueño REM inhiben esta fase del sueño (Moreno-Balandrán et al. 2008) a través de mecanismos inhibitorios mediados por GABA (Nuñez et al. 2006). Por otro lado, tanto las proyecciones Hcrt/Ox como la distribución de los dos subtipos de receptores (Trivedi et al.1998; Marcus et al. 2001; Del Cid-Pellitero y Garzón 2011a,b,y c) indican que la inervación orexinérgica ocurre en regiones ampliamente asociadas con el estado de vigilia tales como el núcleo tuberomamilar (TMN) del hipotálamo donde se encuentra la población de neuronas histaminérgicas, el núcleo dorsal del rafe (DNR) con neuronas serotoninérgicas, la sustancia negra con neuronas dopaminérgicas, el núcleo laterodorsal tegmental (Ldt) con neuronas colinérgicas y el locus coeruleus (LC) con neuronas noradrenérgicas.

6.-Neuronas histaminérgicas de hipotálamo posterior.\_De este sistema se hablará en profundidad en el apartado siguiente.

### El sueño lento (SL)

En humanos el sueño lento o sueño no-REM, se divide en 3 fases. La fase 1 o fase de adormecimiento que se caracteriza por una disminución del grado de activación cerebral y una reducción en la cantidad de ritmo alfa. El EEG presenta una actividad mixta de bajo voltaje con un abundante ritmo theta (4-8 Hz). El EMG muestra una actividad entre moderada y baja (Ramos Platón 1996a; De Andrés 1998). En el EOG

hay ausencia de movimientos oculares aunque se pueden observar movimientos lentos pendulares. La fase 2 marca el comienzo real del sueño y los grafoelementos característicos de esta fase son los llamados “husos de sueño” (ondas en ráfagas, sinusoidales, en la banda de frecuencia alfa, de 8 a 12 Hz y alta amplitud, con una duración de 0.5 a 1 segundo, e intermitentes) y los “complejos K” o “puntas del vértice” (onda negativa seguida de otra positiva de gran amplitud y que aparecen normalmente al final de un huso de sueño aunque también se presentan aislados). La actividad en el EMG es moderada o baja y los movimientos oculares son escasos (*De Andrés 1998; De Andrés et al. 2011*). Durante la fase 3-4 (actualmente denominada fase N3, *De Andrés et al. 2011*) va aumentando la cantidad de ondas lentas en el EEG de modo que la actividad delta (de 0,3-3.0 Hz y 75  $\mu$ V) llega a ocupar como mínimo un 20% del registro. La actividad del EMG y del EOG es muy parecida a la de la fase 2 o incluso más baja. La fase 3-4 (o N3) forma lo que se denomina el sueño de ondas lentas y es el sueño imprescindible, el más constante en duración entre las personas con distintos hábitos de sueño y el que primero se recupera después de una privación de sueño. Se le considera necesario para un rendimiento físico, intelectual y comportamental normal y suele disminuir en ancianos (*Reinoso-Suárez 2005; De Andrés et al. 2011*).

En la especie que se ha utilizado como modelo experimental en esta tesis, esto es en el gato, durante su sueño lento también ocurren los husos de sueño y ondas delta (véase más detalladas las características de este estado en el gato, en el apartado material y métodos) pero no se observan los complejos K (*Ursin y Sterman 1981*) (véase más detalladas las características de este estado en el gato, en el apartado material y métodos).

Existen tres regiones clave en la generación del sueño lento que son: el tálamo, la corteza cerebral y la región preóptica del hipotálamo anterior; además de otras regiones hipnogénicas de regiones caudales del tronco del encéfalo, que aunque no son capaces de inducir el SL por sí mismas si contribuyen a su regulación. (*Estas regiones han sido revisadas por Reinoso-Suárez 2005 y más recientemente por De Andrés et al. 2011*).



Ya dijimos que Von Economo fue el primero en sugerir que el hipotálamo anterior era una estructura promotora del sueño al comprobar cómo los enfermos con encefalitis que afectaba a esta estructura cursaban con una disminución de sueño lento. Este hecho ha sido confirmado por numerosos estudios posteriores, quedando establecido que, en concreto, la región preóptica ventrolateral (vLPO) y el núcleo preóptico medial (MnPN) son fundamentales para el establecimiento del sueño lento. En ambas estructuras se han determinado por registros unitarios simples que existen neuronas que descargan a una tasa elevada durante el sueño lento. Las neuronas del vLPO contienen el neuromodulador inhibitorio galanina y el neurotransmisor inhibitorio GABA, por su parte en las neuronas del MnPN se ha encontrado principalmente GABA. Se han encontrado además proyecciones de estas áreas hacia importantes estructuras vigiliantígenas como el TMN histaminérgico, el área orexinérgica de hipotálamo perifornical, las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal y células noradrenérgicas del LC; lo cual indica que el establecimiento y posterior mantenimiento del SL por parte de estas estructuras se produce por una modulación inhibitoria sobre estos múltiples sistemas de vigilia. Por otro lado, experimentos in vitro también han señalado como muchos de los neurotransmisores promotores de vigilia como la serotonina, la noradrenalina y la acetilcolina inhiben a estas neuronas gabaérgicas de la región preóptica (*De Andrés et al. 2011*).

Numerosos estudios de lesiones, por estimulación, o clínicos, demostraron por otro lado, que tanto el tálamo como la corteza cerebral eran estructuras absolutamente necesarias para generar las manifestaciones electrofisiológicas y comportamentales del sueño lento. Los mecanismos bioeléctricos que se dan en el SL dependen esencialmente de las relaciones bidireccionales tálamo-corteza cerebral. El tálamo contiene interneuronas y neuronas de proyección tálamo-corticales. Todas las interneuronas son gabaérgicas y existen dos tipos de interneuronas: las interneuronas del núcleo reticular talámico (que están presentes en todos los mamíferos) y las interneuronas intrínsecas de otros núcleos tálamicos (que no se encuentran en roedores). También existen dos tipos de neuronas de proyección talamocorticales: las neuronas tálamicas de matriz (tipo M) cuyos axones proyectan principalmente a capa I de corteza cerebral y las neuronas tálamicas de proyección

específica (Tipo C) que proyectan principalmente a capa IV de corteza cerebral (*De Andrés et al. 2011*).

Desde los años 80 las bases tálamo-corticales y cortico-tálamicas de los husos de sueño y la generación del ritmo delta han sido extensamente estudiadas por Steriade y sus colaboradores (*revisado por Nuñez y Amzica 2004*). En una serie de experimentos demostraron que la combinación de propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas tálamicas y corticales junto con sus conexiones sinápticas eran las responsables de la generación tanto de los husos de sueño como de las oscilaciones propias del ritmo delta durante el sueño lento. En concreto los husos de sueño son esencialmente generados por la actividad de las neuronas del núcleo reticular tálamico (que son gabaérgicas) que oscilan a la frecuencia de los husos y transmiten su actividad a los núcleos de proyección tálamo-cortical (de naturaleza glutamatérgica) generando en estos potenciales sinápticos inhibitorios (IPSPs). Sobre los potenciales sinápticos inhibitorios transmitidos a las células de proyección tálamo-cortical, se pueden generar espigas de calcio de bajo umbral que aumentan el nivel de despolarización y que por tanto dan lugar a que se pueden producir potenciales sinápticos excitatorios (EPSPs) rítmicos que se transmiten a las neuronas corticales. Por su parte, las oscilaciones del ritmo delta pueden ser generadas por las neuronas corticales y también de forma intrínseca por las neuronas talamocorticales cuando presentan niveles de hiperpolarización más bajos que los husos de sueño. Esta actividad delta intrínseca oscilante de las neuronas tálamicas puede ser transferida a corteza. Las actividades oscilatorias en neuronas tálamicas y corticales están completamente ausentes durante la vigilia y el sueño REM, ya que durante estos estados, estas neuronas son despolarizadas y muestran un patrón de descarga tónica. El potencial de membrana de las neuronas tálamicas y corticales es principalmente controlado por inputs colinérgicos (*Nuñez y Amzica 2004*) además de glutamatérgicos y aminérgicos (estos últimos solo en vigilia). Por tanto, para que se produzca la actividad EEG del sueño lento es necesario que la tasa de disparo de los núcleos colinérgicos (LdT, PPT, ponto-mesencefálico, hipotálamo y prosencéfalo basal), orexinérgicos, así como de los núcleos glutamatérgicos y aminérgicos de estructuras mesopontinas esté decrecida o ausente (*De Andrés et al. 2011*).

En relación con regiones hipnogénicas caudales favorecedoras del sueño lento se encuentra la región del núcleo del tracto solitario donde estudios pioneros del grupo de Moruzi demostraron que se podía obtener sueño comportamental con ondas lentas en el EEG por una estimulación eléctrica a baja frecuencia. Estudios posteriores demostraron que también una variedad de sustancias como la serotonina, la morfina y otros agonistas opiáceos así como el glutamato aplicadas en este núcleo producían sueño lento (*De Andrés et al. 2011*). También las partes rostrales e intermedias del núcleo caudal reticular del puente se han mostrado como áreas importantes en la extensa red neuronal responsable de la organización del sueño lento; ya que, su estimulación con carbacol produce un estado de EEG sincronizado asociado a ondas ponto-geniculo-occipitales (PGOs) aisladas o en clusters (*Garzon 1996 -tesis-*) lo que hace suponer que esta zona concreta del tegmento pontino pueda estar relacionada en la generación de las actividades bioeléctricas del sueño lento que inmediatamente precede al sueño REM. Por último, cabe destacar el cerebelo que con acciones antagónicas de corteza y núcleos profundos también influye en la regulación del sueño-. Recientes estudios proponen al giro parahipocampal y al cerebelo como zonas que podrían cooperar estrechamente en el proceso de la información durante el sueño lento y por tanto en la consolidación de la memoria (*De Andrés et al. 2011*).

### El Sueño REM

En el hombre sueño REM se caracteriza por una actividad del EEG de bajo voltaje y frecuencia mixta que se conoce como “ritmo mezclado” igual al de la fase 1 de adormecimiento o somnolencia y que consiste en ondas rápidas de pequeño voltaje ondas dentro de las cuales aparece una actividad más lenta dentro de la banda theta (4-7 Hz). En el EOG se registran movimientos oculares rápidos MORs (siglas en inglés: REMs) aislados o más frecuentemente en salvas y que dan nombre a esta fase del sueño por ser característicos de esta etapa. En el EMG el tono muscular está completamente abolido, aunque a veces, coincidiendo con una gran densidad de MORs, se pueden presentar sacudidas musculares de localización anárquica. Esta

fase de sueño en niños se conoce también el nombre de "sueño activo". En gatos esta fase de sueño también se denomina "sueño paradójico" puesto que el EEG es activado con ondas rápidas de bajo voltaje prácticamente indistinguible del EEG de vigilia, hay atonía en el EMG y MORs en el EOG. Si se sitúan electrodos profundos en el núcleo geniculado lateral (NGL) y en el hipocampo respectivamente se observan las ondas ponto-geniculo-occipitales (PGOs) aisladas o en salvas y un marcado ritmo theta (*Ursin y Sterman 1981; De Andrés 1998*).

Se estima que la formación reticular pontomesencefálica es la responsable de generar el EEG desincronizado que aparece durante el sueño REM. Desde estas áreas hay conexiones directas (posiblemente glutamatérgicas) que llegan directamente a la corteza cerebral. También la activación de las neuronas corticales puede hacerse gracias a las conexiones talamocorticales, cuando desaparece la actividad oscilatoria de las neuronas talámicas por estimulación de las neuronas colinérgicas del núcleo pedúnculo pontino (*Reinoso-Suárez et al. 2001*)

En la atonía muscular hay pérdida del tono muscular porque de forma activa se produce una hiperpolarización de las motoneuronas que inervan la musculatura antigravitatoria (*Chase y Morales 1990*). En la hiperpolarización de las motoneuronas están implicadas dos áreas supraespinales: el tegmento pontino y el tegmento bulbar. El tegmento pontino actúa con proyecciones excitatorias sobre el núcleo reticular magnocelular bulbar y esta estación bulbar ejerce influencias inhibitorias en la médula espinal (posiblemente a través de interneuronas glicinérgicas) (*De Andrés 1998; Reinoso-Suárez et al. 2001; Reinoso-Suárez 2005*).

El ritmo theta está presente en el hipocampo durante los movimientos exploratorios de vigilia y durante el sueño REM. Esta generado a través de relaciones septohipocámpales, ahora bien, numerosos trabajos indican que el núcleo reticular oral del puente es un área troncoencefálica que facilita la generación del ritmo theta hipocámpal (*Nuñez et al. 1991; Vertes 2011*)

Las ondas ponto-geniculo-occipitales (PGOs) son potenciales fásicos que pueden ser registradas en el tegmento pontino del tronco del encéfalo, en el núcleo geniculado

lateral del tálamo (NGL) y en corteza occipital; derivando de este hecho su nombre. Esta actividad es un componente altamente distintivo del sueño REM en gatos. Como las PGOs comienzan a presentarse durante unos minutos previos a la entrada en sueño REM (en un estado que se puede definir como SL con PGOs) e incrementan su frecuencia durante esta etapa, se ha hipotetizado recurrentemente que su presencia es necesaria para el establecimiento y mantenimiento del sueño REM (*Quattrochi y Hobson 1999; Callaway et al. 1987*). Actualmente se acepta que la región mesopontina colinérgica es la región generadora de estas ondas PGOs donde se han localizado neuronas cuyo disparo está asociado a la generación de estas ondas (PG-on) (*Reinoso-Suárez et al. 2001*); ahora bien, la estimulación colinérgica de la región dorsal del tegmento pontino oral a nivel del locus coeruleus alfa y perialfa, así como de la parte rostral e intermedia del núcleo reticular caudal del puente da lugar a que aparezca actividad de ondas PGOs en asociación de un EEG sincronizado (*Garzón 1996 –tesis-; Moreno-Baladrán et al. 2008*)

Los movimientos oculares rápidos (MORs) fueron ya descritos cuando se descubre el sueño REM como “unos movimientos oculares rápidos y binocularmente simétricos, distintos a los observados en niños y adultos durante el sueño de ondas lentas, en cuyo caso los movimientos oculares son lentos, circulares y pendulares” (*Aserinsky y Kleitman 1953; Aserinsky 1996*). Son sacádicos, horizontales y activados por el núcleo abducens. Además de este núcleo tres estructuras preculomotoras que proyectan a este núcleo abducens están involucradas en la generación de los MORs. Estas estructuras son: la formación reticular paramedial pontina, la región periabducens y el núcleo prepósito hipogloso (*Reinoso-Suárez et al. 2001*).

El sueño REM es pues un estado complejo en sus manifestaciones bioeléctricas y en las bases neurobiológicas que las sustentan; además, lo característico para la definición de esta fase del sueño es que todas y cada una de estas manifestaciones se presenten al unísono. En base a experimentos realizados aplicando carbacol (agonista colinérgico) en el tegmento pontino, nuestro grupo pudo llegar a demostrar (*Reinoso-Suárez et al. 1994; Garzón et al. 1998*) que la parte ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) -al ser estimulada colinérgicamente- es la

zona capaz de sincronizar la actuación de los subsistemas que gobiernan las distintas manifestaciones que ocurren en el sueño REM para que se dé al aparición simultánea de las mismas. La aplicación de carbacol en el vRPO (y no en otras regiones pontinas) determina la aparición con una corta latencia de sueño REM indistinguible bioeléctricamente y comportamentalmente del sueño REM espontáneo (*Garzón et al. 1997*). Los estudios anatómicos examinando la conectividad del vRPO han demostrado que esta región está conectada bidireccionalmente con cada uno de los subsistemas que acabamos de describir generadores de los distintos eventos que ocurren en el sueño REM, posibilitando por tanto que el vRPO pueda reclutarlos para que aparezca esta fase del sueño. Por otra parte el vRPO también está conectado con estructuras involucradas en la generación de la vigilia como el hipotálamo posterior (*Reinoso-Suárez et al. 1994; De la Roza et al. 2004; Nuñez et al. 2006*), la región del locus coeruleus y los núcleos del rafe (*Reinoso-Suárez et al. 1994; Rodrigo-Angulo et al. 2000*) y otras estructuras generadoras del sueño lento como el tálamo y la región preóptica (*Reinoso-Suárez et al. 1990, 1994; Rodrigo-Angulo et al. 2008*) lo que indicaría que el vRPO pueda jugar un papel importante en las transiciones entre el sueño REM y los otros estados del CVS.

## El sistema histaminérgico

---

La histamina (HA) fue sintetizada por primera vez en el año 1907 por Winders y Vogt (*Monti 2011*) pero su actividad farmacológica no fue reconocida hasta tres años después, cuando Dale y Laidlaw observaron que su administración producía unos efectos similares a los observados en algunas reacciones alérgicas. Fue Kwiatkowski en el año 1943 el primero que detectó esta amina en el cerebro y unos años después Harris et al. (1952) detectaron cantidades relativamente altas de HA en el hipotálamo y otras áreas cerebrales (*Bongers et al. 2010*).

### Metabolismo de la histamina

La histamina no atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que su presencia en el SNC depende de la que es sintetizada por las neuronas histaminérgicas y mastocitos. La histamina en el cerebro es sintetizada a partir de la L-histidina que es transportada al interior del cerebro. La L-histidina es introducida en la neurona histaminérgica por un transportador L-aminoácido y una vez aquí es convertida en histamina por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC). Posteriormente, esta histamina es almacenada en vesículas por un transportador vesicular monoaminérgico hasta su liberación (*Thakkar 2011; Monti 2011*).

No parece que exista un mecanismo de recaptación activo de la histamina (*Monti 2011*) por lo que esta es inactivada principalmente por metilación de la enzima neuronal N-metiltransferasa (HNMT) que se localiza post-sinápticamente y en células gliales produciendo tele-metil-histamina que es después degradada por las enzimas monoamino oxidasa-B (MAO-B) y aldehído-deshidrogenasa para producir ácido tele-metil-imidazoacético (*Thakkar 2011*). Por otro lado existe una vía auxiliar de degradación de la histamina que a través de la enzima diamino-oxidasa (DAO) produce ácido 4-acético imidazol (IMA) que es un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub>. Aunque los primeros estudios descartaron la presencia de DAO en el cerebro,

estudios posteriores encontraron una actividad mínima en algunas áreas del SNC (*Waldmeier 1987*) y también se ha detectado la presencia de IMA en el cerebro aunque se desconoce si este proviene únicamente de la oxidación de la histamina (*Tunnicliff 1998*). Estudios más recientes encuentran niveles altos de esta enzima en el tronco del encéfalo (*Klocker et al. 2005*) en concreto en los astrocitos de su formación reticular (*Sasabe et al. 2012*). Vías adicionales para la inactivación de la histamina cerebral podría incluir a mastocitos u otros componentes no-neuronales (*Tiligada 2011*). Estudios realizados con la inhibición de la enzima HDC a través del compuesto  $\alpha$ -fluorometilhistamina ( $\alpha$ -FMH), tienden a indicar que el turnover de la histamina cerebral es rápido con una vida media de aproximadamente 30 minutos (*Monti 2011*), que varía significativamente con el estado funcional (*Thakkar 2011*). La síntesis de histamina y su liberación esta bajo el control de los autoreceptores inhibidores de histamina de tipo 3 (H3) que se localizan en el soma y las terminales axónicas de las células histaminérgicas.

### Anatomía del sistema histaminérgico

Aunque diversos estudios de lesiones, bioquímicos y electrofisiológicos indicaban la presencia de un sistema histaminérgico en el encéfalo, no fue hasta el año 1984 cuando los estudios de Panula y Watanabe con anticuerpos anti-histamina o de histidinadescarboxilasa (HDC) establecieron los patrones de localización y proyección de las neuronas histaminérgicas. Estos estudios mostraron que las neuronas de histamina se encuentran restringidas en una pequeña región del hipotálamo lateral – el núcleo tuberomamilar (TMN)- y tienen unos amplios y difusos patrones de proyección (*Brown et al. 2001; Panula et al. 1989*). El TMN se localiza rostral al cuerpo mamilar y caudal al quiasma óptico en el suelo del tercer ventrículo en el hipotálamo. Las neuronas histaminérgicas son células grandes principalmente, de 25 a 30 $\mu$  de diámetro que contienen junto con histamina un gran número de sustancias. (*Brown et al. 2001; Panula et al. 1989*). Aunque en todas las especies mamíferas examinadas las neuronas histaminérgicas son principalmente localizadas dentro del TMN y en regiones adyacentes, existen pequeñas diferencias entre especies. En



humanos las neuronas histaminérgicas se distribuyen dentro y alrededor del TMN, mientras que en el ratón estas neuronas histaminérgicas aunque se localizan también en el TMN este es menos compacto y contiene menor número de neuronas y más pequeñas. Por otro lado en el cerebro de gato el TMN es compacto y se localiza principalmente en el hipotálamo posterior ventrolateral. Además de histamina algunas neuronas del TMN también contienen glutamato descarboxilasa (enzima sintetizadora de ácido gamma amino butírico ó GABA), adenosina deaminasa (enzima envuelta en la degradación de adenosina), galanina, sustancia P y péptidos derivados de la pro-encefalina. La significación funcional de estas sustancias neuroactivas co-localizadas es desconocida por el momento. (*Thakkar 2011; Brown et al. 2001; Panula et al. 1989*).

Las neuronas del TMN reciben múltiples aferencias excitatorias de la mayoría de regiones del sistema nervioso central (SNC), especialmente de las zonas promotoras de vigilia como el tegmento mesopontino (aferencias colinérgicas), el núcleo del rafe (aferencias serotoninérgicas), hipotálamo lateral (aferencias orexinérgicas y glutamatérgicas) además de aferencias glutamatérgicas del área preóptica lateral y corteza prefrontal. Por otro lado, reciben también importantes entradas inhibitorias de galanina y GABA desde la región preóptica ventrolateral (vLPO) responsable del silenciamiento de las neuronas histaminérgicas durante el sueño lento y que están modulados a su vez por inputs adrenérgicos y noradrenérgicos. (*Thakkar 2011; Brown et al. 2001*). También la prostaglandina E2 excita las neuronas histaminérgicas vía receptores EP<sub>4</sub> (*Hayaishi y Huang 2004*). Recientemente se ha demostrado que los receptores A1 para adenosina también están presentes en las neuronas histaminérgicas del TMN y que su activación reduce la liberación de histamina en la corteza prefrontal y promueve el SL sin afectar al sueño REM vía receptores H1 (*Oishi et al. 2008*)

En cuanto a sus eferencias, las neuronas histaminérgicas del TMN proyectan ampliamente a muchas áreas cerebrales que incluyen sitios reguladores del ciclo vigilia-sueño y existe una marcada diferencia en la densidad de fibras en distintas regiones cerebrales así como una considerable variación entre especies. La densidad

más alta de fibras histaminérgicas se encuentra en el hipotálamo donde todos sus núcleos presentan una moderada o densa inervación (*Brown et al. 2001*) (*Panula et al. 1989*). En las vías eferentes ascendentes histaminérgicas destaca la inervación sobre corteza cerebral y tálamo, y sobre neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y de estructuras del sistema límbico como el hipocampo, el núcleo acumbens y la amígdala (*Stahl 2008*). Por otro lado existe también una densa inervación descendente dirigida principalmente a regiones del tronco del encéfalo, cerebelo y médula espinal (*Thakkar 2011*). Pese a que esta vía descendente tiende a presentar menor densidad de proyecciones que la vía ascendente existen notables excepciones como la sustancia negra, el área tegmental ventral, los colículos superiores e inferiores, la sustancia gris periacueductal y los núcleos vestibular, y trigeminal y del tracto solitario que reciben una densa inervación (*Brown et al. 2001*). En el gato concretamente en esta vía descendente además de un largo número de fibras aisladas, se observa que el haz ventral descendente se origina en la parte caudal del TMN y localiza tanto medial como lateral en el mesencéfalo. Aquí forma una densa red inervando la sustancia negra para después, a la altura del núcleo rojo, cambiar de dirección y dirigirse dorsalmente para inervar la sustancia gris periacueductal y la región mesopontina incluyendo el área pedúnculo pontina. También hay fibras histaminérgicas que atraviesan el braquio conjuntivo para inervar la parte más dorsal de la formación reticular pontina como las regiones del núcleo laterodorsal, el locus coeruleus  $\alpha$  y el perilocus coeruleus  $\alpha$  (PLC $\alpha$ ). Otras fibras histaminérgicas más mediales terminan en los núcleos del rafe. El número y densidad de fibras desciende significativamente en las zonas más ventrales y laterales de la formación reticular pontina; no obstante, se detectan fibras, en los núcleos reticulares oral (RPO) y caudal del puente (RPC) (*Lin et al. 1996*). De hecho, aunque la inervación en estas últimas áreas no sea muy abundante, la aplicación de histamina in vitro en rodajas del tegmento pontino determina respuestas excitatorias en las células de la parte ventral del RPO (*Nuñez et al. 1998*)

## Receptores de histamina

La primera evidencia de que existía un receptor de histamina se obtuvo en el año 1937 cuando Bovet y Staub descubrieron que el primer antihistamínico (timoxidietilamina) era capaz de prevenir el shock anafiláctico en animales. Años más tarde el descubrimiento por Ash y Schild de que algunos antihistamínicos como la mepiramina, podían bloquear algunas acciones farmacológicas de la histamina en los síntomas de las reacciones alérgicas, pero no sus efectos en las secreciones gástricas acidas sustentaron la hipótesis de que existían al menos dos subtipos de receptores de histamina (*Bongers et al. 2010*).

Se han descrito hasta el momento cuatro tipos de receptores para histamina de acuerdo a sus características farmacológicas. Los cuatro tipos de receptores se encuentran tanto fuera como dentro del SNC. Estos receptores son de la familia de receptores acoplados a proteínas G y presentan una actividad constitutiva en ausencia del agonista. La histamina preferiblemente se une a la forma activa del receptor y estabiliza este estado mientras que la mayoría de los antihistamínicos ejercen sus efectos como agonistas inversos, uniéndose preferentemente a la forma inactiva de dichos receptores (*Jones y Kearns 2011*).

Los receptores de tipo 1 (H1) se expresan en cerebro, tracto gastrointestinal, sistema cardiovascular, células endoteliales y linfocitos. Son receptores postsinápticos y son los mejor estudiados debido a que sus antagonistas presentaban efectos positivos en el control de los síntomas de la respuesta alérgica en humanos y se han usado como antihistamínicos debido a estas propiedades. Estos antagonistas de los receptores H1 conocidos como “antihistamínicos clásicos” tienen capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar sobre el SNC y son los principales responsables de los efectos sedativos de los antihistamínicos (*Bakker et al. 2007; Shigemoto et al. 2004*). Los receptores H1 se detectan a niveles particularmente elevados en áreas cerebrales relacionadas con el mantenimiento de la vigilia como son el tálamo, la corteza cerebral, grupos celulares colinérgicos del tegmento mesopontino y el prosencéfalo basal, así como en locus coeruleus y núcleos del rafe (*Thakkar 2011; Brown et al. 2001*). Además, se encuentran en altas densidades en el

sistema límbico, el núcleo accumbens, capa molecular del cerebelo, núcleos de los nervios craneales y en el núcleo del tracto solitario (*Brown et al. 2001*). En algunas neuronas se ha reportado que la activación de estos receptores provocan una despolarización y por tanto un incremento en la tasa de disparo, aunque ocasionalmente también se han observado hiperpolarizaciones o depresión en la tasa de disparo mediada por receptores H1 (*Brown et al. 2001*). La activación de estos receptores provoca la activación de la vía inositol 1-4-5 trifosfato y la movilización del calcio intracelular (*Jones y Kearns 2011*).

Los receptores de tipo 2 (H2) fueron identificados por Black y cols. en el año 1997. Son también heteroreceptores acoplados a proteínas G y al igual que los receptores H1 producen despolarización (son excitadores) y tienen una fuerte expresión en el cerebro y la medula espinal, particularmente densa en los ganglios basales y en partes del sistema límbico como el hipocampo y la amígdala (*Brown et al. 2001*). La función de estos receptores en el cerebro no ha sido identificada pero parece probado su implicación en la antinocicepción producida por opioides (*Parsons y Ganellin 2006*).

El tercer subtipo de receptor de histamina de tipo 3 (H3) fue descrito por Arrang en el año 1983 como un autoreceptor que regulaba e inhibía la liberación de histamina. Los receptores H3 están presentes en todas las áreas y capas de la corteza cerebral y muestran una alta densidad en el núcleo accumbens, el estriado y la sustancia negra; además están presentes en los cuerpos celulares y axones de las neuronas histaminérgicas del TMN. Estos receptores funcionan tanto como autoreceptores como heteroreceptores y diversos estudios han confirmado que la histamina por medio de este subtipo de receptor inhibe la liberación de algunos otros neurotransmisores como el glutamato, GABA, noradrenalina, dopamina, serotonina y acetilcolina mediante una inhibición de los canales de calcio presinápticos mediado por proteína G (*Brown et al. 2001*). Se ha detectado una heterogeneidad en la farmacología de los receptores H3 sobre todo entre especies distintas en relación a la respuesta que provocan a distintos agonistas y antagonistas y se ha sugerido que

existan varias isoformas del receptor H3 con distintas afinidades por el receptor (*Ireland-Denny et al. 2001; Hancock et al. 2003; Celanire et al. 2005*).

Un último subtipo de receptores llamados H4 fue clonado en el año 2000. Este nuevo miembro de la familia de receptores de histamina despertó un gran interés por su implicación en los procesos inflamatorios (*Brown et al. 2001*). Se expresa principalmente en células del sistema inmune y mastocitos induciendo la quimiotaxis (*Parsons and Ganellin, 2006*). Estos receptores se ha visto que son funcionalmente expresados en neuronas del SNC de mamíferos (*Connelly et al. 2009*) aunque su nivel de expresión en el sistema nervioso central es relativamente bajo (*Bongers et al. 2010*)

En el tronco encefálico existen pocos estudios detallados de la distribución específica de receptores de histamina. Un estudio detallado en rata muestra que a nivel del puente rostral las neuronas que muestran receptores H1 están localizadas en el triángulo formado entre el locus coeruleus y el núcleo medial parabraquial. En esta zona también se observa un número considerable de receptores H3 (*Lazarov y Gratzl 2006*). Estos receptores H3 del locus coeruleus al igual que los detectados en los núcleos del rafe se encuentran a nivel presináptico lo que indica que la histamina en estos núcleos podría regular la liberación de noradrenalina y serotonina (*Pillot et al. 2002*). Respecto a los receptores H2 un estudio observo que en general a nivel pontino existe una baja densidad de receptores H2 sugiriendo que las acciones de la histamina en este area son mediados preferentemente por los tipos H1 y H3 , aunque si encuentran una moderada expresión de estos receptores en los núcleos del rafe y el locus coeruleus donde co-localizarían con los receptores H1 (*Vizueté et al. 1997; Brown et al. 2001*).

## La histamina y el ciclo vigilia-sueño

---

La asociación del sistema histaminérgico con el ciclo vigilia-sueño (y más en concreto con el estado de vigilia) se produjo al observar como los fármacos antihistamínicos (antagonistas de los receptores H1) producían somnolencia (*Bakker et al. 2007; Shigemoto et al. 2004*). A partir de esto la implicación de la histamina en los distintos estados del CVS no ha dejado de investigarse.

### Histamina y vigilia

Hoy en día se acepta el papel de la histamina como un promotor del estado de vigilia. Estudios realizados con lesiones bilaterales de hipotálamo posterior o inyecciones de muscimol (un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub>) en esta región han demostrado producir un estado de somnolencia o hipersomnia (*Brown et al. 2001*). Las neuronas de histamina tienen una tasa de disparo que varía a lo largo del ciclo vigilia-sueño y al igual que otras neuronas monoaminérgicas (noradrenérgicas y serotoninérgicas) e hipocretinérgicas son activas en vigilia, disminuyen significativamente su tasa de disparo durante el sueño lento y quedan silentes durante el sueño REM. Son por tanto neuronas "Wake-on/REM-off" (*Vanni-Mercier et al. 2003; Rojas-Zamorano et al. 2009*) y se cree que están más involucradas en el mantenimiento de la vigilancia necesaria para los procesos cognitivos que para la inducción de esta (*Takahashi et al. 2006; Gerashchenko et al. 2004*), de hecho, su descarga está particularmente elevada durante la vigilia que precisa atención más que durante la vigilia con movimientos (*Jones 2005; Umehara et al. 2012*). La liberación de histamina en el cerebro presenta un ritmo circadiano (*Brown et al. 2001*) y su nivel en el líquido cefalorraquídeo de roedores es más alto durante el periodo activo (*Soya et al. 2008*) y sobre todo cuando hay condiciones de stress (*Tokunaga et al. 2009*)

También estudios con lesiones en el TMN han puesto de manifiesto que las neuronas histaminérgicas promueven el comportamiento apetitivo asociado a la alimentación, proporcionando el estado de vigilia óptimo necesario para la plena expresión de esta

fase de un comportamiento motivado (*Valdés et al. 2010; Umehara et al. 2012*). Mediante diversos estudios farmacológicos con histamina o agonistas de receptores H1 aplicados en distintas zonas del cerebro se ha observado una desincronización del EEG y un aumento de vigilia. Parece que esta promoción de la vigilia se debe a las densas proyecciones histaminérgicas a corteza cerebral así como a otras regiones subcorticales como el tálamo, grupos colinérgicos del prosencéfalo basal y del tronco del encéfalo, así como a grupos monoaminérgicos (*Lin et al. 1996, 2011*) que presentan una alta densidad de receptores H1 (*Brown et al. 2001*). Se ha sugerido también, que por la excitación de las neuronas colinérgicas del tronco del encéfalo se produce no solo la activación cortical que es característica de vigilia sino también del sueño REM (*Lin et al. 1996*).

Respecto a los receptores H2, inicialmente un estudio de bloqueo selectivo de estos receptores descartó su implicación en el control del CVS (*Monti et al. 1990*), aunque otros estudios usando agonistas específicos de estos receptores en la región preoptica sugirió que la inervación histaminérgica de la región preóptica - a través de los receptores H2 junto con los H1- está involucrada en el control del paso de sueño lento a vigilia (*Lin et al. 1994*).

Los estudios de sueño realizados con agonistas y antagonistas de los receptores H3 han dado distintos resultados a veces muy controvertidos, aunque el consenso general es que los antagonistas de los receptores H3 incrementan la vigilia y suprimen el sueño (*Barbier y Bradbury 2007; Barbier et al. 2007; Ligneau et al. 2007*).

### **Histamina y sueño lento**

Aunque se considera que la histamina tiene un efecto principal en el mantenimiento de vigilia lo cierto es que el bloqueo farmacológico de los receptores de histamina, la inhibición de la síntesis de histamina, lesiones en el TMN, o hiperpolarización de las neuronas histaminérgicas por agonistas gabaérgicos tiene un enorme efecto sedativo que provocan un aumento en sueño lento (*Soya et al. 2008; Sherin et al. 1998*).

Existe una densa inervación de las neuronas del núcleo ventrolateral de la región preóptica (vLPO) -cuyas neuronas que descargan preferentemente durante sueño-lento) hacia los somas y dendritas proximales de neuronas histaminérgicas del TMN (*Oishi et al. 2008; Sherin et al. 1998*). Estas terminaciones desde el vLPO liberan los neurotransmisores inhibitorios GABA y galanina (*Sherin et al. 1998*) además de ATP. Este ATP es una fuente importante de adenosina. Las neuronas histaminérgicas presentan el subtipo de receptor A1R para adenosina que promueve inactivación del sistema histaminérgico y por tanto un descenso de la liberación de histamina en corteza frontal. Esto da lugar a un incremento en la duración del sueño lento y de la densidad de la frecuencia delta (*Oishi et al. 2008*).

Por otro lado la inervación histaminérgica a las neuronas del vLPO es particularmente densa y por tanto recíproca y los niveles de histamina en este núcleo son mayores en vigilia, menores en SL y los más bajos se presentan en el sueño REM aunque estos niveles no se elevan con la privación de sueño en gatos (*Strecker et al. 2002*).

La histamina tiene capacidad de despolarizar las neuronas tálamo-corticales y bloquear con ello las actividades oscilatorias y de sincronización de los circuitos tálamo-corticales que conducen a la expresión de los husos de sueño y de las ondas lentas durante el SL (*Mignot et al. 2002*). De esta manera cuando las células histaminérgicas están activas pueden inhibir el sueño lento (*Lee et al. 2004*).

### Histamina y sueño REM

Aunque siempre se ha destacado el papel de las neuronas histaminérgicas en la vigilia un trabajo de Parmentier en el año 2002 encuentra que en ratones Knock-out para HDC (es decir que no pueden sintetizar histamina) los cambios fundamentales se observan en relación al sueño REM y no a la vigilia. En estos ratones se observa un significativo aumento del sueño REM y especula que el hecho de que estos resultados no se hubiesen observado antes podrían deberse a que no se había producido una inactivación completa de los receptores de histamina y deduce que dado que las neuronas histaminérgicas son silentes durante el sueño REM la falta de



esta histamina tendría un papel permisivo sobre el sueño REM, sugiriendo que las neuronas de histamina ejercen un control vía descendente sobre los mecanismos pontinos generadores del sueño REM (*Parmentier et al. 2002*).

Otros estudios con aplicación sistémica de antagonistas de receptores H1 han obtenido una clara reducción del sueño REM, que a veces no iba acompañado de cambios en V ni en SL atribuyéndose dichos efectos a un posible bloqueo por parte de los antagonistas H1 de los receptores muscarínicos troncoencefálicos (*Rojas-Zamorano et al. 2009; Marzanatti et al. 1989; Wauquier et al. 1981*), sin embargo, esta hipótesis es cuestionada ya que se ha observado que algunos antihistamínicos con relativa baja afinidad por los receptores muscarínicos tienden a reducir el sueño REM y su aparición (*Barbier y Bradbury 2007*).

Experimentos combinados de un agonista de los receptores H1 y un antagonista de estos mismos receptores pusieron de manifiesto que el bloqueo de dichos receptores no eliminaba la disminución del sueño REM producida por los agonistas H1 aunque si se bloqueaban los efectos observados en vigilia y sueño lento lo que hace sugerir que existen mecanismos de acción específicos de la histamina en el control del sueño REM distintos a los que existen para los otros estados del CVS (*Monti et al. 1986*).

Se ha indicado un posible control permisivo del hipotálamo posterior sobre los mecanismos pontinos responsables del sueño REM porque lesiones en esta región o inactivación de su parte caudal (*Lin et al. 1989*) causa una hipersomnía de sueño REM. Dado que las neuronas histaminérgicas tienen un patrón de disparo REM-off (y son por tanto silentes durante el sueño REM) se ha sugerido que estas neuronas histaminérgicas cuando están activas podrían bien excitar a mecanismos inhibidores del sueño REM (neuronas catecolaminérgicas) o bien inhibir a los mecanismos inductores del sueño REM (neuronas colinérgicas o colinoceptivas) (*Lin et al 1996*). Este autor señala también una tercera posibilidad y es que las neuronas histaminérgicas podrían ejercer un papel inhibitorio secundario del sueño REM por sus efectos vigilantígenos actuado sobre neuronas tónicas colinérgicas. La aplicación directa de histamina en el tegmento pontino no ha dado resultados concluyentes y

pasaremos a describirlos a continuación en el Capítulo siguiente de esta Tesis (Planteamiento)

# Planteamiento y objetivos

---

Como acabamos de señalar en el apartado de introducción, las células histaminérgicas del hipotálamo posterior presentan amplias proyecciones descendentes que llegan hasta la medula y que abarcan al tegmento pontino (*Panula et al., 1989; Lin et al., 1996*). El tegmento pontino es una región heterogénea tanto desde el punto de vista morfológico, como bioquímico y funcional (*Reinoso-Suárez et al. 2010*). Así, en el tegmento mesopontino se encuentran grupos noradrenérgicos (región del locus coeruleus) y serotoninérgicos (núcleos anteriores del rafe) cuyas proyecciones ascendentes son parte integrante del sistema reticular ascendente de activación. Las células noradrenérgicas y serotoninérgicas al igual que las histaminérgicas son activas en vigilia y silencian sus descargas durante el sueño REM (son pues neuronas llamadas Wake-on/Rem-off). Estas neuronas Wake-on/REM-off además de su papel activo en vigilia, se considera que juegan un papel permisivo en los mecanismos de sueño REM, ya que se necesita que estén silentes para que pueda darse esta fase del sueño (*Mc Carley y Hobson 1975*). En la región mesopontina dorsal hay también células colinérgicas (agrupadas fundamentalmente en los núcleos laterodorsal y pedúnculo pontino) dentro de las cuales hay poblaciones que pueden descargar selectivamente en vigilia (Wake-on) o bien en sueño REM (REM-on) fundamentalmente asociadas a la expresión de la actividad PGO y otras activas tanto en vigilia como sueño REM (Wake-on/REM-on) que a través de sus proyecciones a mesencéfalo, tálamo, hipotálamo y prosencéfalo basal actúan sobre los mecanismos comportamentales de vigilia y de la activación electroencefalográfica asociada tanto a la vigilia como al sueño REM (*Reinoso-Suárez et al. 2010*). Por otra parte, la formación reticular pontina medial fue dividida por Taber en 1961 en dos núcleos: el núcleo reticular del puente oral (RPO) y el núcleo reticular del puente caudal (RPC). El RPO se extiende rostralmente desde la desucción del braquio conjuntivo hasta su límite caudal a la altura del polo anterior del núcleo motor del nervio trigémino. El RPC se extiende desde el final del RPO hasta el nivel del núcleo prepósito hipoglosa. No hay una demarcación clara entre las dos divisiones de la formación reticular pontina (*Garzón, 1996-tesis*).

Como hemos indicado anteriormente las estructuras que generan los distintos signos particulares que en conjunto definen al sueño REM, se asientan tanto en el RPO

como el RPC (ver introducción). Además, los experimentos pioneros llevados a cabo por *Baghdoyan et al.* en el año 1984 demostraron que la estimulación con carbacol (un agonista de los receptores colinérgicos que no es degradado por la acetilcolinesterasa) del tegmento pontino producía sueño REM de corta latencia, mientras que la administración de esta sustancia en el mesencéfalo o en el tegmento bulbar era seguido de vigilia. Experimentos posteriores han demostrado que tanto el RPO como el RPC son regiones colinoceptivas. Asimismo, tanto las regiones dorsales y ventrales del RPO como las regiones mediales del RPO y RPC han sido propuestos por distintos grupos de investigación como las áreas pontinas capaces de producir sueño REM tras estimulación colinérgica (*Reinoso-Suárez et al., 2001*). Junto a una descripción de las características morfológicas y bioquímicas de cada una de estas regiones reseñamos a continuación la implicación de las mismas en los mecanismos de generación de sueño REM y/o de los distintos signos electrográficos que en conjunto definen a esta fase del sueño.

### 1. La región dorsal del tegmento pontino oral (TPD)

Esta es una región adyacente y caudal a la región mesopontina dorsal y comprende los núcleos subcoeruleus, locus coeruleus  $\alpha$  y perilocus coeruleus  $\alpha$  (PLC $\alpha$ ) (*Crochet y Sakai 1999*). Esta región dorsal del tegmento pontino oral (TPD) en el gato se caracteriza por presentar entremezcladas neuronas colinérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas, glutamatérgicas y gabaérgicas (*Jones and Beaudet 1987, Sakai 1991, Rodrigo-Angulo et al. 2000, 2005; Brown et al. 2008*). La región mesopontina y del reciben una densa proyección histaminérgica desde la región tuberal del hipotálamo (*Lin et al. 1996*). La región del TPD ( y en especial el PLC $\alpha$  ) ha recibido un gran interés porque fue propuesta como la región desencadenadora de sueño REM por estimulación colinérgica (*Vanni-Mercier et al. 1989*) y en ella se han descrito células REM-on (*Sakai 1985; Sakai y Koyama 1995*). Además experimentos en la región equivalente al PLC $\alpha$  en la rata - región denominada en este caso como núcleo sublaterodorsal- han demostrado que los animales con lesiones en esta región presentan fragmentación y sueño REM y episodios de sueño REM sin atonía efecto

este último, que posiblemente sea mediado por las neuronas glutamatérgicas, puesto que en el núcleo sublaterodorsal de la rata hay fundamentalmente células glutamatérgicas dándose prácticamente la ausencia de células colinérgicas y noradrenérgicas (*revisado por Krenzer et al. 2011*). La estimulación selectiva de esta región, con inyecciones de pequeño volumen de carbacol en gatos demostró la implicación de esta zona en la generación de atonía muscular, pero no confirmó que esta atonía estuviera asociada a sueño REM, ya que, cuando la atonía estaba asociada a un EEG desincronizado los signos comportamentales del animal eran de vigilia (*Reinoso-Suárez et al. 1994*). Experimentos posteriores (*Moreno-Balandrán et al. 2008*) administrando volúmenes pequeños y dosis muy bajas de carbacol (20-30nL, 0,02M) en el TPD a nivel del PLC $\alpha$  han confirmado el papel de este área en los mecanismos de atonía muscular, pero también indican que el TPD pueda tener un papel preparatorio para la generación de sueño REM; ya que, en estos casos la atonía aparece junto a un EEG sincronizado y ondas PGOs aisladas, eventos estos últimos que ocurren justo en la transición de sueño lento a sueño REM.

## 2. La región ventral del núcleo reticular del puente oral (vRPO)

Como el TPD la región ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) es un área bioquímicamente heterogénea con células glutamatérgicas (*Lai et al. 1999*), serotoninérgicas (*Rodrigo-Angulo et al. 2000*) y gabaérgicas (*De la Roza y Reinoso-Suárez 2006*). En nuestro laboratorio -con microinyecciones de carbacol de un amplio rango de dosis (1.0-0,01M) pero de pequeño volumen (20-30 nL)- se determinó que el vRPO (AP: 0.5 a 3.5, L=0.5 a 3.5; V=3.5 a 5, de acuerdo con el Atlas de *Reinoso-Suárez 1961*) era la única región del tronco del encéfalo donde el carbacol podía desencadenar sueño REM con una corta latencia (alrededor de 5 minutos) (*Reinoso-Suárez et al. 1994; Garzón et al. 1998; Moreno-Balandrán et al., 2008*). El sueño REM generado por estimulación colinérgica del vRPO tiene todas las características bioeléctricas presentes en el sueño REM natural (*Garzón et al. 1997; Moreno-Balandrán et al. 2008*).

El vRPO recibe proyecciones colinérgicas bastante dispersas desde estructuras situadas en el tronco del encéfalo aunque la mayoría de estas aferencias (en un 89%) se originan bilateralmente en los núcleos y células colinérgicas del tegmento mesopontino (*Rodrigo-Angulo et al. 2005*). Existen además numerosas aferencias no colinérgicas a esta región que indican que la estimulación colinérgica no sea el único evento decisivo para el desencadenamiento y control del sueño REM. Entre estas otras eferencias destaca una densa proyección gabaérgica desde el diencefalo (*De la Roza et al. 2004; Rodrigo-Angulo et al. 2008*). Además el vRPO concretamente desde el hipotálamo posterior recibe proyecciones hipocretinérgicas junto con otras que podrían ser histaminérgicas (*Nuñez et al. 2006*). Estudios *in vitro* han demostrado que las células del vRPO responden despolarizándose y aumentando la frecuencia de su descarga ante la presencia en el medio de acetilcolina, carbacol, glutamato e histamina mientras que son inhibidas por GABA, noradrenalina y serotonina (*Nuñez et al. 1997, Nuñez et al. 1998*).

Los tipos morfológicos de neuronas presentes en el vRPO son variados y de tamaños muy diversos. No obstante, mediante estudios electrofisiológicos *in vivo* con animales anestesiados se ha podido comprobar que funcionalmente en el vRPO hay dos tipos de neuronas denominadas tipo I y tipo II aunque no se pueden observar notables diferencias morfológicas entre ambos tipos (*Nuñez et al. 2002*). Las neuronas mayoritarias de tipo I tienen un disparo no rítmico en espigas simples o de 2 a 3 espigas. Las neuronas de tipo II presentan una actividad rítmica de disparo en forma de espigas simples o dobles. Las neuronas de tipo I se excitan por estimulación eléctrica del núcleo pedúnculo pontino mientras que las de tipo II se inhiben. Estas respuestas se bloquean con atropina por lo que se deduce que los inputs del Ppt al vRPO son colinérgicos y están mediados por la activación de receptores muscarínicos. Si se estimula eléctricamente una de las mayores aferencias al vRPO - que es el vRPO contralateral - tanto las células tipo I como tipo II se excitan y aumentan la frecuencia de descarga. Esta respuesta se bloquea por la adición de CNQX (antagonista de receptores glutamatérgicos No-NMDA) (*Nuñez et al. 2002*). La hipocretina 1 produce efectos inhibitorios tanto en las células tipo I como tipo II que son mediados a través de mecanismos gabaérgicos ya que estos efectos inhibitorios

de la hipocretina se bloquean con bicuculina (antagonista de receptores A gabaérgicos) (Nuñez *et al.*, 2006). Experimentos en curso en nuestro departamento (Nuñez, *comunicación personal*) indican que en el animal anestesiado la aplicación de histamina en el vRPO produce pocos efectos en la actividad espontánea de sus células; no obstante, la histamina de manera semejante a la hipocretina puede producir efectos inhibitorios en el vRPO; ya que, si se aplica histamina en el vRPO el aumento de la actividad evocada en las células tipo I y tipo II producida por estimulación eléctrica del vRPO contralateral queda disminuida. Todo esto hace suponer que existe una compleja organización sináptica entre los distintos terminales aferentes y las células del vRPO, de la que no están excluidas las aferencias histaminérgicas que puedan estar presentes. Organización que será la base para que se exprese la función del vRPO como el área del tegmento pontino desencadenadora del sueño REM.

### 3. El núcleo reticular del puente caudal (RPC)

El núcleo reticular del puente caudal (RPC) fue definido por Brodal en 1957 en el gato (Gerber *et al.* 1989). Aunque como hemos apuntado antes no hay un límite claro entre la terminación del RPO y el comienzo del RPC el polo anterior de este último se establece a nivel del núcleo motor del quinto par craneal. Se admite que el RPC contiene células gigantes que no contiene el RPO (Sanford *et al.* 2003). Las neuronas gigantes del RPC juegan un papel crucial en la mediación de la respuesta de sobresalto. El RPC recibe aferencias glutamatérgicas de los núcleos vestibular, coclear y trigeminal y proyecta directamente a las motoneuronas y parece jugar un papel integrador y modulador desde diferentes regiones del cerebro para iniciar o no la respuesta de sobresalto a través de receptores muscarínicos; respuesta que se encuentra alterada en numerosos desordenes psiquiátricos como la esquizofrenia (Bosch y Schmid 2006).

El RPC se propuso como el lugar capaz de generar sueño REM tras su estimulación con carbacol en la rata (Gnadt y Pegram 1986) y en todo caso se ha considerado



dentro de la red neuronal pontina responsable de la generación de sueño REM (Zarranz y Reinoso-Suarez 1971; Steriade y McCarley 1990; Capecce et al. 1998). Estudios realizados en gatos con transecciones a nivel del tegmento pontino caudal o a niveles prebulbares indicaron que el RPC es necesario para la generación en concreto de dos signos fásicos característicos del sueño REM como son los movimientos oculares rápidos y las ondas PGOs agrupadas en brotes (Vanni-Mercier et al. 1991). Por otra parte, en esta región el muscimol (agonista Gabaérgico) inyectado intracranealmente en ratas provoca una gran supresión del sueño REM aunque la inyección de un antagonista gabaérgico (bicuculina) no provoca, sin embargo, un aumento del sueño REM como cuando es inyectado en el RPO; lo cual, lleva a sugerir que el RPC juega un pequeño papel en la generación de sueño REM, aunque mecanismos gabaérgicos en esta zona podrían producir una fuerte inhibición del sueño REM (Sanford et al. 2003).

Estudios realizados en nuestro laboratorio con la administración de pequeños volúmenes de carbacol demostraron que la estimulación colinérgica selectiva del RPC producía un estado disociado con un comportamiento de sueño con sincronización en el EEG (característico de del sueño de ondas lentas) pero con ondas PGO en brotes (características de sueño REM) (Garzón 1996 -tesis).

**En resumen**, la región del tegmento pontino oral se nos muestra como una región heterogénea desde el punto de vista morfológico, bioquímico y funcional. Nuestro grupo ha trabajado ampliamente en esta zona para determinar su implicación en los mecanismos del CVS y llevando a cabo la estimulación colinérgica mediante administración de microinyecciones de carbacol en el tegmento pontino del gato, con un volumen (20-30nL) del orden de al menos 10 veces menor que el utilizado en otros laboratorios. Así se pudo llegar a determinar la heterogeneidad funcional de las regiones dorsales y ventrales del RPO y del RPC en los mecanismos del sueño REM demostrando que la zona ventral del RPO es la realmente efectiva para que el carbacol generase con una latencia muy corta sueño REM con todas las características poligráficas y conductuales que lo definen. Las otras regiones pueden

estar implicadas en otras fases del CVS y también pueden participar en la generación de signos poligráficos del sueño REM -como son la atonía muscular y las ondas PGOs- pero no en la generación del sueño REM al completo.

A pesar la existencia de proyecciones histaminérgicas al tegmento pontino desde el núcleo tuberomamilar hipotalámico (*Panula et al. 1989; Lin et al. 1996*) y de que como hemos descrito en la introducción existen evidencias cada vez más numerosas sobre que la histamina no solo tenga un papel regulador de la vigilia sino que también pueda actuar de forma específica sobre los mecanismos del sueño REM (*Monti et al. 1986; Lin et al. 1989; Parmentier et al. 2002; Barbier y Bradbury 2007*) y de la narcolepsia (*Celanire et al. 2005; Lin et al. 2008; Nishino et al. 2009; Guo et al. 2009*), de acuerdo a nuestro conocimiento, solo el grupo de Sakai (*Lin et al. 1996; Crochet y Sakai 1999; Koyama y Sakai 2000*) se ha preocupado con cierta extensión de determinar los efectos de la histamina al interaccionar con el tegmento pontino.

Según Sakai y colaboradores la histamina tendría un papel al actuar fundamentalmente en la parte más rostral y dorsal del tegmento pontino (nivel de la región del perilocus coeruleus alfa) extendiéndose hasta la unión mesopontina. La participación de la histamina estaría predominantemente referida a facilitar mecanismos de desincronización del EEG referidos especialmente a génesis de la vigilia y en mucha menor medida actuaría sobre los mecanismos del sueño REM; ya que, de acuerdo a sus resultados, tanto las microinyecciones de histamina como la perfusión de la misma mediante microdiálisis cuando se realizan en el tegmento pontino medio dorsal a nivel del locus coeruleus alfa producen supresión o reducción de la actividad de ondas lentas en el EEG que va acompañada de aumento de vigilia. Estos efectos son muy duraderos en el tiempo (*Lin et al. 1996; Crochet y Sakai 1999*). Respecto al sueño REM describen menos cambios destacando que consisten en una reducción transitoria (1 o 2 horas) de esta fase del sueño. Reducciones más notorias del sueño REM las encuentran en un trabajo posterior tras la administración de histamina en lugares más rostrales en el tegmento mesopontino adyacente a la sustancia gris periacueductal (*Crochet et al. 2006*). No obstante, también señalan en el caso de haber estimulado la región del perilocus coeruleus alfa que los animales

podían presentar episodios de sueño REM sin que apenas mediara sueño lento "a la manera de episodios de narcolepsia", en algunos casos señalan además que en vez de encontrar supresión de sueño REM este estuvo aumentado (*Lin et al. 1996; Crochet and Sakai 1999*).

Disto por tanto de estar esclarecido el papel que puedan jugar las proyecciones histaminérgicas al tegmento pontino en los mecanismos del CVS y más concretamente en la generación de sueño REM. Por otra parte, en los trabajos del grupo de Sakai el volumen de histamina suministrado en sus experimentos con microinyecciones (del orden de 200 a 500nL) y perfusiones fue muy grande (*Lin et al. 1996; Crochet and Sakai 1999*). Esta circunstancia limita el que la histamina pudiera actuar selectivamente en zonas del tegmento pontino que aunque están muy próximas entre sí, tal y como nuestros experimentos administrando pequeños volúmenes de carbacol han demostrado tienen distintos significados funcionales.

## Objetivos:

Teniendo en cuenta estos hechos, **el objetivo fundamental** de la presente Tesis doctoral fue llevar a un estudio sistemático con histamina que permitiera abordar la diversidad morfofuncional del tegmento pontino en los mecanismos del CVS en general y del sueño REM en particular.

Se han hecho por tanto, microinyecciones de histamina de pequeño volumen de histamina, para estudiar las posibles acciones en el CVS de este neurotransmisor al interactuar con:

1. **El Tegmento pontino dorsal (TPD) donde se encuentra situada la región del locus pericoeruleus alfa**, región implicada en los mecanismos de atonía muscular y con un significado funcional vigilántigeno o bien con un papel preparatorio para el desencadenamiento del sueño REM
2. **La región ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO), región generadora de sueño REM** que al ser estimulada colinérgicamente es la zona capaz de sincronizar la actuación de los subsistemas que gobiernan las distintas manifestaciones que ocurren en el sueño REM para que se dé la aparición simultánea de las mismas.
3. **La región rostral del núcleo reticular caudal del puente (RPC)**, región que participa en la generación de signos poligráficos del sueño REM como son la atonía muscular y las ondas PGOs pero no en la generación del sueño REM al completo.

Nos propusimos también como objetivos descartar que los efectos observados por la aplicación de histamina en los estados del CVS fueran debidos a acciones vasodilatadoras inespecíficas de la histamina y conocer si aquellos efectos podían estar mediados por los receptores H1.

# Materiales y métodos

---

Todos los experimentos se hicieron siguiendo la normativa de la Comunidad Europea (European Communities Council Directive, 86/609/EEC) y fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid.

### 1. Animales de experimentación

Se utilizaron 11 gatos adultos con pesos comprendidos entre 3.5 y 5 Kg de peso, 10 machos y 1 hembra con electrodos implantados crónicamente para poder llevar a cabo registros poligráficos de sueño y una o dos cánulas dirigidas estereotáxicamente que permitían la realización de microinyecciones en el tegmento pontino. En la selección de los animales, antes de proceder a realizar la implantación de electrodos y cánulas se tuvo en cuenta su docilidad para facilitar el manejo posterior del animal durante los procedimientos experimentales con la realización de las microinyecciones intracerebrales y obtención de los registros poligráficos.

### 2. Medidas estereotáxicas para la implantación de las cánulas y los electrodos subcorticales

Dado que, tanto el tegmento pontino -donde se pretendía llevar a cabo la administración de histamina y otras sustancias- y el núcleo geniculado lateral e hipocampo (donde se obtuvieron registros de campo como parte de los registros poligráficos de sueño), son todas ellas estructuras subcorticales, se utilizaron métodos estereotáxicos para llevar a cabo la implantación de la/s cánula/s y los electrodos subcorticales de registro. Las coordenadas de estas estructuras se obtuvieron a partir del Atlas del encéfalo de gato de *Reinoso-Suárez, 1961*.

Las regiones del tegmento pontino que abordamos con nuestras microinyecciones fueron :

- 1) La zona dorsal del tegmento pontino (TPD), en concreto a la región del perilocus coeruleus  $\alpha$  (PLC $_{\alpha}$ )
- 2) La parte ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO)

### 3) La parte rostral del núcleo reticular del puente caudal (RPC)

Estas estructuras tienen las siguientes coordenadas (en milímetros) respecto a los planos antero posterior (AP), vertical (V) y lateral (L):

|    | PLC $\alpha$ | vRPO       | RPC        |
|----|--------------|------------|------------|
| AP | -2/-3mm      | -1/-2mm    | -3/-4mm    |
| V  | 7mm          | 4/4.2mm    | 4.2mm      |
| L  | $\pm 2$ mm   | $\pm 2$ mm | $\pm 2$ mm |

Las coordenadas del núcleo geniculado lateral (GL) y del hipocampo para situar los electrodos subcorticales fueron las siguientes:

|    | GL          | Hipocampo  |
|----|-------------|------------|
| AP | +6.5 mm     | +3.5 mm    |
| V  | 13.5mm      | +17mm      |
| L  | $\pm 10$ mm | $\pm 7$ mm |

Las cánulas utilizadas fueron fabricadas con agujas de punción lumbar de calibre 20 provistas de un fiador metálico. Cánulas y fiador se cortaron dándoles una longitud de 2.2 cm. Estas cánulas permitían introducir a su través la aguja de una jeringa Hamilton de 0.5 $\mu$ l. En algunos casos en los que se insertaron dos cánulas al mismo animal ambas se pegaron en paralelo, con una separación entre ellas de 4 mm.

La colocación de las cánulas en el tegmento pontino se tiene que hacer a través de la fosa craneal posterior y puesto que en el gato la tienda del cerebelo se encuentra calcificada, para evitar chocar con esta, las cánulas han de orientarse con un ángulo de 35 grados con respecto al eje horizontal.

El procedimiento utilizado para determinar las coordenadas de las cánulas una vez puestas en el brazo estereotáxico con la inclinación de 35° fue el siguiente:

En un brazo vertical movable del aparato estereotáxico, completamente perpendicular al plano horizontal se sujeta una aguja hipodérmica que se coloca en el punto con coordenada 0 para los tres planos (AP, V y L). Tras hacer esto este brazo con la aguja se traslada a las coordenadas del punto donde se quiere realizar la microinyección. En otro brazo móvil que forma un ángulo de 35 grados con el plano

horizontal, se sujeta la cánula en la cual se ha insertado una jeringa Hamilton que sobresale 4 mm del extremo de dicha cánula. Se mueve el brazo con la cánula y jeringa insertado y se va aproximando hasta que la punta de la jeringa coincide con la punta de la aguja vertical que señalaba el punto diana. Alcanzado este punto, se anotan las coordenadas del brazo portador de la cánula con la aguja y se retira la aguja ya que al animal solo se le implantará la cánula utilizando dichas coordenadas. De esta forma, al realizar la implantación de la cánula, esta quedará situada 4mm por encima de los puntos diana evitando por tanto el daño tisular en ellos. Solo se tocarán estos puntos en el momento de realizar las microinyecciones al introducir de nuevo a través de la cánula la jeringa Hamilton. Cuando se colocan dos cánulas en el mismo animal el procedimiento es el mismo, las medidas de referencia se tomaron con respecto a la cánula izquierda. La otra queda implantada automáticamente a la misma altura en el lado derecho ya que como hemos indicado antes, previamente habían sido pegadas paralelas con una separación de 4 mm entre ellas.

Los electrodos subcorticales consisten hilo conductor de acero inoxidable forrado con telón y trenzado con 2 o 3 puntas que se cortan en bisel de forma que sus extremos no aislados, están separados entre sí 0.2mm para que de esta manera, al combinar los distintos terminales activos se pueda registrar la actividad de campo en el hipocampo y en el núcleo geniculado lateral. El abordaje de estas estructuras se realiza colocando directamente los electrodos trenzados en el brazo movable vertical del aparato estereotáxico. En primer lugar el brazo de estereotáxia con el electrodo se coloca de manera que las puntas activas del electrodo queden el punto 0 del atlas y después se desplaza el brazo con el electrodo trasladándolo en base a las coordenadas del atlas de cada punto. Se anotan por fin las coordenadas que hayan resultado de desplazar el brazo móvil con el electrodo subcortical de que se trate y estas coordenadas serán las que se utilicen para la implantación de los electrodos en el momento de la cirugía.

Una vez tomadas las medidas estereotáxicas todas las torres portadoras de cánulas y electrodos se colocan en un brazo auxiliar del aparato estereotáxico para que la punta de las cánulas y electrodos puedan estar sumergidas en una solución



desinfectante (Hibitane, ICI Pharma) hasta el momento de la cirugía.

### 3. Cirugía

El animal que iba a ser sometido a cirugía permaneció en ayunas 24 horas antes de la intervención. Se le administró anestesia general (Domtor 0.1mg/kg intramuscular y Doletal 14 mg/kg intraperitoneal. También se le administró una dosis de Orbenin 500 (cloxacilina 500mg) antibiótico de amplio espectro y atropina sulfato (0,5ml; 0,5mg) para evitar las secreciones mucosas.

Al animal anestesiado se le realiza la limpieza y rasuración del cuero cabelludo con maquinilla eléctrica y crema depilatoria. Después se le lleva a la mesa de cirugía donde se le monitoriza para el seguimiento de frecuencia cardíaca y se le coloca en el aparato de estereotáxia mediante dos barras laterales que se introducen por ambos conductos auditivos externos, dos barras que se fijan sobre los rebordes infraorbitarios y un último dispositivo que se coloca en los incisivos superiores. Una vez fijado el animal se le cubren los ojos con vaselina para evitar que la cornea se seque si permanecen abiertos y se colocan todos los paños quirúrgicos dejando únicamente al descubierto la bóveda craneal.

Todo el material quirúrgico empleado se ha esterilizado previamente en estufa, autoclave, o bien, en el caso de los electrodos corticales y aquellos que se utilizan para recoger movimientos oculares y actividad muscular se exponen a vapores de una mezcla de alcohol isopropílico y glutaraldeído. Se procede entonces a realizar una incisión amplia en la línea media del cuero cabelludo por delante del bregma hasta el polo occipital y se desinserta la muscula temporal para dejar la calota al descubierto. Valiéndonos del peristomo se procede a desperiostizar el hueso.

En primer lugar se procede a colocar los electrodos para registro de electroencefalograma (EEG) que consisten en 5 tornillos de acero inoxidable soldados a un cable conductor. Para la colocación de estos electrodos nos servimos como referencia del punto bregma marcando los puntos de colocación de la siguiente manera: 2 electrodos frontales que se colocan sobre corteza somatomotora y que se sitúan 2mm por delante del bregma y a 10mm a ambos lados de la

línea media; 2 electrodos occipitales que se colocan sobre corteza visual primaria y que se sitúan 21mm por detrás del bregma y a 2mm a ambos lados de la línea media; y un último electrodo que se utiliza como electrodo de referencia situado en el seno frontal. Una vez marcado el lugar de colocación se realizan los trépanos con un torno de dentista con cuidado para no perforar la tabla interna del hueso, se atornillan los electrodos y se aíslan y fijan al cráneo con cemento de dentista.

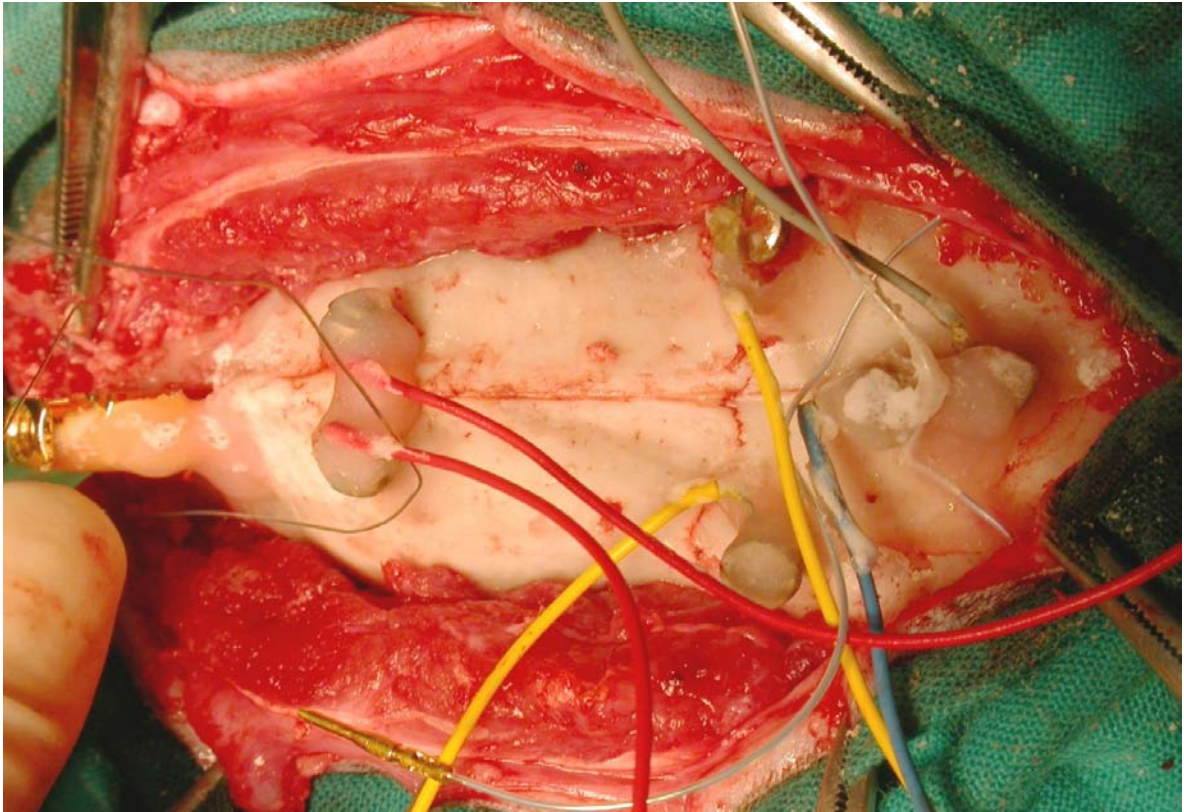


Foto 1-. Implante de electrodos para registro de EEG durante la Cirugía

A continuación se colocan los electrodos para registro del electroculograma (EOG) que consisten en dos electrodos de plata que se sitúan subcutáneamente lateralmente por encima de ambos rebordes supraorbitarios. Se fijan también con cemento de dentista al cráneo. Para registrar el electromiograma (EMG) se implantan 3 electrodos, estos son hilos de acero inoxidable forrados con teflón excepto en sus dos extremos terminales. En uno de los extremos la punta que no está aislada se dobla a modo de gancho para que se ancle a los músculos de la nuca. La inserción a esta musculatura se hace mediante una aguja que hizo de guía.

Se procede entonces a colocar la cánula utilizando la torre de estereotáxia y con las coordenadas que obtuvimos previamente. Para ello, se marca primero en el cráneo el lugar de entrada de la cánula y se hace la trepanación con una broca, después se procede a romper la duramadre con una aguja estéril despuntada. Una vez realizado el orificio de entrada se introduce la cánula muy lentamente evitando ejercer presión en el cerebelo. Una vez introducida la cánula el área de alrededor se sella con cera ósea y se fija al cráneo con el cemento de dentista.

Para el registro de la actividad PGO se implantaron 1 o 2 electrodos trenzados en uno o en los dos núcleos geniculados laterales (GNL) en base a las coordenadas estereotáxicas tomadas previamente. Para implantar estos electrodos se marcó el sitio de entrada, se trepano el cráneo y se rompió la duramadre con una aguja esterilizada y se introdujeron verticalmente moviendo el brazo de la torre estereotáxica. De esta misma manera se implanto el último de los electrodos de registro para registro de la actividad del hipocampo (ritmo theta).

Una vez implantados todos los electrodos se aíslan y se fijan al cráneo mediante la aplicación de cemento acrílico y se coloca en sus puntas externas unos terminales tipos pin de la marca Amphenol. Después todos los terminales pin se insertaron en una pieza de Amphenol modelo 223-1617 que consta de 17 puntos de conexión anotando los números que corresponden a cada terminal y que de forma general (salvo excepciones) seguían un orden determinado de acuerdo a la siguiente numeración:

1. Electrodo indiferente (I)
2. Corteza frontal izquierda (FI)
3. Corteza frontal derecha (FD)
4. Electrodo de tierra
5. Geniculado lateral derecho (GNLD)
6. Músculo (EMG)
7. Músculo (EMG)
8. Músculo (EMG)
9. Geniculado lateral derecho (GLD)
10. Ojo izquierdo (EOG)
11. Ojo derecho (EOG)
12. Corteza occipital izquierda (OI)
13. Corteza occipital derecha (OD)

14. Genuculado lateral (GL)
15. Genuculado lateral (GL)
16. Hipocampo
17. Libre

Por último, el conector de plástico de Amphenol también se fija al cráneo del animal mediante cemento acrílico. Como la cantidad de cemento aplicada en esta última fase es alta y su fraguación disipa mucho calor es conveniente ir humedeciendo la zona continuamente con suero salino. Por último se sutura la herida con puntos sueltos de seda y se aplicó una solución antiséptica de violeta de genciana y cloranfenicol. Antes de salir de la anestesia se les administraba subcutáneamente 60ml de suero salino con el fin de que se eliminara aquella más rápidamente.

#### 4. Cuidados postquirúrgicos

Tras la cirugía los animales eran llevados a su jaula en el animalario y se les doto de cobertura antibiótica (Orbenin) y de tratamiento analgésico (Matacán 0.1ml) por vía intramuscular durante 5 días. Permanecieron al menos una semana bajo vigilancia estrecha hasta su recuperación, suministrándoles agua y alimento por sonda o jeringa, caso de que no bebieran o alimentaran por si mismos



**Foto2. Animal experimental tras la cirugía donde se observa el conector implantado**

## 5. Registros poligráficos y tratamientos farmacológicos

Recuperados los animales de la cirugía (8-10 días tras la operación) y tras habituarles a las condiciones de los registros, se inició la experimentación.

En los registros más antiguos se utilizó un polígrafo marca Alvar tipo Reega XVI Bureau TR de 16 canales, que marchaba a una velocidad de 2.5mm/s en el paso del papel. Las hojas de papel utilizadas median 30 cm de longitud por lo que cada hoja correspondía por tanto a un tiempo real de 2 minutos. En los registros más recientes se utilizaron polígrafos digitales (Neurofax EEG 1000) que tienen incorporado software para la sincronización de imágenes de video con los registros poligráficos. Para la lectura de los registros se ajustó el tiempo de un minuto por pantalla.

Los registros se llevaron a cabo estando el animal dentro una cámara insonorizada provista de circuito cerrado de TV, a temperatura constante (22±2°C) y con el mismo régimen 12h:12h luz-oscuridad con el que viven en el animalario, con agua y comida *ad libitum*. La conexión al polígrafo se hace a través de un cable provisto de un rotor (slip-ring) que permite la total libertad de movimientos del animal durante los registros. Los registros se obtuvieron en soporte de papel o informático y se emplearon normalmente las mismas derivaciones bipolares 8 (polígrafo Alvar) u 11 canales de registro (polígrafo digital) en el orden que se describe a continuación:

| CANAL DEL POLIGRAFO | DERIVACIÓN | ACTIVIDAD REGISTRADA |
|---------------------|------------|----------------------|
| 1                   | 10-11      | EOG                  |
| 2                   | 11-10      | EOG                  |
| 3                   | 6-8 /7-8   | EMG                  |
| 4                   | 5-14       | PGO (GNL)            |
| 5                   | 1-16       | Hipocampo            |
| 6                   | 3-1        | EEG (FD-I)           |
| 7                   | 13-1       | EEG (OD-I)           |
| 8                   | 3-13       | EEG (FD-OD)          |
| 9                   | 2-1        | EEG (FI-I)           |
| 10                  | 12-1       | EEG (OI-I)           |
| 11                  | 2-12       | EEG (FI-OI)          |

En cada animal se llevaron a cabo registros poligráficos de al menos 6 horas de duración (entre las 10:00 y las 16:00) a intervalos semanales. En todos los gatos se tomaron registros poligráficos basales de control con administración de suero salino o bien realizando un simulacro de llevar a cabo la microinyección intracerebral. Para las microinyecciones intracerebrales de histamina, nitroprusiato y en su caso de suero salino o con simulacro de inyección intracraneal se sujetó con delicadeza al animal procediendo a desinsertar el fiador de la cánula. Por la cánula se introdujo la jeringa Hamilton de 0.5  $\mu$ l que sobresalía 4mm del extremo de aquella. Cuando la jeringa Hamilton estuvo completamente insertada se apretó el embolo para realizar la microinyección (volumen 20-30 nL). Realizada la microinyección con el fin de evitar un posible reflujo de la solución inyectada se mantuvo al animal sujeto sin desinsertar la jeringa para que esta permaneciera durante un minuto en el sitio de la inyección. En el caso de experimentos combinados de histamina y pirilamina, la pirilamina se administró primero por vía intraperitoneal y transcurrida media hora se inyectó la histamina i.c. Inmediatamente después de realizar las microinyecciones se conectó al animal al polígrafo para comenzar la obtención de los registros poligráficos.

Los experimentos se hicieron a intervalos semanales, y el orden de realización de los experimentos control o basales (con administración de suero salino o con simulacro de realización de microinyección), de las diferentes sustancias y dosis fue aleatorio. Las dosis están basadas en las utilizadas por otros autores (*Lin et al.1996*) de forma que la cantidad total de la sustancia administrada fue similar a la de los trabajos de estos autores. Ahora bien, para conseguir una mejor resolución espacial del area microestimulada el volumen (20-30-nL) de nuestras microinyecciones fue del orden de 10 veces menor a las realizadas por *Lin et.al 1996*.

Las sustancias utilizadas fueron:

- **Vehículo** (suero salino estéril 20-30 nL).
- **Histamina** (histamine dihydrochloride; SIGMA)  
165mM (0.6  $\mu$ g /20 nl). Preparación: se disuelven 3 mg de histamina en 0.1 ml

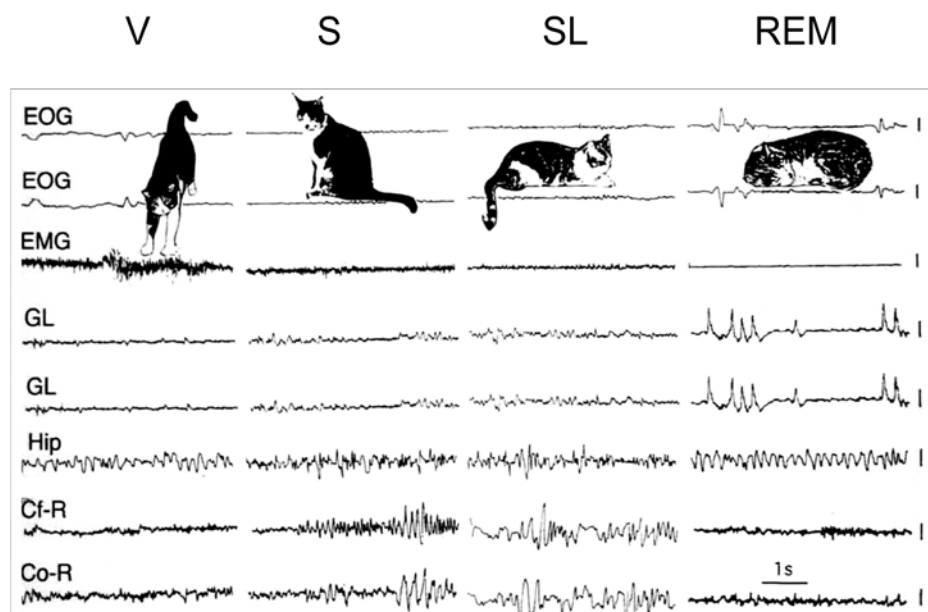
de suero salino estéril.

55mM(0.2  $\mu\text{g}$  /20 nl). Preparación: se disuelven 1 mg de histamina en 0.1 ml de suero salino estéril.

- El antagonista de receptores H1: **Pirilamina** (mepyramide maleate; SIGMA ). Se inyecta i.p. 1mg/kg de peso. En experimentos combinados (pirilamina e histamina intracraneal, la pirilamina i.p., se administró media hora antes que la histamina). Preparación: Se disuelve 1mg por 1ml de suero salino.
- El vasodilatador: **Nitroprusiato Sódico** (SIGMA) 165 mM (0.96  $\mu\text{g}$  /20 nl). Se utilizó para control de efectos inespecíficos producidos por posibles efectos vasodilatadores de la histamina. Preparación: se disuelven 4.8 mg en 0.1ml de suero salino estéril.

## 6. Lectura y Análisis de los registros

En épocas de un minuto, se analizaron visualmente los registros de acuerdo a los patrones poligráficos de las distintas fases del ciclo vigilia-sueño del gato que se consideran en nuestro laboratorio y que están detallados en manual de *Ursin y Sterman (1981)* sobre los patrones poligráficos del sueño y la vigilia del gato; siendo estos:



**Vigilia (V):** El EEG es desincronizado con una actividad rápida con ondas de la frecuencia beta (más de 13 Hz) de bajo voltaje (inferior a 50  $\mu\text{V}$ ). En el electroculograma (EOG), dependiendo del grado de exploración visual, aparecen algunos o muchos movimientos oculares y en el electromiograma (EMG) el grado de tono muscular es alto. No hay ondas PGOs en el GL, aunque puede haber pequeños potenciales de movimiento ocular y hay ritmo  $\theta$  (theta) en el hipocampo. El animal puede estar de pie, moviéndose o bien quieto sentado o tumbado.

**Somnolencia (S):** El EEG de fondo son ondas rápidas de bajo voltaje y frecuencia alta, pero sobre este patrón de fondo aparecen intermitentemente los llamados ritmos de relajación que son trenes de 4 a 8 segundos de duración con ondas de alto voltaje (por encima de 50  $\mu\text{V}$ ) con una frecuencia de entre 4 y 8 Hz. El criterio adoptado que para adscribir una época de un minuto al estado de somnolencia es que debe haber al menos dos ritmos de relajación en dicho minuto. No hay PGOs en GL y hay ritmo  $\theta$  en el hipocampo (aunque de menor amplitud que en vigilia). Hay tono muscular y los movimientos oculares si los hay son aislados. Generalmente el animal está sentado o bien tumbado quieto, en postura de "efigie" sin apoyar la tripa en el suelo.

**Sueño lento (SL):** El EEG es sincronizado más lento que en vigilia, se observan ondas delta (1.0-3.0Hz) de alto voltaje (superior 50  $\mu\text{V}$ ) y también intermitentemente *husos de sueño* -ondas en la banda de frecuencia alfa, de 8 a 12 Hz con una duración de 0.5 a 1 segundo, que al iniciarse tienen una amplitud baja que luego crece, para volver por fin a decrecer y que por lo tanto dibujan una figura de un huso-. A medida que el sueño lento es más profundo hay mayor predominio de las ondas delta. La actividad del EMG esta disminuida aunque normalmente se mantiene de forma tónica. No se observan movimientos oculares o cuando los hay son escasos y muy lentos producidos por la rotación del globo ocular. Las ondas PGO en el GL comienzan a observarse a medida que se incrementa la duración de esta fase y se aproxima el sueño Rem. En este caso, las ondas PGO son aisladas. En el hipocampo no es obvia la actividad theta, en cambio hay actividad de alto voltaje. Desde el punto de vista



postural, el animal esta tumbado con la tripa apoyada en el suelo, aunque puede mantener la cabeza erguida, raramente está sentado.

**Sueño REM o sueño paradójico (SP):** El EEG es desincronizado muy semejante a que se presenta en vigilia. Se pierde completamente el tono muscular en el registro de EMG y se observa un ritmo theta muy notorio en el hipocampo de voltaje mayor y mas rítmico que en vigilia. Además de estos eventos que podrían denominarse tónicos, existen otros eventos fásicos muy característicos de esta fase como son las ondas PGO en el GL (que ocurren aisladas o en salvas) y en el EOG se registran los movimientos oculares rápidos, cuyas siglas en inglés dieron el nombre a esta fase del sueño. El animal esta acostado y con la cabeza apoyada en el suelo ya que no puede mantenerla erguida por la abolición total del tono muscular.

Para la cuantificación de los registros cuando en una época de un minuto se observaba el patrón de más de una fase del CVS se le asignaba el estado que mayor tiempo de duración ocupaba en ese intervalo de un minuto.

En la recogida de datos de la lectura de los registros de cada animal se fue anotando la duración de cada episodio de cada uno de los estados del CVS conservando el orden de aparición y su alternancia de un estado a otro. Para analizar el tiempo de permanencia en cada estado del CVS se sumaron los minutos en cada estado en cada hora del total de las 6 horas de registro. Se cuantificaron también el número de episodios de cada estado en cada una de las horas de los registros. En el caso de que un episodio de una determinada fase del CVS estuviera caballo entre dos horas consecutivas, se asignó la ocurrencia de este episodio a la hora que contuviera su duración mayor. Los datos de las transiciones de un estado a otro se recogieron en un sistema matricial que consistía en 4 filas y 4 columnas correspondientes a los 4 estados del CVS; cada una de las celdas esta matriz contenía el número de las transiciones desde un estado (filas) a otro (columnas).

Como norma general, la cuantificación de los registros se hizo antes de contar con los

estudios histológicos que informaran de la localización real de las microinyecciones en cada animal. Por tanto, la falta de esta información determinó que la lectura de los registros se hiciera prácticamente de forma "ciega".

### Análisis estadísticos

En los análisis estadísticos que se aplicaron a los datos obtenidos de la lectura de los registros se utilizó el paquete estadístico Statview 5.

Una vez que el estudio histológico nos informó de la localización real de las microinyecciones en cada uno de los animales se hicieron tres grupos: Grupo I (con las microinyecciones situadas en la parte dorsal del tegmento pontino oral), grupo II (con microinyecciones situadas en la parte ventral del núcleo reticular oral del puente) y grupo III (con microinyecciones en el núcleo reticular caudal del puente). En cada uno de estos grupos se evaluó en primer lugar el tiempo de permanencia en cada estado del ciclo en los experimentos con administración de histamina i.c., en los experimentos combinados (pirilamina i.p. e histamina i.c.) y nitroprusiato i.c.

En relación con este parámetro del CVS, el primer análisis que se hizo estuvo enfocado a determinar a lo largo de cuánto tiempo y en que periodo pudieron ocurrir cambios en cada uno de los estados del CVS. Para ello, en los datos de los valores horarios de cada estado se aplicaron análisis de varianza (ANOVAs) de doble vía para medidas repetidas con los factores "tiempo" (valores horarios de cada estado) y "experimento" (valores registros basales y con la administración de histamina, valores registros basales y experimentos combinados pirilamina i.p e histamina i.c. y valores de registros basales y con la administración de nitroprusiato i.c.). Inicialmente se consideraron los valores de las 6 horas de registro; caso de que hubiera cambios significativos en el conjunto de las 6 horas totales, se trato de perfilar en que periodo ocurrieron los cambios más notables. Asimismo, también se examinó si hubo cambios pero que estos no se extendieron a todas las horas registradas. En los experimentos que resultaron con valores significativos en los ANOVA ( $p \leq 0.05$ ), se llevaron a cabo comparaciones a posteriori entre pares de datos aplicando el test de la mínima diferencia de Fisher para obtener información en que

hora/horas específica/s se dieron los cambios significativos.

Una vez que en cada uno de los grupos de animales se hubo detectado en que periodo de tiempo habían ocurrido los cambios más consistentes en el tiempo de permanencia en alguno de estados del ciclo se pasó hacer un análisis detallado de la arquitectura del CVS analizando en aquel periodo dado: 1) los cambios en la duración y frecuencia de episodios de cada estado y 2) los cambios en las relaciones de transición entre unas fases y otras del ciclo.

En relación con las transiciones, con los datos ordenados de forma matricial se elaboró una "matriz general" (Gómez-Montoya *et al.* 1978) calculando el porcentaje del número de transiciones desde un estado a otro del CVS con respecto al número total de transiciones ocurridas. Por otro lado, se analizó también si desde un estado determinado (vigilia, somnolencia, sueño lento o sueño Rem) este repartía de forma diferencial a otros del CVS, para ello se calculó lo que llamamos "matriz inicial" (Gómez-Montoya *et al.* 1978) hallando el porcentaje de las transiciones ocurridas desde un estado a otro respecto al número total de transiciones ocurridas desde ese estado al resto de los estados del CVS.

En los análisis referidos a la arquitectura del CVS se siguió utilizando los ANOVAs de doble vía (cambios en número de periodos por hora) o bien, comparaciones mediante la t de student (cambios en la duración de los episodios) o comparaciones mediante el test de t para datos pareados (cambios en la duración de los episodios más largos de cada estado y cambios en las transiciones de un estado a otro del ciclo).

## 7. Comprobación histológica

Finalizados los experimentos los animales se sacrificaron mediante sobredosis barbitúrica eutanásica (Dolethal, 100mg/kg) administrada por vía intraperitoneal. Los animales fueron perfundidos a través de la aorta ascendente con suero salino isotónico y paraformaldehído al 10% en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 (que actúa como solución fijadora). Puesto que los cerebros se iban a cortar con micrótopo de congelación a efectos de criopreservación, a continuación se perfundieron soluciones

de sacarosa en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 a 4°C en volúmenes de 500ml y a concentraciones crecientes: 5%, 10% y 20% .

Una vez finalizada la perfusión se decapitó al animal y se procedió a la apertura de la cavidad craneal. Retirado el cráneo y la duramadre el encéfalo se seccionó en 2 bloques mediante una sección frontal y los bloques se pasaron primero a una solución de sacarosa al 20% durante 24 horas a 4°C y de aquí a una solución de sacarosa al 30% en las mismas condiciones donde permanecieron de 24 a 72 horas para aumentar la crioprotección.

Por último se realizaron cortes seriados con un grosor de 40 a 50 micras de ambos bloques del cerebro con un micrótomo de congelación. Con el fin de reconocer el lado derecho del izquierdo en los cortes el lado derecho se marcó haciendo un pequeño orificio con un punzón en ese lado. Los cortes se montaron en un portaobjetos y se colocaron en una cestilla para su posterior tinción de Nissl. Una vez teñidos se procedió al examen bajo lupa de los cortes. Se siguió el tracto dejado por la penetración de la/s cánula/s y electrodos profundos y gracias a la pequeña reacción de gliosis que se produjo en el lugar donde se realizaron las microinyecciones se identificó el lugar donde se habían realizado estas. De esta forma los experimentos de cada animal se adscribieron a uno de tres grupos considerados, que como hemos indicado anteriormente son:

Grupo I : microinyecciones situadas en la región dorsal del tegmento pontino oral (TPD).

Grupo II: microinyecciones situadas en la parte ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO)

Grupo III: microinyecciones en el núcleo reticular caudal del puente (RPC).

# Resultados

---

## Efectos de la administración de pirilamina intraperitoneal en el ciclo vigilia-sueño.

---

Se presentan aquí los resultados de los experimentos tras la administración exclusiva de pirilamina por vía intraperitoneal (1mg/kg peso) que se llevaron a cabo en los 11 animales de nuestra casuística, comparándolos con los resultados de los tiempos de permanencia en cada uno de los estados del CVS presentados en los registros basales de los mismos animales. Estos experimentos se llevaron a cabo como control de los experimentos combinados con administración de pirilamina por vía sistémica (i.p.) seguida de la administración intracerebral de histamina en el TPD, en el vRPO y en el RPC.

### Vigilia

Los ANOVAS realizados para el tiempo de permanencia en vigilia tras la administración i.p. de pirilamina indicaron que no hubo diferencias significativas al considerar los valores de la administración de pirilamina y de los registros basales en las 6 horas totales de registro ( $F_{1,120}=0.082$ ,  $p>0.25$ ). Tampoco se registraron cambios en los bloques de las tres primeras y de las tres últimas horas ( $F_{1,40}=0.044$ ,  $p>0.25$ ). Como se puede observar en la Fig. 1<sub>R</sub> en ambos experimentos los valores de la vigilia activa son muy semejantes y con excepción de la primera hora el tiempo de permanencia en este estado es bastante pequeño para el resto de las horas.

### Somnolencia

Los ANOVAS realizados para el tiempo de permanencia en somnolencia tras la administración de pirilamina igual a lo observado en el caso de la vigilia también indicaron que no hubo diferencias significativas al considerar las 6 horas de registro ( $F_{1,120}=0.064$ ,  $p>0.25$ ), ni los bloques de las tres primeras y tres últimas horas ( $F_{1,40}=0.044$ ,  $p>0.25$ ). Como se puede observar en la Fig.1<sub>R</sub> parece que la somnolencia disminuyó ligeramente durante las tres primeras horas de registro y aumentó durante las tres últimas pero los resultados entre la interacción de los dos factores

(horas de registro x experimentos) no alcanzó valores estadísticamente significativos ( $F_{1,43}=1.42$ ,  $p\leq 0.25$ )

### Sueño Lento

Igual que lo observado en la vigilia y la somnolencia los ANOVAS realizados para el tiempo de permanencia en sueño lento tras la administración intraperitoneal de pirilamina indicaron que no se dieron diferencias significativas al considerar las 6 horas de registro ( $F_{1,120}=2.557$ ,  $p\leq 0.25$ ) ni en los bloques de las horas 1 a 3 ni de 4 a 6 ( $F_{1,40}=1.41$ ,  $p\leq 0.25$ ). Como se puede comprobar en la Figura 1<sub>R</sub>, el sueño lento fue bastante abundante en todas horas de registro y tras la administración de pirilamina i.p. estuvo aumentado ligeramente durante todas y cada una de ellas.

### Sueño REM

A diferencia de los otros estados del CVS, los ANOVAS para el tiempo de permanencia en sueño REM, indicaron que hubo diferencias significativas al comparar los resultados tras la administración de pirilamina i.p con los valores de los registros basales, tanto al considerar el total de las 6 horas de registro ( $F_{1,120}=10.62$ ,  $p\leq 0.005$ ) como en los bloques de 1 a 3 y de 4 a 6 horas ( $F_{1,40}=6.635$ ,  $p\leq 0.005$ ). Como se puede observar en la Fig. 1<sub>R</sub> el tiempo de permanencia en este estado disminuyó durante todas y cada una de las horas de registro, aunque los descensos más notables ocurrieron en la cuarta y la quinta hora posteriores a la administración del antagonista H1 (comparaciones post-hoc mediante el test de Fisher,  $p\leq 0.05$ ).

## Grupo I. Inyecciones localizadas en la región dorsal del tegmento pontino oral (TPD).

---

A este grupo pertenecen los resultados de las microinyecciones realizados por las cánulas derechas de los animales 4 y 5 y las 2 cánulas del animal 10. Como se puede comprobar en la Figura 2<sub>R</sub> en tres casos las microinyecciones quedaron situadas en la parte dorsal del tegmento pontino oral (TPD) a nivel del polo caudal de la región del perilocus coeruleus alfa (PLC $\alpha$ ); las microinyecciones por la cánula izquierda en el gato 10 quedaron situadas un poco más mediales al PLC $\alpha$ .

### 1. Tiempo de permanencia en los distintos estados del ciclo vigilia sueño

#### 1.A. Experimentos con administración de histamina en el TPD

La administración de histamina en el TPD (20-30nL, 165mM) se realizó en los 2 animales provistos de una sola cánula y por las dos cánulas del gato 10. Además por la cánula derecha de este último animal se realizó un experimento administrando adicionalmente una dosis menor de histamina (20 nL, 55mM).

Evaluado el tiempo de permanencia en cada estado del CVS al realizar los distintos experimentos en comparación con los registros basales de estos animales los resultados fueron los siguientes:

#### Vigilia

Los ANOVAS aplicados en el caso de las microinyecciones con histamina determinaron que existían diferencias significativas en el tiempo de permanencia en el estado de vigilia ( $F_{1,32}=5.35$ ,  $p\leq 0.05$ ) al considerar las cuatro primeras horas de registro tras las microinyección. Los cambios consistieron en aumento en el tiempo de permanencia de vigilia más acusado en la primera hora ( $p\leq 0.05$ , Fisher test, Fig. 3<sub>R</sub>). Al considerar las 6 horas totales de los registros no se alcanzaron valores estadísticamente significativos ( $F_{1,48} = 1.278$ ,  $p\geq 0.25$ ). Sin embargo el ANOVA comparando el tiempo de permanencia media en el bloque de las 4 primeras horas y



en el bloque de las 2 últimas horas, dio resultados significativos para la interacción tiempo x tratamientos ( $F_{1,19}=7.794$ ,  $p\leq 0.025$ ). De hecho en la quinta y sexta hora- a diferencia de lo ocurrido en las cuatro horas anteriores- la media en el tiempo de permanencia en vigila fue menor que en estas mismas horas de los registros basales (Fig.5<sub>R</sub>). Por tanto, los resultados significativos para la interacción tiempo x tratamientos es indicativo de que el aumento de vigila que se presentó en las cuatro primeras horas tras la administración de histamina en el TPD, dio paso a que hubiera un proceso de compensación descendiendo mas allá de los valores basales en el conjunto de las dos últimas horas de los registros.

### Somnolencia

Cuando se considero el total de las 6 horas de registro los cambios en la somnolencia estuvieron cerca de alcanzar valores estadísticamente significativos ( $F_{1,48}=2.846$ ,  $p\leq 0.10$ ) ya que el tiempo de permanencia en este estado estuvo ligeramente aumentado en todas y cada una de las horas (Fig 3<sub>R</sub>). Sin embargo, estos cambios no fueron significativos al considerar solo las cuatro primeras horas de los registros ( $F_{1,32}=2.767$ ,  $p\leq 0.25$ ), ni las dos últimas ( $F_{1,16}= 0.546$ ,  $p>0.25$ ) (Fig.5<sub>R</sub>).

### Sueño Lento

Hubo bastante estabilidad en el tiempo de permanencia de este estado (Fig.3<sub>R</sub>) de forma que los cambios no alcanzaron valores al considerar el conjunto de las cuatro primeras horas de los registros ( $F_{1,32}= 2.075$ ,  $p\leq 0.25$ ) ni en el total de las 6 horas de los registros ( $F_{1,48}= 0.151$ ,  $p\geq 0.25$ ) ni al considerar los bloques 1-4 horas y 5-6 horas ( $F_{1,16}= 2.447$ ,  $p\geq 0.25$ ) (Fig.5<sub>R</sub>).

### Sueño REM

Los cambios en el tiempo de permanencia en sueño REM fueron significativos al considerar tanto las 6 horas de los registros ( $F_{1,48}= 4.152$ ,  $p\leq 0.05$ , Fig.3<sub>R</sub>) como las 4 primeras tras la administración de histamina ( $F_{1,32}= 5.125$ ,  $p\leq 0.05$ , Fig.5<sub>R</sub>). Tal como se indica en la Figura 3<sub>R</sub> estos cambios consistieron en disminución de este estado que se expresó desde la primera hora y que fue especialmente manifiesto al realizar

las comparaciones por pares, mediante el test de Fisher, en la segunda y cuarta hora ( $p \leq 0.05$ ). En la quinta y sexta hora el tiempo de permanencia en sueño REM tras administrar histamina en el TPD fue bastante similar a los valores de estas horas presentadas en los registros control. De hecho, a diferencia de lo observado en vigilia, la comparación entre los bloques de las cuatro primeras horas y las dos últimas no dio resultados estadísticamente significativos en la interacción de los dos factores (tiempo y experimento) en los periodos de 1-4 horas y de 5-6 horas ( $F_{1,19} = 0.740$ ,  $p \geq 0.25$ ). Por lo tanto en estas dos últimas horas no hubo un exceso de sueño REM que compensara su disminución en las primeras 4 primeras horas de los registros ( Fig.5<sub>R</sub> ).

### 1. B. Experimentos combinados pirilamina+ histamina en el TPD

Los experimentos combinados administrando pirilamina (i.p., 1mgr/kg peso) e histamina en el TPD (20-30nl, 155mM) fueron realizados en los 3 animales de este grupo, aunque en el caso del animal que tenía 2 canulas bilaterales, solo se realizaron experimentos combinados por una de ellas. Estos resultados se muestran en la Fig. 4<sub>R</sub> donde -junto con estos resultados- se expone también el tiempo de permanencia en los 4 estados del CVS de los experimentos con administración intracraneal nitroprusiato (vasodilatador).

#### Vigilia

Los ANOVA examinando las variaciones en el tiempo de permanencia en vigilia en los experimentos combinados, administrando pirilamida i.p. e histamina en el TPD (Fig. 4<sub>R</sub>), no dieron lugar a resultados estadísticamente significativos (ANOVA 1-6 Horas:  $F_{1,36} = 0.655$ ,  $p \geq 0.25$ ; ANOVA 1-4 horas:  $F_{1,24} = 1.626$ ,  $p \leq 0.25$ ). Puesto que al administrar histamina sola y considerar el ANOVA con el tiempo de permanencia en vigilia en el conjunto de los bloques de la hora 1 a la 4 y de las horas 5 y 6 hubo diferencias para la interacción entre los dos factores tiempo-experimentos, se aplicó también el análisis de ANOVA en los experimentos combinados para aquellos bloques. En este caso tampoco hubo resultados estadísticamente significativos

( $F_{1,12} = 0.295$ ,  $p \geq 0.25$ , Fig.5<sub>R</sub>). En resumen, los experimentos combinados con la administración de pirilamina i.p. y de histamina en el TPD indican que la pirilamina es capaz de bloquear los cambios en el tiempo de permanencia en vigilia producidos por la administración de histamina en el TPD.

### Somnolencia

El tiempo de permanencia de la somnolencia en los experimentos combinados en las distintas horas de los registros, fue notablemente similar al presentado en las correspondientes horas de los registros basales (Fig. 4<sub>R</sub>). Ni en las 4 primeras horas de los registros, ni en el total de las 6 horas, las variaciones examinadas con los correspondientes ANOVAS resultaron ser estadísticamente significativas (Horas 1-4:  $F_{1,24} = 0.250$ ,  $p \geq 0.25$ ; Horas 1-6:  $F_{1,36} = 0.329$ ,  $p \geq 0.25$ ; Horas 5-6:  $F_{1,12} = 0.149$ ,  $p \geq 0.25$ . ) (Fig.5<sub>R</sub>).

### Sueño Lento

Como en el caso de la somnolencia, el tiempo de permanencia en sueño lento en los experimentos combinados de pirilamina+ histamina fue notablemente similar en las distintas horas de los registros al presentado en las correspondientes horas de los registros basales (Fig. 4<sub>R</sub>). Ni en las 4 primeras horas de los registros ni en el total de las 6 horas las variaciones examinadas con los correspondientes ANOVAS resultaron ser estadísticamente significativas ( Horas 1-4:  $F_{1,24} = 0.072$ ,  $p \geq 0.25$ ; Horas 1-6:  $F_{1,36} = 0.337$ ,  $p \geq 0.25$ ; Horas 5-6 :  $F_{1,12} = 0.624$ ,  $p \geq 0.25$ ) (Fig.5<sub>R</sub>).

### Sueño REM

A diferencia de la estabilidad en las proporciones de los otros 3 estados del CVS, las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño REM tras la administración combinada de pirilamina (i.p.) y de histamina (i.c.) en el TPD fueron estadísticamente significativas tanto para las seis horas de los registros ( $F_{1,36} = 7.249$ ,  $p \leq 0.025$ ) como para las 4 primeras ( $F_{1,24} = 7.662$ ,  $p \leq 0.025$ ). Los cambios consistieron en disminución del tiempo de permanencia en sueño REM especialmente notorios para las cuatro

primeras horas y que fue especialmente manifiesto al realizar las comparaciones por pares, mediante el test de Fisher, en la tercera y la cuarta hora de registro. En las dos últimas horas los valores de sueño REM en los experimentos combinados fueron mucho más próximos a los presentados en estas mismas horas en los registros basales (Fig 4<sub>R</sub>). La comparación entre los bloques de las cuatro primeras horas y las dos últimas dio resultados estadísticamente significativos ( $F_{1,12} = 5.976$   $p < 0.05$ ) pero no se alcanzó significación estadística al considerar la interacción de los dos factores (tiempo y experimento) en estos dos periodos; por lo tanto; en estas dos últimas horas no se expresó rebote alguno de sueño REM que compensara la pérdida en las horas anteriores (Fig 5<sub>R</sub>).

El comportamiento del tiempo de permanencia en el sueño REM ocurrido en los experimentos combinados, es muy similar al que se presentó en los experimentos en los que solo se administró histamina en el TPD. Es decir, la pirilamina no bloqueó la reducción de sueño REM que produjo la histamina al interaccionar con el TPD. Así pues, en conjunto, todos estos resultados podrían ser indicativos de que las acciones de la histamina en el TPD referidas al sueño REM podrían estar mediadas por receptores diferentes a las acciones producidas en la vigilia. No obstante, hay que tener reservas con esta consideración, teniendo en cuenta -como hemos indicado en el apartado anterior- que la pirilamina administrada sistémicamente, por si misma, produce una disminución en el tiempo de permanencia del sueño REM.

### **1. C. Experimentos con administración de nitroprusiato (vasodilatador) en el TPD**

Estos experimentos se llevaron a cabo en dos animales. Uno de ellos fue el que tenía las dos cánulas implantadas, por tanto los experimentos corresponden a la administración intracraneal de nitroprusiato en tres sitios del TPD. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig.4<sub>R</sub>, junto con los ya comentados de la administración conjunta de pirilamina i.p. e histamina i.c.

### Vigilia

Los ANOVAS realizados tras la administración de nitroprusiato en el TPD indicaron que no se presentaron diferencias significativas en ningún caso (ANOVA Horas 1-6:  $F_{1,24}=2.97$ ,  $p \leq 0.25$ ; ANOVA Horas 1-4:  $F_{1,16}= 0.44$ ,  $p \geq 0.25$ )(Fig.4<sub>R</sub>, Fig. 5<sub>R</sub>) lo cual, es indicativo de que el aumento de vigilia observado tras la administración de histamina en el TPD, no se debió a sus posibles efectos vasodilatadores.

### Somnolencia

Hubo una notable estabilidad en el tiempo de permanencia en somnolencia presentado tras la administración de nitroprusiato (Fig. 4<sub>R</sub>). Ninguno de los ANOVAS expreso que se dieran diferencias significativas (ANOVA Horas<sub>1-6</sub>: $F_{1,24}=0.15$ ,  $p \geq 0.25$ ; ANOVA Horas 1-4: $F_{1,16}= 0.03$ ,  $p \geq 0.25$ ) (Fig. 5<sub>R</sub>).

### Sueño Lento

El tiempo de permanencia en sueño lento en los experimentos administrando nitroprusiato en el TPD fue notablemente similar en las distintas horas de los registros al presentado en las correspondientes horas de los registros basales (Fig. 4<sub>R</sub>). Ni en las 4 primeras horas de los registros ni en el total de las 6 horas las variaciones examinadas con los correspondientes ANOVAS resultaron ser estadísticamente significativas (Horas 1-4: $F_{1,16}= 0.55$ ,  $p \geq 0.25$ ; Horas 1-6: $F_{1,24}= 0.98$ ,  $p \geq 0.25$ ) (Fig.5<sub>R</sub>)

### Sueño REM

A semejanza de los otros estados del ciclo el tiempo de permanencia en sueño Rem en los experimentos administrando nitroprusiato en el TPD fue notablemente similar al presentado en los registros basales (Fig. 4<sub>R</sub>). No se encontraron modificaciones significativas en ninguno de los ANOVAS aplicados a los datos (Horas 1-4:  $F_{1,16}=2.79$ ,  $p \leq 0.25$ ; Horas 1-6:  $F_{1,24}= 0.98$   $p \geq 0.25$  ; Horas 5-6 :  $F_{1,8}= 1.81$ ,  $p \geq 0.25$  ) (Fig.5<sub>R</sub>).

## 2. Cambios en la arquitectura del ciclo vigilia-sueño tras la administración de histamina en el TPD.

Dado que como acabamos de exponer los cambios más homogéneos, consistentes y significativos en las variaciones en el tiempo de permanencia de los estados del CVS en este grupo de animales ocurrieron en las 4 primeras horas de los registros tras la administración en el TPD de histamina, el análisis de los posibles cambios en la arquitectura del CVS (estudio del número y duración de episodios y de las transiciones entre los distintos estados del ciclo) producidos por la histamina al interactuar con el TPD se ha llevado a cabo con los datos obtenidos en aquel periodo, es decir, en las 4 primeras horas de los registros tras la administración de histamina en el TPD.

### 2.A Cambios en la duración y número de los episodios de los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el TPD

Los resultados obtenidos tras el análisis de la duración y número de episodios en el CVS tras la administración de histamina i.c en los animales del Grupo I se muestran en la siguiente tabla:

| TABLA 1 <sub>R</sub> . Media de duración ( $\pm$ error standar) en minutos y número (n) de los distintos episodios del CVS durante las cuatro primeras horas de registro en condiciones basales y después de la administración de histamina en la región dorsal del tegmento pontino. *( $p \leq 0.05$ ).# ( $p \leq 0.1$ ) |                           |                            |      |              |   |
|---|---------------------------|----------------------------|------|--------------|---|
|   | Basal                     | Histamina                  | t    | P            | Porcentaje de incremento/descenso (en el nº de episodios) |
| <b>VIGILIA</b>  | 3.5 ( $\pm 0.7$ )<br>n=46 | 5.1 ( $\pm 0.9$ )#<br>n=55 | 1.32 | =0.1         | ↑ 19.56 %   |
| <b>SOMNOLENCIA</b>  | 1.7 ( $\pm 0.1$ )<br>n=71 | 2.2 ( $\pm 0.2$ )*<br>n=75 | 2.04 | $\leq 0.025$ | ↓ 5.63%   |
| <b>SUEÑO LENTO</b>  | 7.8 ( $\pm 0.6$ )<br>n=90 | 8.9 ( $\pm 1.0$ )<br>n=70  | 1.00 | NS           | ↓ 22.22%  |
| <b>SUEÑO REM</b>  | 6.8 ( $\pm 0.6$ )<br>n=30 | 4.8 ( $\pm 0.7$ )*<br>n=24 | 2.15 | $\leq 0.025$ | ↓ 20%   |
| <b>Nº total episodios</b>   | n=237                     | n=224                      |      |              |   |

### Vigilia

De acuerdo a los valores de la Tabla 1<sub>R</sub>, de la 1ª a la 4ª hora de registro hubo un aumento de la media en la duración de los episodios de V con un valor cercano a la significación estadística ( $p \leq 0.1$ ), y se observa también un aumento discreto en el número de episodios de vigilia. Hay que mencionar, que al analizar las diferencia de duración de los episodios más largos en vigilia, se alcanzaron valores estadísticamente significativos [registros control=6.1( $\pm 1.6$ ), registros tras administración de histamina=10.6 ( $\pm 1.6$ ),  $t=2.2$ ,  $p \leq 0.025$ ]; de esta forma se puede afirmar, que la duración de los episodios de vigilia determinó en mayor medida que se produjera el aumento total en el tiempo de permanencia en este estado tras la administración de histamina en el TPD.

### Somnolencia

Aunque el análisis del tiempo total de permanencia en somnolencia durante las cuatro primeras horas de registro tras administrar histamina no alcanzó valores estadísticamente significativos ( $F_{1,32} = 2.767$ ,  $p < 0.25$ ) la media en la duración de los episodios de somnolencia, en este periodo de tiempo mostraron un aumento estadísticamente significativo (Tabla 1<sub>R</sub>). En cambio, el número de episodios fue muy similar en los registros controles y tras administrar histamina.

### Sueño lento

Aunque en las horas 1-4 de los registros tras administración de histamina hubo un discreto aumento en la duración media de los episodios de sueño lento, estos cambios no resultaron estadísticamente significativos (Tabla 1<sub>R</sub>). Como se indica también en esta misma tabla 1<sub>R</sub> en los experimentos administrando histamina en el TPD hubo un descenso en el número de episodios de este estado. El hecho de que la duración y número de los episodios de sueño lento no se potenciaran, podría explicar porque no se observan cambios significativos en el tiempo de permanencia en este estado de SL

### Sueño REM

La media en la duración de los episodios de REM en los registros control y con histamina en la región dorsal (horas 1-4), disminuyó notablemente alcanzando valores estadísticamente significativos (Tabla 1<sub>R</sub>,  $t=2.15$ ,  $p\leq 0.025$ ). Los cambios en el número de episodios no fueron significativos.

### 2.B Cambios en las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el TPD

El estudio de las transiciones que se produjeron desde un estado del CVS a otro durante las cuatro primeras horas de registro tras las microinyecciones de histamina se realizaron por dos vías: 1) teniendo en cuenta el número de transiciones de un estado a otro del CVS respecto del número de transiciones totales ocurridas durante las cuatro horas de registro (matriz general) y 2) por otro lado, teniendo en cuenta el porcentaje de transiciones que ocurrieron desde un estado dado al resto, considerando número total de transiciones que ocurrieron únicamente desde el estado considerado (matriz inicial).

Con respecto a cada estado del CVS, los resultados obtenidos tras el estudio de las transiciones en la región del TPD tras la aplicación de histamina en las cuatro primeras horas de registro, y que se muestran gráficamente en la Figura 6<sub>R</sub>, fueron los siguientes:

#### Vigilia

El análisis del número de transiciones totales contabilizadas desde el estado de vigilia con respecto al número de transiciones totales ocurridas desde todos los estados del CVS (Fig. 6<sub>R</sub>, matriz general) indicaron que, para el periodo comprendido entre la 1ª a la 4ª hora de registro, existe un aumento en el porcentaje de las transiciones desde vigilia a somnolencia que alcanzó valores cercanos a la significación estadística ( $t=0,96$ ,  $p<0.1$ ). Además se observa una disminución en el porcentaje de transiciones desde vigilia a sueño lento que también alcanzó valores cercanos a la significación estadística ( $t=1,62$ ,  $p<0.1$ ).



Para precisar si la vigilia repartió de manera distinta tras la aplicación de histamina a los distintos estados del CVS, el estudio de la matriz inicial reveló que existía un mayor reparto desde V a S que alcanzo valores estadísticamente significativo ( $t=1,98$ ,  $p<0.05$ ) y que fue acompañado por un descenso, también estadísticamente significativo, del reparto desde V a SL ( $t=1,98$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 6<sub>R</sub>, matriz inicial).

### Somnolencia

El análisis de las transiciones ocurridas desde el estado de somnolencia con respecto al número total de transiciones que se produjeron tras la aplicación de histamina en la región dorsal del TPD mostró que los cambios no alcanzaron valores estadísticamente significativos (Fig. 6<sub>R</sub>, matriz general).

Para precisar si la somnolencia repartió de manera distinta tras la aplicación de histamina a otros estados del CVS, el estudio de la matriz inicial reveló que al igual que lo visto en la matriz general, ni el aumento de las transiciones desde somnolencia a vigilia, ni la disminución desde somnolencia a sueño lento llegaron a ser estadísticamente significativos (Fig. 6<sub>R</sub>, matriz inicial).

### Sueño Lento

El análisis del número de transiciones totales contabilizadas desde el estado de sueño lento con respecto al número de transiciones totales ocurridas desde todos los estados del CVS (matriz general) indicaron que para el periodo comprendido entre la 1ª a la 4ª hora de registro tras la aplicación de histamina y como se observa en la Fig. 6<sub>R</sub>, matriz general, solo para el caso del descenso de las transiciones desde sueño lento a somnolencia, se obtuvo un valor cercano a la significación ( $t=1,48$ ,  $p<0.1$ ). En el resto de las transiciones, no hubo cambios significativos ni cercanos a alcanzar la significación estadística.

Para precisar si el sueño lento repartió de manera distinta tras la aplicación de histamina a otros estados del CVS, el estudio de la matriz inicial confirmó los resultados de la matriz general, revelando que, no existían apenas cambios en cuanto al reparto que el sueño lento hizo a otros estados del CVS (Fig. 6<sub>R</sub>, matriz

inicial). Por tanto, el descenso las proporciones de sueño REM observado en los experimentos al administrar histamina en el TPD, se debe más a los cambios reseñados de disminución en la duración de sus episodios que en el bloqueo de los pasos desde sueño lento a sueño REM.

### Sueño REM

El análisis del número de transiciones totales contabilizadas desde el estado de sueño REM con respecto al número de transiciones totales ocurridas desde todos los estados del CVS indicaron que para el periodo comprendido entre la 1ª a la 4ª hora de registro, tras la aplicación de histamina, hubo un descenso significativo en el computo total de las transiciones desde sueño REM a sueño lento ( $t=2,57$ ,  $p<0.05$ ). El resto de cambios en las transiciones de sueño REM no alcanzaron niveles de significación estadística (Fig. 6<sub>R</sub>, matriz general).

Para precisar si el sueño REM repartió de manera distinta tras la aplicación de histamina a otros estados del CVS, el estudio de la matriz inicial no confirmó que existiera un decremento significativo de los pasos desde sueño REM a sueño lento (Fig. 6<sub>R</sub>, matriz inicial)

**En resumen**, los resultados en este apartado sobre cambios en las transiciones de un estado a otro del CVS tras administrar histamina en el TPD indican que se mantuvieron bastante estables las relaciones de paso entre los distintos estados; de la misma forma que las variaciones en el número de sus episodios tampoco fueron muy sobresalientes. De esta manera, el conjunto de resultados sobre la arquitectura del CVS al administrar histamina en el TPD, nos indican que, los cambios ocurridos, favoreciendo el aumento total de vigilia y en la disminución de sueño REM, que se producen tras administrar histamina, son debidos fundamentalmente a los cambios en la duración de los episodios de estos estados y no tanto a cambios en su número y en las relaciones de transición de un estado a otro del ciclo.

## Grupo II. Inyecciones localizadas en la región ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO).

---

A este grupo pertenecen los resultados de las microinyecciones realizados en una cánula de los animales 1,5,6 y 9 y las dos cánulas bilaterales del animal 7. Como se puede comprobar en la Fig. 7<sub>R</sub> en todos los casos las inyecciones quedaron situadas en la región ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) en los planos del eje AP:-2 a -4.

### 1. Tiempo de permanencia en los distintos estados del ciclo vigilia sueño

#### 1. A. Experimentos con administración de histamina en el vRPO

La administración de histamina (20-30nL, 165mM) en el vRPO se realizó en los 4 animales con una sola cánula implantada y en las dos cánulas del animal 7, además en un animal se administro adicionalmente una dosis menor de histamina (20 nL, 55mM).

Evaluado el tiempo de permanencia en cada estado del CVS al realizar los distintos experimentos en comparación con los registros basales de estos animales los resultados fueron los siguientes:

#### Vigilia

El ANOVA correspondiente indicó que las variaciones en el tiempo de permanencia en vigilia tras la administración de histamina en el vRPO al considerar las 6 horas de los registros fueron estadísticamente significativas ( $F_{1,72}=5.708$ ,  $p\leq 0.025$ ). Con excepción de la sexta hora, en las restantes horas el tiempo de permanencia en vigilia superó siempre los valores de las horas correspondientes de los registros control. No obstante, donde ocurrieron los aumentos más sobresalientes fue en la segunda y en la tercera hora ( $p\leq 0.05$ , test de Fisher) (Fig. 8<sub>R</sub>).

### Somnolencia

Al considerar las 6 horas de los registros (ANOVA horas 1-6) las variaciones en el tiempo de permanencia en somnolencia tras la administración de histamina en el vRPO no dieron valores estadísticamente significativos ( $F_{1,72} = 2.496$ ,  $p \leq 0.25$ ). No obstante, si que se alcanzaron valores estadísticamente significativos al considerar el ANOVA de las horas 2 a 5 ( $F_{1,48} = 4.429$ ,  $p \leq 0.05$ ) en los cuales la somnolencia estuvo aumentada en relación con los correspondientes valores de los registros basales (Fig. 8<sub>R</sub>). Los aumentos más notables ocurrieron en las horas 3 y 5 ( $p \leq 0.05$ , test de Fisher)

### Sueño Lento

Al considerar las 6 horas de los registros, las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño lento tras la administración de histamina en el vRPO solo quedaron cerca de alcanzar valores estadísticamente significativos (ANOVA de las horas 1-6,  $F_{1,72} = 3.384$ ,  $p \leq 0.10$ ). Los cambios significativos ocurrieron cuando se consideró el ANOVA con los valores de las 4 primeras horas ( $F_{1,48} = 4.016$ ,  $p \leq 0.05$ ). Estos cambios consistieron en disminución del tiempo de permanencia tras la administración de histamina en el vRPO (Fig. 8<sub>R</sub>).

### Sueño REM

Las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño REM tras la administración de histamina en el vRPO (ANOVA horas 1-6 fueron estadísticamente significativos ( $F_{1,72} = 5.104$ ,  $p \leq 0.05$ ). Con excepción de la primera hora de los registros, estos cambios consistieron en disminución del tiempo de permanencia en sueño REM en las restantes horas de registro (de 2 a 6 horas, Fig. 8<sub>R</sub>). Las disminuciones más notables ocurrieron en las horas 4 y 5 ( $p \leq 0.05$ , test de Fisher). Es de destacar que la primera hora de los registros, el comportamiento respecto al sueño REM no fue homogéneo en todos los animales ya que, en dos de ellos que en condiciones basales presentaron sueño REM, no solo no disminuyó esta fase del sueño, sino que sus proporciones aumentaron respecto a sus valores en los registros control de estos animales.

### 1.B. Experimentos combinados pirilamina+ histamina en el vRPO

Los experimentos combinados administrando pirilamina (i.p., 3mgr/kg peso) e histamina en el vRPO (20-30nL, 165mM) fueron realizados en los animales 1, 5, 6 y 9 (provistos de una cánula). Los resultados gráficos de estos experimentos se muestran en la Fig. 9<sub>R</sub>

#### Vigilia

Los ANOVAs correspondientes indicaron que las variaciones en el tiempo de permanencia en vigilia tras la administración de pirilamina (i.p.) e histamina en el vRPO no fueron estadísticamente significativos al considerar las 6 horas de los registros ( $F_{1,36}= 1.084$ ,  $p\leq 0.25$ ) ni en cualquier otro periodo de tiempo considerado. Nótese en la Fig. 9<sub>R</sub> la gran similitud en la horas 1 y 2 de los valores del tiempo de permanencia en vigilia que ocurrieron en los registros basales y tras la administración combinada de pirilamina i.p e histamina en vRPO.

Estos resultados son indicativos por tanto de que la pirilamina produjo un bloqueo del aumento de vigilia producido por la administración de histamina en el vRPO durante estas 2 primeras horas de registro. En el periodo de tiempo de la horas 3 a 5 la media del tiempo de permanencia en vigilia en experimentos combinados fue considerablemente mayor que en los basales pero la dispersión de los resultados en los distintos animales fue grande de forma que estas variaciones no llegaron a alcanzar niveles de significación estadística ( $F_{1,18}=1.566$ ,  $p\leq 0.25$ ).

#### Somnolencia

Al considerar las 6 horas de los registros (ANOVA horas 1-6) las variaciones en el tiempo de permanencia en somnolencia en los experimentos combinados no dieron valores estadísticamente significativos ( $F_{1,36}= 1.882$ ,  $p \leq 0.25$ ) (Fig. 9<sub>R</sub>). Tampoco se alcanzaron modificaciones significativas entre las horas 2 a 5 ( $F_{1,32}=0.465$ ) en las que - como hemos indicado en el apartado anterior- la somnolencia estuvo aumentada al administrar solo histamina en el vRPO (véase Fig. 8<sub>R</sub>).

### Sueño Lento

Al considerar las 6 horas de los registros (ANOVA horas 1-6) las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño lento en los experimentos combinados no dieron valores estadísticamente significativos ( $F_{1,36}=0.474$ ,  $p \leq 0.25$ ). Tampoco se alcanzaron modificaciones significativas entre las horas 1-4 ( $F_{1,24}=0.004$ ,  $p \leq 0.25$ ) periodo en el cual como se ha indicado en el apartado anterior se alcanzaron valores significativos al descender el sueño lento tras la aplicación de histamina intracraneal. Tampoco en el periodo de 2 a 5 horas las variaciones de sueño lento en los experimentos combinados fueron estadísticamente significativas ( $F_{1,24}=0.024$ ,  $p \leq 0.25$ ). Además (aunque sin alcanzar valores significativos en ningún caso) se puede destacar que en muchas de las horas el sueño lento de los experimentos combinados resulto favorecido (Fig. 9<sub>R</sub>) en comparación con los registros basales a diferencia de lo ocurrido en los experimentos con histamina (véase Fig. 8<sub>R</sub>). Hubo pues un claro bloqueo de esta fase del sueño -especialmente en las dos primeras horas de los registros en los efectos producidos por la histamina en el vRPO al administrar previamente el antagonista pirilamina.

### Sueño REM

A diferencia de la estabilidad que ocurrió en las proporciones de los otros 3 estados del CVS, las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño REM tras la administración combinada de pirilamina (i.p.) e histamina en el vRPO (ANOVA horas 1-6) fueron estadísticamente significativas ( $F_{1,36}=5.454$ ,  $p \leq 0.025$ ). Estos cambios consistieron en disminución del tiempo de permanencia en sueño REM en todas las horas de registro. Las disminuciones más notables ocurrieron en las horas 4 y 5 ( $p \leq 0.05$ , test de Fisher) (Fig. 9<sub>R</sub>)

La pirilamina inyectada previamente por tanto no bloqueó la disminución de sueño REM que produjo la histamina al interactuar con el vRPO. Mas bien, el comportamiento del tiempo de permanencia en el sueño REM ocurrido en los experimentos combinados es muy similar al que se presentó en los experimentos en los que solo se administró histamina en el vRPO. Así pues, en conjunto, todos estos

resultados podrían ser indicativos de que las acciones de la histamina en el vRPO referidas al sueño REM (y a semejanza de lo ocurrido tras la administración en el TPD) podrían estar mediadas por receptores diferentes a las acciones producidas en los otros estados. No obstante, de nuevo hay que señalar reservas con esta consideración, teniendo en cuenta que -como hemos indicado anteriormente- la pirilamina administrada sistémicamente, por si misma produce una disminución en el tiempo de permanencia del sueño REM.

### 1. C. Experimentos con administración de nitroprusiato (vasodilatador) en el vRPO

Los experimentos de administración de nitroprusiato sódico en el vRPO (20-30nl, 165 mM) para determinar si se siguieron cambios en las proporciones de los distintos estados del ciclo por un efecto dilatador, fueron realizados en los 5 animales que pertenecen a este grupo, aunque en el animal 7 la administración de nitroprusiato se realizó únicamente por 1 de sus cánulas. Los resultados expuestos de una forma grafica de estos experimentos se muestran en la Figura 9<sub>R</sub>.

#### Vigilia

EL ANOVA correspondiente a las 6 horas de registro indicó que las variaciones en el tiempo de permanencia en vigilia tras la administración de nitroprusiato en el vRPO no fueron estadísticamente significativas ( $F_{1,48} = 2.609$ ,  $p \leq 0.25$ ). Aunque como se puede observar en la Figura 9<sub>R</sub> entre las horas 2 y 5 el tiempo medio de permanencia en vigilia fue mayor con nitroprusiato que en los basales estos cambios solo resultaron tener un nivel de significación bajo ( $F_{1,48} = 2.609$ ,  $p \leq 0.10$ ). Por tanto, los resultados en estos experimentos no alcanzaron los niveles de significación estadística plena tal como ocurrió con la administración de histamina en el vRPO.

#### Somnolencia

Al considerar las 6 horas de los registros (ANOVA horas 1-6) las variaciones en el tiempo de permanencia en somnolencia tras la administración de nitroprusiato en el vRPO no dieron valores estadísticamente significativos ( $F_{1,48} = 1.160$   $p \geq 0.25$ ) (Fig. 9<sub>R</sub>).

Tampoco se alcanzaron modificaciones significativas entre las horas 2 a 5 ( $F_{1,32}=0.465$ ) para las cuales como indicamos anteriormente, la somnolencia estuvo aumentada significativamente al administrar solo histamina en el vRPO (véase Fig. 8<sub>R</sub>).

#### Sueño Lento

Las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño lento tras la administración de nitroprusiato en el vRPO (ANOVA horas 1-6) no resultaron estadísticamente significativas ( $F_{1,48} = 0.621$ ,  $p \geq 0.25$ ) (Fig. 9<sub>R</sub>). Tampoco fueron significativas al considerar las 4 primeras horas ( $F_{1,32} = 0.615$ ;  $p \geq 0.25$ ) periodo en el cual se detectaron cambios significativos (disminución sueño lento) tras la administración de histamina en el vRPO. Lo mismo ocurrió al considerar los valores de las horas 2 a 5 ( $F_{1,32} = 2.723$ ;  $p \leq 0.25$ )

#### Sueño REM

Las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño REM tras la administración de nitroprusiato en el vRPO (ANOVA horas 1-6) no fueron estadísticamente significativos ( $F_{1,48} = 0.443$ ;  $p \leq 0.25$ ) (Fig. 9<sub>R</sub>). Tampoco fueron significativos al considerar las 4 primeras horas ( $F_{1,32} = 0.024$ ;  $p \geq 0.25$ ) periodo en el cual se detectaron cambios significativos (disminución de sueño lento) tras la administración de histamina en el vRPO; ni al considerar los valores de las horas 2 a 5 ( $F_{1,32} = 0.238$   $p \geq 0.25$ ) (véase Fig. 8<sub>R</sub>).

**En resumen**, con la posible excepción de un ligero efecto favorecedor de la vigilia, no se siguieron cambios en las proporciones del resto de los estados del CVS que puedan deberse a efectos vasculares dilatadores en el vRPO.



## 2. Cambios en la arquitectura del ciclo vigilia sueño tras la administración de histamina en el vRPO

Cuando se consideraron las variaciones en el tiempo de permanencia de cada uno de los estados del CVS correspondientes a las 6 horas de registro, solo los ANOVAs para la vigilia y el sueño REM dieron valores estadísticamente significativos para este periodo de tiempo tras la administración de histamina. Sin embargo, si que hubo variaciones significativas para los otros dos estados cuando se consideraron periodos más cortos. Por otra parte, como hemos indicado antes, en la primera hora a diferencia de las demás, paradójicamente en dos animales que en condiciones basales presentaron sueño REM, no solo no disminuyó este sino que sus proporciones aumentaron respecto a sus valores en los registros control de estos animales.

Todos estos hechos nos decidieron a hacer el análisis de los posibles cambios en la arquitectura del CVS (estudio del número y duración de episodios y de las transiciones entre los distintos estados del ciclo) tras la administración de histamina en el vRPO desglosando la primera hora de los registros y considerando separadamente el periodo comprendido entre las horas 2 a 5 donde se dieron los resultados homogéneos, significativos y más consistentes en las variaciones en el tiempo de permanencia de cada uno de los estados de ciclo.

### 2.A Cambios en la duración y número de los episodios de los distintos estados del CVS tras la aplicación de histamina en el vRPO

Los resultados obtenidos tras el análisis de la duración y número de episodios en el CVS tras la administración de histamina i.c en los animales del Grupo II para la primera hora de registro se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 2<sub>R</sub>. Media de duración ( $\pm$  error standar) en minutos y número (n) de los distintos episodios del CVS en la 1ª hora de registro en condiciones basales y después de la administración de histamina en la región ventral del tegmento pontino.**

|                           | Basal                    | Histamina                | t    | P  | Porcentaje de incremento/descenso (en el nº de episodios) |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------|----|---|
| <b>VIGILIA</b>            | 7.1 ( $\pm$ 1.4)<br>n=26 | 9.9 ( $\pm$ 2.3)<br>n=23 | 1.04 | NS | ↓ 11.54 %   |
| <b>SOMNOLENCIA</b>        | 2.1 ( $\pm$ 0.3)<br>n=34 | 2.6 ( $\pm$ 0.4)<br>n=24 | 0.92 | NS | ↓ 29.41%  |
| <b>SUEÑO LENTO</b>        | 8.7 ( $\pm$ 2.1)<br>n=19 | 11.2( $\pm$ 2.7)<br>n=10 | 0.71 | NS | ↓ 47.37%  |
| <b>SUEÑO REM</b>          | 3.7 ( $\pm$ 1.7)<br>n=5  | 6.2 ( $\pm$ 2.3)<br>n=6  | 0.81 | NS | ↑ 20%   |
| <b>Nº total episodios</b> | n=84                     | n=62                     |      |    |   |

Por otro lado, los resultados obtenidos tras el análisis de la duración y número de episodios en el CVS tras la administración de histamina i.c en los animales del Grupo II entre la segunda y la quinta hora de registro tras la administración se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 3<sub>R</sub>. Media de duración ( $\pm$  error standar) en minutos y número (n) de los distintos episodios del CVS de la 2ª a la 5ª hora agrupadas de registro en condiciones basales y después de la administración de histamina en la región ventral del tegmento pontino. \*( $p \leq 0.05$ )**

|                           | Basal                     | Histamina                  | t    | P           | Porcentaje de incremento/descenso (en el nº de episodios) |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------|-------------|---|
| <b>VIGILIA</b>            | 3.7 ( $\pm$ 0.6)<br>n=78  | 4.8 ( $\pm$ 0.7)<br>n=109  | 1.20 | NS          | ↑ 39,7% *   |
| <b>SOMNOLENCIA</b>        | 2.0 ( $\pm$ 0.1)<br>n=125 | 2.0 ( $\pm$ 0.1)<br>n=172  | 0.08 | NS          | ↑ 37,6% *   |
| <b>SUEÑO LENTO</b>        | 7.9 ( $\pm$ 0.7)<br>n=100 | 5.6 ( $\pm$ 0.5)*<br>n=116 | 2.89 | $\leq 0.05$ | ↑ 16,0%   |
| <b>SUEÑO REM</b>          | 7.3 ( $\pm$ 0.6)<br>n=43  | 7.9 ( $\pm$ 1.2)<br>n=20   | 0.49 | NS          | ↓ 54,5% *   |
| <b>Nº total episodios</b> | n= 346                    | n=417                      |      |             |   |

### Vigilia

De acuerdo a los valores de la Tabla 2<sub>R</sub>, durante la 1ª hora aunque la media de los episodios de vigilia resultó aumentada tras la administración en el vRPO de histamina los cambios significativos no alcanzaron la significación estadística. En esta primera

hora de registro hubo, por otra parte, un descenso discreto del número de episodios de vigilia.

De acuerdo a los valores de la Tabla 3<sub>R</sub>, de la 2ª a la 5ª hora de los registros también hubo un aumento discreto de la media en la duración de los episodios de V, pero las comparaciones estadísticas en este periodo demostraron que como en el caso de la primera hora este aumento no alcanzó valores estadísticamente significativos. Sin embargo, en el número de episodios de vigilia -a diferencia de lo ocurrido en la primera hora- entre las horas 2 a 5 hubo un aumento considerable de los mismos (Tabla 3<sub>R</sub>). Este aumento fue estadísticamente significativo al comparar las diferencias en cada hora de aquel periodo entre los registros basales y tras la administración de histamina en el vRPO ( $t = 2.217, p \leq 0.025$ ). El aumento por tanto en el tiempo de permanencia en vigilia (véase Fig. 8<sub>R</sub>) que ocurrió tras la administración de histamina en el vRPO vino dada fundamentalmente por aumento en el número de sus episodios.

### Somnolencia

Durante la primera hora de registro y como se observa en la Tabla 2<sub>R</sub> apenas hubo cambios en la media de duración media de los episodios de somnolencia, y se observó un descenso en el número de sus periodos.

De forma análoga, la media en la duración de los episodios de somnolencia, en las horas 2-5 de los registros fue completamente similar en los registros basales y tras histamina (Tabla 3<sub>R</sub>). Sin embargo, durante este periodo de tiempo a diferencia de lo ocurrido en la primera hora, se produjo un aumento en el número de los periodos de somnolencia (Tabla 3<sub>R</sub>), que fue significativo cuando se consideraron las diferencias en el número de episodios por hora presentados en los registros basales y tras la administración de histamina en el vRPO ( $t$  pareada = 3.505  $p \leq 0.005$ ). Así pues, el aumento en el tiempo total de permanencia en somnolencia que ocurrió en este periodo de tiempo tras la administración de histamina (véase Fig. 8<sub>R</sub>) vino dada por un aumento en el número de sus episodios.

### Sueño Lento

Durante la primera hora de registro tras la aplicación de histamina la duración media de los episodios de sueño lento aumentó y disminuyó su número, aunque estos cambios no alcanzaron la significación estadística (Tabla 3<sub>R</sub>).

En cambio, entre las horas 2-5 de los registros tras histamina la media en la duración de los episodios de SL, disminuyó significativamente (Tabla 3<sub>R</sub>). Esta disminución en la duración de los episodios de SL estuvo acompañada por un discreto aumento en el número de los mismos, lo que explica la poca significación estadística ( $p \leq 0.1$ ) alcanzada en la disminución en el tiempo de permanencia en sueño lento de este periodo de tiempo (2-5 horas).

### Sueño REM

Considerando el conjunto de todos los animales, el sueño REM durante la primera hora de registro como se observa en la Tabla 2<sub>R</sub> presentó un aumento en la duración media de sus episodios tras la aplicación de histamina aunque este cambio no alcanzó niveles de significación estadística. El número de periodos fue, asimismo, discretamente mayor en los registros tras histamina. Estos datos explican el aumento observado en el tiempo de permanencia en sueño REM durante la primera hora de los registros tras administrar histamina en el vRPO al que hicimos mención anteriormente

En el periodo comprendido entre las horas 2 a 5, según se puede observar en la Tabla 3<sub>R</sub> la media en la duración de los episodios de REM en los registros control y con histamina en el vRPO, fue similar, pero a diferencia de lo observado en la primera hora, entre las horas 2 a 5 el número de episodios de sueño REM tras histamina disminuyó notablemente alcanzando valores estadísticamente significativos ( $t$  pareada = 3.673,  $p \leq 0.005$ ). La disminución en el tiempo total de permanencia en REM entre las 2 y 5 horas de administrar histamina en el vRPO (véase Fig. 8<sub>R</sub>) fue debida, por tanto, al menor número de los periodos de este estado.

**En resumen**, del conjunto de todos estos resultados se puede destacar que en la primera hora de los registros tras administrar histamina en el vRPO hubo una tendencia a que ocurrieran cambios en la duración y número de los episodios de cada estado del CVS en sentido contrario a aquellos observados en las horas restantes (2 a 5). Entre las horas 2 y 5 hubo una notable estabilidad en la duración de los episodios de vigilia, somnolencia y sueño REM, pero ocurrieron cambios significativos en su número de forma que tanto los estados de vigilia y somnolencia se vieron favorecidos por aumento en el número de sus episodios, mientras que el sueño REM disminuyó por su menor número de episodios. En el sueño lento se presentó una disminución significativa de la duración media de sus periodos que estuvo acompañado de un discreto aumento en el número de los mismos, lo que explica que solo se consiguieran valores cerca de la significación estadística ( $p \leq 0.1$ ) en la reducción general del tiempo de permanencia en esta fase del sueño al administrar histamina en el vRPO.

## **2. B. Cambios en las transiciones entre los distintos estados tras la aplicación de histamina en el vRPO.**

El análisis de las transiciones de un estado a otro del CVS tras la aplicación de histamina en la región ventral del tegmento pontino se realizó por el mismo procedimiento que el llevado a cabo en la región del TPD mediante el estudio de la matriz general (Fig.10<sub>R</sub> y 11<sub>R</sub>, matriz general) y de la matriz inicial (Fig.10<sub>R</sub> y 11<sub>R</sub>, matriz inicial). Sin embargo, en este grupo ventral los datos a analizar se dividieron en dos grupos (al igual que en el estudio del número y duración de episodios de los cuatro estados del CVS). Se estudiaron por un lado las transiciones de la primera hora de registro y por otro las transiciones totales desde la segunda a la quinta hora de registro.

El análisis estadístico del número total de transiciones ocurridas tras la aplicación de histamina en esta región del TP comparadas con los registros basales indicó que para

la primera hora de registro se registró un descenso en el número de transiciones tras la aplicación de histamina con un nivel de significación estadística bajo (basal= 78, histamina= 58,  $t=1,25$  ,  $p>0.1$  ) y que coincide con la disminución en el número total de periodos para todos los estados del CVS que se puede observar en la Tabla 2<sub>R</sub>. Por el contrario, para el periodo comprendido entre las horas 2 a 5 hubo un aumento significativo en el número total de transiciones (basal=336, histamina= 412,  $t=2.22$ ;  $p\leq 0.05$ ). Estos resultados coinciden por tanto con el mayor número de periodos total (contabilizando los aumentos y descensos en todos los estados) observados en la Tabla 3<sub>R</sub>.

Con respecto a cada estado del CVS, los resultados obtenidos tras el estudio de las transiciones fueron los siguientes:

#### Vigilia

El análisis del número de transiciones totales contabilizadas desde el estado de vigilia con respecto al número de transiciones totales ocurridas desde todos los estados del CVS (matriz general) indicaron que para la primera hora de registro tras la administración de histamina no existieron diferencias significativas en las transiciones realizadas desde el estado de vigilia. El análisis de la matriz inicial tampoco reveló cambios significativos aunque se apreció un ligero aumento en el reparto desde la vigilia al sueño lento (Fig.10<sub>R</sub>, matriz general y matriz inicial).

Para el periodo comprendido entre horas 2 a 5 de registro y como se observa en la Fig.11<sub>R</sub>, matriz general- no se alcanzaron valores estadísticamente significativos en los cambios de vigilia a los otros estados del CVS. El estudio de la matriz inicial para este mismo periodo confirmó que no existieron cambios significativos en el reparto desde la vigilia a otros estados del CVS (Fig. 11<sub>R</sub>, matriz inicial).

#### Somnolencia

Para la primera hora de registro tras la administración de histamina se encontró un descenso significativo en las transiciones realizadas desde el estado de somnolencia

al estado de sueño lento ( $t=1.89$ ,  $p\leq 0.05$ ) (Fig.10<sub>R</sub>, matriz general) lo cual explicaría la disminución en el número de periodos de esta fase del sueño (véase Tabla 2<sub>R</sub>). A pesar de que al considerar el cómputo general de todos los cambios las transiciones de somnolencia a sueño lento disminuyeran significativamente, el análisis de la matriz inicial no reveló que existieran cambios significativos en el reparto desde la somnolencia a otros estados del CVS (Fig.10<sub>R</sub>, matriz inicial).

Para el periodo comprendido entre las horas 2 y 5 de registro y como se observa en la figura 11<sub>R</sub>, -matriz general- no hubo cambios significativos de las transiciones ocurridas desde el estado de somnolencia tanto a vigilia como a sueño lento en relación con el número de todas las transiciones habidas. El estudio de la matriz inicial para este mismo periodo indicó asimismo que no hubo cambios significativos en el reparto desde somnolencia hacia vigilia y hacia sueño lento (Fig.11<sub>R</sub>, matriz inicial).

### Sueño lento

Para la primera hora de registro tras la administración de histamina se encontró un descenso significativo en las transiciones realizadas desde el estado de sueño lento al estado de somnolencia ( $t=2.15$ ,  $p\leq 0.05$ ) en relación con todas las transiciones ocurridas (Fig.10<sub>R</sub>, matriz general). Al analizar la matriz inicial encontramos que muy cerca del nivel de significación el sueño lento repartió preferentemente hacia sueño REM ( $t=1.7$ ,  $p<0.1$ ) en lugar de a somnolencia ( $t=1.68$ ,  $p=0.1$ ) (Fig.10<sub>R</sub>, matriz inicial) aunque en la matriz general no se alcanzaron valores estadísticamente significativos para el aumento de las transiciones desde sueño lento a sueño REM.

En el periodo comprendido entre las horas 2 a 5 el panorama fue distinto. En la matriz general se encontró un descenso significativo de las transiciones ocurridas desde el estado de sueño lento al estado de sueño REM ( $t=3.1$ ;  $p\leq 0.05$ ) (Fig.11<sub>R</sub>, matriz general). Por otro lado, se observó un aumento tanto en número como en proporción de las transiciones desde sueño lento a somnolencia que en este caso estuvieron cerca de la significación estadística ( $t=1.42$ ,  $p\leq 0.1$ ). En relación con el número de transiciones totales, no se encontraron cambios en las transiciones desde sueño lento a vigilia.

El estudio de la matriz inicial para este mismo periodo (2 a 5 horas) indicó una disminución estadísticamente significativa del reparto desde sueño lento al sueño REM ( $t=2.15$ ,  $p\leq 0.05$ ) confirmando por tanto que hubo un bloqueo de los pasos de sueño lento a sueño REM. Este bloqueo estuvo asociado a un aumento del reparto desde sueño lento a somnolencia que estuvo de nuevo cerca de la significación ( $t=1.31$ ;  $p=0.1$ ), (Fig.11<sub>R</sub>, matriz inicial ).

### Sueño Rem

Para la primera hora de registro tras la administración de histamina no se encontraron diferencias significativas en las transiciones realizadas desde el estado de sueño REM a otros estados del CVS, en relación con el número total de transiciones aunque, la proporción de transiciones desde sueño REM a somnolencia aumentó cerca de la significación estadística ( $t=1.49$ ,  $p\leq 0.1$ ) (Fig.10<sub>R</sub>, matriz general). Sin embargo, El análisis de la matriz inicial no reveló cambios significativos en el reparto desde sueño REM a otros estados del CVS (Fig.10<sub>R</sub>, matriz inicial).

El análisis de los datos de la matriz general indicó que en el periodo comprendido entre las horas 2 a 5 de los registros hubo un descenso en todas las transiciones ocurridas desde el estado de sueño REM si bien no alcanzaron valores estadísticamente significativos (Fig.11<sub>R</sub>, matriz general). Estos datos van en consonancia con el descenso en el número de periodos observados en el sueño Rem tras la aplicación de histamina (*véase Tabla 3<sub>R</sub>*) consecuencia del bloqueo específico del paso desde sueño lento descrito en el apartado anterior.

El estudio de la matriz inicial para este mismo periodo reveló que en el reparto desde el sueño Rem hacia el SL se dio un descenso significativo ( $t=1.97$ ,  $p\leq 0.05$ ) desviándolo principalmente a vigilia y en menor medida a somnolencia (Fig.11<sub>R</sub>, matriz inicial ). Por tanto, aunque fuera posible que se llegara al estado de sueño REM en el periodo de 2 a 5 horas tras administrar histamina en el vRPO, estando en este estado no se favoreció que los animales permanecieran en el circuito de sueño.



**En resumen**, los resultados en este apartado sobre cambios en las transiciones de un estado a otro del CVS tras administrar histamina en el vRPO indican que -al igual que en los otros parámetros del CVS analizados- el patrón de transiciones en la primera hora tras administrar histamina en el vRPO difiere de aquel observado en las horas subsiguientes (2-5 horas); no obstante, no se alcanzaron cambios significativos en relación con los registros basales. En el segundo periodo, esto es en las horas 2 a 5, donde los resultados para los cambios en el tiempo de permanencia, en la duración y frecuencia de los episodios de los distintos estados del CVS fueron homogéneos y estadísticamente significativos en comparación con los registros control y por lo tanto más concluyentes con el estudio de las transiciones cabe resaltar lo siguiente: que se mantuvieron bastante estables las distintas relaciones de paso entre y desde la vigilia y la somnolencia aunque el número de episodios de ambos estados aumentó significativamente tras la administración de histamina. Hubo sin embargo modificaciones en el patrón de las transiciones relativas a los estados de sueño. Así fue claro un bloqueo de los pasos de sueño lento a sueño REM que alcanzó valores estadísticamente significativos; este bloqueo de las transiciones a sueño REM se asoció a un aumento del reparto desde sueño lento a somnolencia que estuvo cerca de alcanzar la significación estadística. Este hecho junto a la tendencia de que se produjeran más pasos de somnolencia a vigilia y de vigilia a somnolencia determinan que de forma indirecta los cambios en el patrón de distribución desde el estado de sueño lento pudiera favorecer el desarrollo de los estados de vigilia y somnolencia. Además, en el periodo de 2 a 5 horas tras administrar histamina en el vRPO, estando en sueño REM, desde este estado no se favoreció los pasos a sueño lento, es decir, que los animales permanecieran en el circuito de sueño lo cual indirectamente también este es un factor favorecedor para un mayor desarrollo de la vigilia y somnolencia.

## Grupo III. Inyecciones localizadas en el núcleo reticular caudal del puente (RPC).

---

A este grupo pertenecen los resultados de las microinyecciones realizados por las cánulas izquierdas de los animales 1 y 3, la cánula derecha del animal 2 y las dos únicas cánulas de los animales 8 y 11. Como se puede comprobar en la Figura 13<sub>R</sub> en todos casos las microinyecciones quedaron situadas en el tegmento pontino a nivel de la parte rostral del núcleo reticular caudal del puente (RPC) en todos ellos la cánula quedó situada en la parte ventral de este núcleo excepto en el animal 2 cuya cánula quedó situada más dorsalmente.

### 1. Tiempo de permanencia en los distintos estados del ciclo vigilia sueño.

#### 1. A. Experimentos con administración de histamina en el RPC

La administración de histamina (20-30nL, 165mM) en el RPC se realizó en los 5 animales pertenecientes a este grupo, además en los animales 8 y 10 se les administró adicionalmente una dosis menor de histamina (20-30nL, 55mM).

Siguiendo el mismo orden de exposición que hemos llevado a cabo en los otros dos grupos los resultados para cada uno de los estados del CVS fueron los siguientes:

#### Vigilia

Los ANOVAS aplicados en el caso de las microinyecciones con histamina determinaron que no existieron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en el estado de vigilia al considerar las seis horas de registro tras las microinyección ( $F_{1,72}=2.03$   $p \leq 0.25$ ). Tampoco se obtuvieron variaciones significativa al considerar otros periodos en los que hubo variaciones significativas en los otros 2 grupos tales como horas 1-4 ( $F_{1,48}=0,064$   $p \leq 0.25$ ), o bien, en el periodo comprendido entre las horas 3 y 6 ( $F_{1,48}=0,011$   $p \leq 0.25$ ). De hecho, y como se puede observar en la

Figura 13<sub>R</sub> la vigilia solo estuvo aumentada durante la segunda y la tercera hora de registro mientras que para el resto de las horas el tiempo de permanencia en vigilia tras administrar histamina en el RPC fue bastante similar a los valores presentados en los registros control. No obstante, las diferencias en la segunda y tercera hora tampoco llegaron a alcanzar el nivel de significación estadística ( $F_{1,20}=3.888$ ;  $p\leq 0.10$ ).

### Somnolencia

Cuando se consideró el total de las 6 horas de registro los cambios en la somnolencia *no* alcanzaron valores estadísticamente significativos ( $F_{1,72}= 0.201$   $p>0.25$ ). Como se puede comprobar en la Figura 13<sub>R</sub> el tiempo de permanencia en este estado fue muy similar durante todas las horas de registro tras la administración de histamina en la región caudal y sus correspondientes registros basales. De esta forma, tampoco se presentaron variaciones significativas en los periodos de 1 a 4 horas ( $F_{1,48}= 0.064$   $p\geq 0.25$ ) o de 3 a 6 horas ( $F_{1,48}= 0.011$   $p\geq 0.25$ ).

### Sueño Lento

Los cambios en el tiempo de permanencia en sueño lento para el conjunto de las seis horas se registro no alcanzaron valores estadísticamente significativos ( $F_{1,72}= 0.18$   $p>0.25$ ) y como se puede observar en la Figura 13<sub>R</sub> con excepción de la segunda y la tercera hora de registro en las que se dio una disminución en el tiempo de permanencia en sueño lento (y que coincide con el aumento observado en vigilia para este mismo periodo) para el resto de horas de registro hubo bastante estabilidad en este parámetro. Las variaciones en la segunda y la tercera hora no llegaron a alcanzar los niveles de significación estadística ( $F_{1,24}=1.737$ ;  $p\leq 0.25$ ) ni tampoco en los periodos de 1-4 horas ( $F_{1,48}=0.672$ ;  $p\geq 0.25$ ) o de 3 a 6 horas ( $F_{1,48}=0.011$ ;  $p\geq 0.25$ ).

### Sueño REM

Como hemos indicado mas arriba, los cambios en el tiempo de permanencia en sueño REM fueron significativos en el conjunto de las 6 horas de los registros ( $F_{1,72}=$

4.551  $p \leq 0.05$ ). Tal como se indica en Figura 13<sub>R</sub> estos cambios consistieron en disminución de este estado que fue especialmente manifiesto al realizar las comparaciones por pares mediante el test de Fisher en la tercera y la sexta hora ( $p \leq 0.05$ ). Al considerar las variaciones de las 4 primeras horas los cambios no fueron significativos ( $F_{1,48} = 2.140$ ,  $p \leq 0.25$ ); en cambio, la significación estadística se alcanzó en el periodo comprendido entre las horas 3 y 6 ( $F_{1,48} = 4.444$ ,  $p \leq 0.05$ ).

En resumen, evaluado el tiempo de permanencia en cada estado del CVS al realizar los distintos experimentos en comparación con los registros basales en este grupo de animales con microinyecciones de histamina en el RPC, es de destacar que a diferencia de los resultados obtenidos en los dos grupos anteriores únicamente el estado de sueño REM presentó variaciones significativas y estas variaciones se caracterizaron por ocurrir tardíamente durante las horas 3 a 6.

### 1. B. Experimentos combinados pirilamina+ histamina en el RPC

Los experimentos combinados administrando pirilamina (i.p., 3mg/kg peso) e histamina (20-30nL, 165mM) en el RPC fueron realizados en los 5 animales de este grupo.

Evaluado el tiempo de permanencia en cada estado del CVS al realizar los distintos experimentos en comparación con los registros basales de estos animales cuyas inyecciones se realizaron en la región caudal del tegmento pontino los resultados que pueden verse en la Figura 14<sub>R</sub> fueron los siguientes:

#### Vigilia

En los experimentos combinados administrando pirilamina i.p., e histamina en el RPC, los ANOVAs examinando las variaciones en el tiempo de permanencia en vigilia para los distintos periodos de registro considerados, no dieron lugar a resultados estadísticamente significativos (1-6 horas:  $F_{1,48} = 0.004$   $p > 0.25$ ; 1-4 horas:  $F_{1,32} = 0.228$   $p > 0.25$  y 3-6 horas:  $F_{1,32} = 0.022$   $p > 0.25$ ) (Fig. 14<sub>R</sub>).

### Somnolencia

Las variaciones examinadas con los correspondientes ANOVAS alcanzaron valores cercanos a la significación estadística al considerar las 6 horas totales de registro ( $F_{1,48}=3.871$   $p\leq 0.1$ ) o las cuatro primeras horas ( $F_{1,32}=2.852$   $p\leq 0.1$ ); en cambio, no resultaron ser estadísticamente significativas cuando el ANOVA se aplicó a las horas 3 a 6 ( $F_{1,32}= 1.018$   $p\geq 0.25$ ) (Fig. 14<sub>R</sub>).

### Sueño Lento

Las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño lento en los experimentos combinados de pirilamina i.p. e histamina en el RPC para el total de las 6 horas ni para los periodos de 1-4 horas y de 3-6 horas examinadas con los correspondientes ANOVAS no resultaron ser estadísticamente significativas (1-6 horas:  $F_{1,48}= 2.625$   $p\leq 0.25$ , 1-4 horas:  $F_{1,32}= 2.507$   $p\leq 0.25$ ; 3-6 horas:  $F_{1,32}= 1.874$   $p\leq 0.25$ ) (Fig. 14<sub>R</sub>)

### Sueño REM

Las variaciones en el tiempo de permanencia en sueño REM tras la administración combinada de pirilamida (i.p.) e histamina en el RPC fueron estadísticamente significativas para las 6 horas de los registros ( $F_{1,72}= 6.09$   $p\leq 0.025$ ). Sin embargo, no se alcanzaron valores de significación estadística en las 4 primeras horas (Horas 1-4:  $F_{1,32}= 1.435$   $p\geq 0.25$ ) sino que ocurrieron fundamentalmente en las cuatro últimas horas de los registros (Horas 3-6:  $F_{1,32}= 4.076$   $p\leq 0.05$ ). Los cambios consistieron en disminución del tiempo de permanencia en sueño REM cuyos valores estuvieron por debajo de los registro control en todas las horas de registro tal y como puede observarse en la Figura 14<sub>R</sub>.

Por tanto, tal como hemos indicado en los experimentos análogos realizados en los otros grupos de animales, también se nos vuelven a manifestar aquí efectos supresorios de sueño REM que pueden ser producidos tanto por la administración de histamina en el RPC como por la administración sistémica de pirilamida.

### 1. C. Experimentos con administración de nitroprusiato (vasodilatador) en el RPC

Los experimentos de administración de nitroprusiato sódico en el RPC (20-30nl, 165mM) para determinar si se siguieron cambios en las proporciones de los distintos estados del ciclo por un efecto dilatador inespecífico, se llevaron a cabo en 4 animales.

Evaluado el tiempo de permanencia en cada estado del CVS al realizar los distintos experimentos en comparación con los registros basales de estos animales los resultados mostrados en la Figura 14<sub>R</sub> fueron los siguientes:

#### Vigilia

Los ANOVAS realizados tras la administración de nitroprusiato en el RPC indicaron que no se presentaron diferencias significativas en las seis horas de registro, ni en los otros periodos de tiempo considerados (Fig. 14<sub>R</sub>) (1-6 horas:  $F_{1,36} = 0.52$   $p > 0.25$ ; 1-4 horas:  $F_{1,24} = 0.105$   $p > 0.25$ ; 3-6 horas:  $F_{1,24} = 1.722$   $p > 0.25$ ).

#### Somnolencia

Al igual que en vigilia, los ANOVAS correspondientes, indicaron que las variaciones en el tiempo de permanencia en somnolencia administrando nitroprusiato en el RPC no experimentaron cambios estadísticamente significativos (Fig. 14<sub>R</sub>) (1-6 horas:  $F_{1,36} = 0.52$   $p \geq 0.25$ ; 1-4 horas:  $F_{1,24} = 0.047$ ,  $p > 0.25$ ; 3-6 horas:  $F_{1,24} = 0.389$ ,  $p > 0.25$ ).

#### Sueño Lento

Al analizar el tiempo de permanencia en sueño lento en los experimentos administrando nitroprusiato en el RPC y como puede observarse en la Figura 14<sub>R</sub> para las 6 horas de los registros los correspondientes ANOVAS indicaron que no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $F_{1,36} = 2.73$   $p \leq 0.25$ ). Tampoco hubo variaciones significativas entre las horas 1 a 4 ( $F_{1,24} = 0.685$   $p \geq 0.25$ ); en cambio, el ANOVA aplicado en las horas 3-6 dio resultados estadísticamente significativos ( $F_{1,24} = 4.883$   $p \geq 0.05$ ) que consistieron en un aumento en el tiempo de permanencia en esta fase del sueño al administrar nitroprusiato en el RPC

### Sueño REM

A semejanza de los resultados obtenidos en vigilia y somnolencia el tiempo de permanencia en sueño REM en los experimentos administrando nitroprusiato en el RPC no se encontraron variaciones estadísticamente significativas en los ANOVAS aplicados a los datos de las 6 horas completas de los experimentos ( $F_{1,36}= 2.754$   $p \leq 0.25$ ). Tampoco las variaciones fueron significativas en las horas 1a 4 ( $F_{1,24}= 0.923$   $p \geq 0.25$ ) ni el periodo comprendido entre las horas 3 a 6 ( $F_{1,24}= 1.849$   $p \leq 0.25$ ) (Figura 14<sub>R</sub>).

**En resumen**, evaluado el tiempo de permanencia en cada estado del CVS al realizar los distintos experimentos en el grupo de los animales con microinyecciones en el RPC es de destacar:

1. Que a diferencia de los resultados obtenidos en los dos grupos anteriores con administración de histamina en el TPD o en el vRPO, en el caso de la administración de histamina en el RPC, solo el estado de sueño REM presentó variaciones significativas; pero, estas variaciones se caracterizaron por ocurrir tardíamente durante las horas 3 a 6 de los experimentos.
2. En los experimentos combinados administrando pirilamina por vía sistémica e histamina en el RPC, no hubo modificaciones significativas relativas al tiempo de permanencia en vigilia, somnolencia y sueño lento. En cambio -al igual que ocurrió en este mismo tipo de experimentos de los grupos TPD y vRPO- el sueño REM disminuyó significativamente, como ocurrió también en los experimentos en los que solo hubo administración sistémica de pirilamina.
3. Excepto en sueño lento, no se produjeron cambios significativos con las microinyecciones en el RPC de nitroprusiato. Los cambios en sueño lento ocurrieron tardíamente y consistieron en un aumento en el tiempo de permanencia en el mismo. En todo caso, puesto que los cambios en el sueño REM al administrar nitroprusiato en el RPC no alcanzaron niveles de significación estadística, la disminución tardía observada en los experimentos tras administrar histamina en el RPC no deben atribuirse a un efecto vasodilatador inespecífico de histamina al interactuar con el RPC.

## 2. Cambios en la arquitectura del ciclo vigilia-sueño tras la administración de histamina en el RPC

Como acabamos de indicar cuando se consideraron las variaciones en el tiempo de permanencia de cada uno de los estados del CVS correspondientes a las 6 horas de registro, solo los ANOVAS para la el sueño REM dieron valores estadísticamente significativos tras la administración de histamina en esta región caudal del tegmento pontino, pero estos cambios se expresaron fundamentalmente de forma tardía ya que solo cuando se consideraron los valores entre las horas 3 y 6 de los registros fue cuando las diferencias entre los registros basales y experimentales alcanzaron la significación estadística. Estos hechos nos decidieron a desglosar el análisis del número y duración de los episodios de cada estado del CVS en dos periodos: un periodo inicial entre las horas 1 a 4 y un periodo tardío entre las horas 3 a 6. El resultado de todos estos datos analizados se muestra en las Tablas 4<sub>R</sub> y 5<sub>R</sub>.

### 2.A. Cambios en la duración y número de los episodios de los distintos estados del CVS tras la administración de histamina en el RPC

Para el periodo inicial en las cuatro primeras horas de registro tras la administración de histamina en el RPC el análisis de la duración media y número de episodios dio los resultados que se muestran en la siguiente tabla:

| TABLA 4 <sub>R</sub> . Media de duración ( $\pm$ error standar) en minutos y número (n) de los distintos episodios del CVS en la 1 <sup>a</sup> a la 4 <sup>a</sup> horas de registro agrupadas en condiciones basales y después de la administración de histamina en la región caudal del tegmento pontino. #( $p \leq 0.1$ ) |                            |                            |      |    |   |
|--|----------------------------|----------------------------|------|----|---|
|  | Basal                      | Histamina                  | t    | P  | Porcentaje de incremento/descenso (en el nº de episodios) |
| <b>VIGILIA</b>   | 4.3 ( $\pm 0.7$ )<br>n=128 | 5.4 ( $\pm 0.9$ )<br>n=137 | 0.92 | NS | $\uparrow 7.03\%$   |
| <b>SOMNOLENCIA</b>   | 1.8 ( $\pm 0.1$ )<br>n=181 | 2.0 ( $\pm 0.1$ )<br>n=174 | 1.05 | NS | $\downarrow 3.87\%$                                       |
| <b>SUEÑO LENTO</b>   | 4.9 ( $\pm 0.5$ )<br>n=118 | 5.7 ( $\pm 0.7$ )<br>n=90  | 0.95 | NS | $\downarrow 23.73\%^{\#}$                                 |
| <b>SUEÑO REM</b>   | 5.1 ( $\pm 0.9$ )<br>n=37  | 4.2 ( $\pm 0.6$ )<br>n=21  | 0.72 | NS | $\downarrow 43.24\%$                                      |
| <b>Nº total episodios</b>  | n=464                      | n=422                      |      |    |   |



Por otro lado para el periodo tardío en las cuatro últimas horas de registro tras la administración de histamina en el RPC el análisis de la duración media y número de episodios dio los resultados que se muestran en la siguiente tabla:

| TABLA 5 <sub>R</sub> . Media de duración ( $\pm$ error standar) en minutos y número (n) de los distintos episodios del CVS en la 3 <sup>a</sup> a la 6 <sup>a</sup> horas de registro agrupadas en condiciones basales y después de la administración de histamina en la región caudal del tegmento pontino. *( $p \leq 0.05$ ) #( $p \leq 0.1$ ) |                            |   |      |              |   |
|---|----------------------------|---|------|--------------|---|
|   | Basal                      | Histamina                               | t    | P            | Porcentaje de incremento/descenso (en el n° de episodios) |
| <b>VIGILIA</b>  | 4.2 ( $\pm 0.7$ )<br>n=110 | 4.5 ( $\pm 0.9$ )<br>n=132              | 0.29 | NS           | $\uparrow 20\%$   |
| <b>SOMNOLENCIA</b>  | 2.1 ( $\pm 0.1$ )<br>n=165 | 1.8 ( $\pm 0.1$ ) <sup>#</sup><br>n=133 | 1.60 | $p \leq 0.1$ | $\downarrow 19.39\%$                                      |
| <b>SUEÑO LENTO</b>  | 6.2 ( $\pm 0.7$ )<br>n=118 | 6.7 ( $\pm 0.7$ )<br>n=100              | 0.58 | NS           | $\downarrow 15.25\%$                                      |
| <b>SUEÑO REM</b>  | 5.7 ( $\pm 0.6$ )<br>n=20  | 4.3 ( $\pm 0.8$ ) <sup>#</sup><br>n=12  | 1.41 | $p \leq 0.1$ | $\downarrow 40\%^*$                                       |
| Nº total episodios  | n=413                      | n=377                                   |      |              |   |

### Vigilia

De acuerdo a los valores de las Tablas 4<sub>R</sub> (horas 1 a 4 de registro) y 5<sub>R</sub> (horas 3 a 6 de registro) tanto en el periodo temprano como en el periodo tardío no hubo apenas variación en la duración de los episodios de V. Además no se alcanzaron valores estadísticamente significativos cuando se aplicaron ANOVAs analizando el número de episodios de vigilia presentados en cada una de las cuatro horas del periodo inicial (1-a 4 horas) y del periodo tardío (3 a 6 horas). Estos datos coinciden la estabilidad observada en el tiempo total de permanencia en V tras la aplicación de histamina en el RPC (véase Fig.13<sub>R</sub>) que, como hemos indicado anteriormente, tampoco alcanzó diferencias estadísticamente significativas.

### Somnolencia

Tampoco para el estado de somnolencia se alcanzaron variaciones estadísticamente significativas en la duración y número de episodios, solo en el periodo tardío (3 a 6 horas) la duración media de los episodios disminuyó estando cerca de alcanzar valores estadísticamente significativos (Tabla 5<sub>R</sub>).

### Sueño lento

Al igual que en vigilia y somnolencia los cambios en la duración y número de episodios de sueño lento no alcanzaron valores significativos en ninguno de los dos periodos considerados (Tablas 5<sub>R</sub> y 6<sub>R</sub>).

### Sueño REM

La media en la duración de los episodios de REM en los registros control y con histamina en la región caudal del tegmento pontino en los periodos de 1 a 4 horas y de 3 a 6 horas disminuyo (Tablas 5<sub>R</sub> y 6<sub>R</sub>) pero solo estuvo cerca de alcanzar valores de significación estadística en el periodo tardío, esto es, desde las 3 a las 6 horas de haber administrado la histamina en el RPC. Asimismo, las variaciones en el número de episodios de sueño REM en los registros con histamina, que estuvieron cerca de alcanzar valores significativos también se dieron en el periodo tardío (ANOVA para el número de episodios de sueño REM en cada una de las horas de 3 a 6,  $F_{1,48} = 2.987$   $p \leq 0.1$ ). Estos resultados concuerdan con que la disminución en el tiempo total de permanencia en sueño REM observada tras la administración de histamina en el RPC (véase Fig.13<sub>R</sub>), ocurra tardíamente, esto es entre las horas 3 a 6 horas.

## 2. B. Cambios en las transiciones entre los distintos estados tras la aplicación de histamina en el RPC

Dado que en este grupo los cambios en los otros parámetros del ciclo estudiados solo ocurrieron en el periodo tardío, nos hemos centrado en el análisis de las transiciones entre los distintos estados mediante las matrices general y las matrices iniciales en el periodo comprendido entre las horas 3 a 6 de los registros. El resultado de este análisis se muestra de forma grafica en la Fig 15<sub>R</sub>.

### Vigilia

El análisis del número de transiciones totales contabilizadas desde el estado de vigilia con respecto al número de transiciones totales ocurridas entre todos los estados del CVS (matriz general) indicaron como se observa en la Figura 15<sub>R</sub>-matriz general- que existió un aumento en el porcentaje de las transiciones tanto desde vigilia a somnolencia, como desde vigilia a sueño lento aunque solo en estas últimas se alcanzaron valores cercanos a la significación estadística ( $t=1,56$  ,  $p<0.1$ ). Sin embargo, la matriz inicial indicó que una vez estando en vigilia, no existieron diferencias significativas en el reparto desde vigilia a otros dos estados del CVS (Fig. 15<sub>R</sub>-matriz inicial).

### Somnolencia

El análisis de las transiciones ocurridas desde el estado de somnolencia con respecto al número total de transiciones que se produjeron tras la aplicación de histamina en la región del RPC mostraron un notable descenso las transiciones a sueño lento con niveles estadísticamente significativos ( $t=2.16$ ,  $p<0.05$ ), (Fig.15<sub>R</sub>, matriz general).

En orden a precisar si la somnolencia repartió de manera distinta tras la aplicación de histamina a otros estados del CVS, el estudio de la matriz inicial reveló que con niveles cercanos a la significación estadística, desde el estado de somnolencia se aumentó el reparto hacía el estado de vigilia ( $t=1,56$  ,  $p<0.1$ ) y descendió su reparto a sueño lento ( $t=1,56$  ,  $p<0.1$ ) (Fig. 15<sub>R</sub>-matriz inicial).

### Sueño Lento

El análisis del número de transiciones totales contabilizadas desde el estado de sueño lento con respecto al número de transiciones totales ocurridas desde todos los estados del CVS (matriz general) indicaron que en las horas 3 a 6 de registro tras la aplicación de histamina en el RPC, disminuyeron todas las transiciones desde esta fase del sueño llegando a un valor cercano a la significación ( $t=1,41$ ,  $p<0.1$ ; Fig.15<sub>R</sub>-matriz general) para las transiciones desde sueño lento a somnolencia.

La matriz inicial indicó que una vez estando en sueño lento se dio un aumento de los pasos hacia vigilia con valores cerca de la significación estadística ( $t=1,55$   $p\leq 0.1$ ),

(Fig.15<sub>R</sub>, matriz inicial). Las transiciones a somnolencia y a sueño REM descendieron pero no se alcanzaron valores significativos.

### Sueño REM

El análisis del número de transiciones totales contabilizadas desde el estado de sueño REM con respecto al número de transiciones totales ocurridas desde todos los estados del CVS indicaron que para cuatro últimas horas de registro tras la aplicación de histamina y como se observa en la Figura 15<sub>R</sub>-matriz general- existió un descenso cercano a la significación estadística de las transiciones desde sueño REM a sueño lento ( $t=1,48$   $p<0.1$ ).

El estudio de la matriz inicial reveló que existió un menor reparto desde sueño REM hacía sueño lento ( $t=2,14$   $p<0.1$ ) favoreciéndose el reparto principalmente a somnolencia (Fig.15<sub>R</sub>, matriz inicial).

**En resumen** podemos destacar que el análisis pues de las transiciones entre las distintas fases del CVS tras administrar histamina en el RPC, solo expresó cambios cercanos a la significación estadística a diferencia de lo ocurrido tras la administración de histamina en el TPD o en el VRPO

# Discusión

---

Antes de comenzar a discutir los resultados obtenidos relativos a los efectos de la histamina en el CVS a través de regiones colinérgicas del tegmento pontino así como los receptores implicados en estos efectos discutiremos algunos datos referentes a la metodología empleada en nuestro estudio.

### Microinyecciones intracerebrales

Para el estudio de los efectos en el CVS de histamina y de nitroprusiato mediados por el tegmento pontino se realizaron microinyecciones intracerebrales. Este procedimiento es ventajoso porque permite la estimulación selectiva de una región concreta del sistema nervioso y por tanto una mejor estimación de los efectos concretos de un compuesto en dicha región, comparado con los efectos generalizados de la administración intraperitoneal. Además con la administración intracerebral no hay problemas derivados de la capacidad del compuesto para atravesar la barrera hematoencefálica y las dosis requeridas para producir un efecto son mucho menores. Las microinyecciones son un método muy utilizado en los estudios de neurociencia pero cuenta, sin embargo, con algunos problemas relativos a la difusión del compuesto. Una vez que se realiza la microinyección y para valorar sus efectos debemos de tener en cuenta ciertas características debidas a las condiciones experimentales como son: la concentración del compuesto, el volumen de la inyección, el peso molecular del compuesto y la solubilidad lípidica; pero además existen otros factores que pueden ser determinantes para la difusión de un compuesto como son la velocidad de recaptación y degradación del compuesto, y las características anatómicas del sitio de la inyección (*Evans et al. 1975*).

En nuestro caso se hizo el abordaje de tres zonas del tegmento pontino cuya distancia se encuentra a pocos mm, por tanto, para minimizar la difusión inicial, el volumen de la microinyección fue muy pequeño entre 20-30 nl. A pesar de ello, como expondremos más adelante no debemos descartar que a lo largo de la duración de los experimentos puedan haber ocurrido fenómenos de difusión del compuesto. En cuanto a la velocidad de recaptación de la histamina se ha descrito que tiene una vida media menor de 30 minutos que varía significativamente con el

estado funcional, ya que a diferencia de otras monoaminas no existe una alta afinidad en el sistema de recaptación para esta amina (*Thakkar 2011*), sin embargo, no debe descartarse que durante su metabolismo se produzcan otros metabolitos con mayor vida media que puedan ser activos. En concreto para la histamina habría que valorar si alguno de sus metabolitos como la tele-metil-histamina (*Scammell y Mochizuki 2009*) o el ácido acético imidazol son más estables que la histamina; para esto también será determinante la dotación enzimática de la zona inyectada y se abordará más detalladamente a lo largo de esta discusión.

Como mencionamos anteriormente otro factor importante a tener en cuenta en cuanto a la difusión de un compuesto y que no depende de las características del compuesto en sí, ni del volumen de las microinyecciones, son las características anatómicas del sitio de la inyección. En concreto, se ha sugerido que tractos de fibras altamente mielinizadas que atraviesen la zona inyectada pueden actuar como barreras de difusión y modificar la dirección de difusión y por tanto la dimensión del área afectada (*Freund et al. 2010; Evans et al. 1975*). En nuestro caso el lemnisco medio y el lemnisco lateral podrían limitar ventral y lateralmente la difusión de las sustancias inyectadas en el vRPO y el RPC y el braquio conjuntivo podría actuar como barrera dorsal en las microinyecciones del TPD.

Por último, se ha estimado que la inserción de la cánula de forma crónica produce un daño tisular de al menos 1 mm alrededor de la cánula. En nuestro caso la cánula quedó situada a unos 4mm sobre el lugar donde se realizó la inyección precisamente con la intención de minimizar este daño, sin embargo, se estima que otro factor importante para la difusión del compuesto tras una microinyección y particularmente si se usa una cánula implantada crónicamente es la posibilidad de que la vascularización al área lesionada sea alterada (*Evans et al. 1975*). En nuestro caso solo la punta de la aguja Hamilton de un diámetro mucho menor que el de la cánula tocó el lugar estimulado en el momento de realizar la microinyección y las microinyecciones se realizaron a intervalos semanales. Aunque alrededor del sitio de la microinyección se originó una pequeña zona de gliosis los distintos experimentos semanales se hicieron con un orden aleatorio lo cual minimiza el que los resultados

estuvieran influidos por el daño tisular producido al realizar las microinyecciones. En nuestra experiencia, cuando se realizan de esta forma los experimentos no se encuentran variaciones significativas que afecten a los estados del CVS entre los experimentos con administración de suero salino y aquellos que remedan todos los procedimientos que conllevan las microinyecciones pero sin realizar estas (*Reinoso-Suárez et al. 1994; Garzón 1996 –tesis-; Manquillo 2000 -tesis*).

#### Administración de nitroprusiato

Es conocido que la histamina posee efectos vasodilatadores. Es por ello que se realizaron microinyecciones de otro vasodilatador como es el nitroprusiato a la misma molaridad que la dosis principal más utilizada en los experimentos de histamina (0.16 M) aplicando el mismo volumen de microinyección (20-30 nl) y aplicada también en los mismos lugares que la histamina, para determinar si alguno de los efectos producidos por la histamina en el CVS tras ser inyectada en el tegmento pontino podrían estar causados por la vasodilatación. Los resultados obtenidos han revelado que en ninguna de las 3 zonas del tegmento pontino abordadas donde hemos realizado las microinyecciones de nitroprusiato se produjeron cambios significativos en los tiempos de permanencia de los estados del CVS. Estos resultados coinciden con los obtenidos por *Lin et al. 1996* quienes administraron nitroprusiato en el tegmento pontino como control de sus inyecciones de mayor volumen que el nuestro en el tegmento pontino. Así pues, dado que para la histamina, si se obtuvieron resultados significativos en alguno de los estados del CVS, podemos afirmar que los efectos de la histamina tras su aplicación en las áreas abordadas del tegmento pontino no son producidos por sus propiedades vasodilatadoras sino que deben ser mediadas específicamente por receptores histaminérgicos de las zonas estimuladas.



### Los efectos de la histamina en las distintas áreas microinyectadas

Para la aplicación de histamina, mediante microinyecciones (165-55mM) con un volumen de 20-30 $\mu$ l en las distintas zonas del tegmento pontino encontramos que existen diferentes efectos para las distintas zonas donde se administró.

En el grupo I, con las microinyecciones realizadas en el TPD que es una región considerada de carácter vigilantígeno (*Reinoso-Suárez et al. 1994*) y también con un posible papel preparatorio para el sueño REM (*Moreno-Balandrán et al. 2008*), la histamina produjo efectos que se manifestaron entre la primera y la cuarta hora de los registros, consistentes en un aumento significativo de la vigilia con disminución del tiempo de permanencia en sueño REM. Los cambios en el tiempo de permanencia en somnolencia y sueño lento no llegaron a alcanzar variaciones significativas. El aumento de vigilia y la disminución de sueño REM se produjo fundamentalmente a expensas de la duración de los episodios de estos estados, con un alargamiento en el caso de la vigilia y un acortamiento en el caso del sueño REM. También la duración de los episodios de somnolencia se vio favorecida aunque el tiempo total de permanencia en este estado no aumentara significativamente. En este grupo la histamina no determinó cambios significativos en el número de los episodios de cada uno de los estados, aunque sí que se detectó una tendencia a aumentar el número de los episodios de vigilia. La histamina pues, al interaccionar con el TPD, parece incidir sobre los mecanismos de consolidación de los estados del CVS y no tanto en los mecanismos desencadenadores de los mismos, favoreciendo el mantenimiento tanto los estados de vigilia activa como tranquila (somnolencia) y produciendo una disfacilitación en el mantenimiento del sueño REM.

En la región del vRPO, es decir, en la región generadora de sueño REM tras su estimulación colinérgica (*Reinoso-Suárez et al. 1994; Garzón et al. 1998; Moreno-Balandrán et al. 2008*), los cambios más consistentes y homogéneos tras la administración de histamina ocurrieron entre la segunda y la quinta hora posteriores a su administración. Estos cambios a diferencia de lo ocurrido en el Grupo I afectaron a las proporciones de los 4 estados del CVS y consistieron en un aumento en el tiempo de permanencia en vigilia y somnolencia y una disminución en el tiempo de

permanencia en sueño lento y en sueño REM. Con excepción del sueño lento -en el que se registró una disminución significativa en la duración de sus episodios- en el grupo II, las microinyecciones de histamina en el vRPO determinaron que los efectos en las proporciones de los otros 3 los estados, se produjeran por cambios en el número de episodios, aumentando significativamente los correspondientes a vigilia y a somnolencia y disminuyendo los de sueño REM. A diferencia de lo que ocurre en el TPD, las microinyecciones de histamina en el vRPO, favorecen mecanismos de desencadenamiento de vigilia y somnolencia, mientras que hay supresión para el desencadenamiento del sueño REM.

Es de destacar que tras administrar histamina en el vRPO los cambios inmediatos en las proporciones de los estados del CVS en la primera hora de los registros no estuvieron en esta línea; ya que, aunque el tiempo de permanencia media en vigilia estuvo aumentado este cambio no estuvo acompañado claramente de disminución de sueño REM (como ocurrió posteriormente). En la primera hora de los registros los animales no se comportaron uniformemente al administrar histamina. Aquellos animales que en condiciones basales no presentaron sueño REM en la primera hora siguieron sin presentarlo en los registros con histamina, pero en dos de ellos que en condiciones basales habían tenido sueño REM en la primera hora de los registros al administrar histamina no solo no disminuyó esta fase del sueño sino que sus proporciones en este primer periodo aumentaron respecto a sus valores en los registros control de estos animales.

Para la región caudal (RPC) a pesar de su implicación en el sueño lento y en algunas de las manifestaciones bioeléctricas del sueño REM (*Gnadt y Pegram 1986; Zarranz y Reinoso-Suarez 1971; Steriade y McCarley 1990; Capece et al. 1998; Vanni-Mercier et al. 1991; Garzón 1996 –tesis*) y a diferencia de lo observado tanto en el grupo dorsal como en el grupo ventral la administración de histamina no produjo diferencias significativas en el tiempo de permanencia en vigilia, somnolencia y sueño lento. También hubo estabilidad tanto en la duración como en el número de episodios de estos estados. Tan sólo encontramos para este grupo una disminución significativa

para el sueño REM que ocurrió tardiamente (periodo de 3 a 6 horas). Este hecho, junto con que la disminución en el tiempo de permanencia en sueño REM ocurrió a expensas de un menor número de episodios (como en el grupo II) pero también por una disminución en la duración de los mismos (como en el grupo I) cercana a la significación estadística, nos hace pensar que los efectos de la histamina al ser aplicada al RPC puedan estar producidos por la difusión de la histamina a las otras regiones más que por mecanismos específicos de la histamina al actuar en esta región caudal.

Los trabajos previos de otros autores (*Lin et al. 1996; Crochet y Sakai 1999*) administrando microinyecciones de histamina localizadas en el TPD del gato, indicaron un efecto supresor de larga duración de la actividad electroencefalográfica de 0.5 a 5.0 Hz asociada al sueño lento y un incremento de la actividad desincronizada de vigilia. Nuestros experimentos confirman los resultados de aquellos autores indicando que la histamina en el tegmento pontino tiene una acción favorecedora de vigilia ya que tanto las microinyecciones en el TPD y en el vRPO han favorecido el estado de vigilia; ahora bien, solo en el caso de las microinyecciones en el vRPO las proporciones del sueño lento resultaron afectadas. Dado que en los experimentos de *Lin et al. 1996; Crochet y Sakai 1999*, en las microinyecciones o en la administración por microdiálisis de histamina, el volumen administrado en el tegmento pontino fue considerablemente mayor que en nuestros experimentos (del orden de 10 veces) es muy posible que en los experimentos de aquellos autores, a pesar de que el lugar de la microinyección fuera el TPD, la histamina pudiera difundir ventralmente interactuando con el vRPO. Esta circunstancia junto con la acción sumatoria vigilántigena tanto del TPD como del vRPO detectada en nuestros experimentos es lo que podría determinar que la acción conjunta de la histamina en ambas regiones diera lugar a una gran supresión de sueño lento y su actividad electroencefalográfica concomitante observada por *Lin et al. 1996; Crochet y Sakai, 1999*. Nuestros resultados añaden que en la acción vigilántigena de las regiones dorsales y ventrales del tegmento pontino operan distintos mecanismos intrínsecos del CVS. Así,

en el TPD están sustentados los mecanismos que consolidan o mantienen tanto la vigilia activa como tranquila (somnolencia) mientras que la acción vigilantígena del vRPO está sustentada por mecanismos desencadenantes de ambos estados vigilantígenos.

Respecto al sueño REM podríamos decir que en las tres regiones exploradas por nosotros, aunque con diferencias importantes en su expresión temporal, los efectos más duraderos y robustos de la histamina fueron los referidos a la disminución del sueño REM. Por tanto de acuerdo a nuestros resultados cuando hay una interacción restringida de la histamina con el TPD (y también con el vRPO) los mecanismos favorecedores de vigilia incluidos los de desincronización electroencefalográfica se hacen a expensas de disminuir el otro estado que cursa con un EEG activado, esto es el sueño REM.

Disminuciones duraderas de sueño REM no fueron encontradas por el grupo de Sakai tras la administración de microinyecciones de mayor volumen (*Lin et al. 1996*) ni mediante microdialisis de histamina (*Crochet y Sakai, 1999*) en el TPD; en estos experimentos solo describen disminuciones transitorias de sueño REM en las dos primeras horas de los registros. Sin embargo si que encuentran que la histamina produce una notable reducción de sueño REM al ser administrada en regiones más rostrales como el tegmento mesopontino adyacente a la sustancia gris periacueductal (*Crochet et al. 2006*). Es muy difícil que con el pequeño volumen de nuestras inyecciones la histamina en nuestros experimentos alcanzara esta última región abordada por *Crochet et al. 2006*, por tanto, es posible que las inyecciones de gran volumen de histamina realizadas en el TPD (*Lin et al. 1996; Crochet y Sakai 1999*) como acabamos de apuntar, pudieran producir supresión de sueño REM pero también de alguna manera favorecer mecanismos desencadenantes de sueño REM que también han sido detectados por nosotros.

*Lin et al. 1996* y *Crochet y Sakai 1999* al presentar los efectos de la administración de histamina en el tegmento pontino, describen -junto con el descenso transitorio de sueño REM- que la histamina en algunos casos podía provocar sueño REM de corta latencia desde somnolencia como ocurre en la narcolepsia. Hacen constar además, que en 3 de 9 animales, la histamina produjo un aumento de sueño REM

(especialmente notorio en las tres primeras horas de los registros, de acuerdo a los resultados que presentan en la *fig. 9 de Crochet y Sakai, 1999*). En nuestros experimentos del Grupo II cabe destacar en la primera hora de los registros que tras la administración restringida de la histamina en el vRPO (en contra de lo obtenido para el resto de horas en este grupo) los efectos en el sueño REM no fueron homogéneos. En los animales que no habían presentado sueño REM en primera hora de los registros basales la histamina no provocó facilitación alguna de sueño REM y sin embargo en los animales que habían presentado sueño REM en la primera hora de sus registros control, la histamina provocó un aumento de sueño REM con una latencia muy corta. De esta forma podemos indicar que de acuerdo a los trabajos del grupo de Sakai nuestros resultados confirman la posibilidad que la histamina pueda ejercer acciones facilitadoras de sueño REM al actuar sobre el tegmento pontino. Ahora bien, el hecho de que los efectos facilitadores del sueño REM solo los hayamos encontrado en los experimentos con las microinyecciones en el vRPO y no hayan ocurrido en los experimentos realizados en los otros dos grupos (tras de la administración de histamina en el TPD o en el RPC) nos permite puntualizar que los posibles efectos facilitadores del sueño REM responden a mecanismos que puedan operar a nivel del vRPO, es decir, en la región específicamente generadora de sueño REM tal como demostraron los experimentos con estimulación colinérgica (*Reinoso-Suárez et al. 1994; Garzón et al. 1998; Moreno-Balandrán et al. 2008*) y no en otras regiones del tegmento pontino (ver más adelante).

En nuestro trabajo hemos prestado especial atención a los cambios que podría producir la histamina en la arquitectura del CVS al interaccionar con las tres regiones del tegmento pontino exploradas. De esta forma no solo nos hemos ocupado en determinar los cambios en la duración y/o frecuencia de los episodios de los distintos estados que pudieran determinar los efectos en el tiempo de permanencia de los estados del ciclo, sino que también hemos llevado a cabo un estudio exhaustivo sobre las relaciones en las transiciones entre los distintos estados del CVS.

Respecto al estudio de las transiciones estudiadas en Grupo I y en consonancia con que no existan variaciones significativas respecto al número de episodios en los distintos estados del CVS tras la aplicación de histamina el TPD, no existieron apenas variaciones significativas en las transiciones ocurridas en este grupo excepto un descenso significativo del número de transiciones desde sueño REM a SL que al mirar la matriz inicial parece que se desvía preferentemente a vigilia y que podría explicar la tendencia a aumentar el número de periodos de vigilia. También destaca el hecho de que tras la aplicación de histamina desde vigilia se entra menos veces en sueño lento lo que indica que hay dificultad para una entrada rápida en sueño. Como la histamina la hipocretina 1 tiene vigilantígenos al actuar sobre el TPD (*Moreno-Baladrán et al. 2008*); sin embargo, los resultados del presente trabajo en la arquitectura del CVS de la histamina en el TPD contrastan con lo que ocurre con la hipocretina, ya que en este último caso, la hipocretina 1 produce un claro aumento de las transiciones entre vigilia y somnolencia y entre somnolencia y vigilia junto con una supresión de los pasos de sueño lento a sueño REM (*Moreno-Baladrán et al. 2008*).

Si atendemos al periodo donde se observó facilitación de la vigilia y somnolencia en el grupo II (2 a 5 horas tras la administración de histamina) el análisis de las transiciones entre los distintos estados indicó que el número total de transiciones desde vigilia y somnolencia aumentaron significativamente, lo que está de acuerdo con el aumento en el número de sus periodos. Sin embargo las proporciones de transición entre estos dos estados se mantuvieron constantes aunque hubo una supresión significativa de los pasos desde sueño lento a sueño REM. Estos hechos respecto a los cambios en la arquitectura del CVS tras administrar histamina en el vRPO son coincidentes con lo observado en las transiciones tras la administración de hipocretina 1 en el vRPO (*Moreno-Baladrán et al. 2008*); no obstante, como hemos indicado antes, la supresión de sueño REM tras la aplicación de histamina en el vRPO viene acompañada de supresión de sueño lento y aumento de vigilia y somnolencia cosa que no ocurre al administrar hipocretina 1 (*Moreno-Baladrán et al. 2008*).

### Experimentos con pirilamina y combinados pirilamina-histamina

El antagonista de receptores H1 pirilamina se administró de forma intraperitoneal. En esta vía de administración se obvia el paso gástrico y hepático en el metabolismo del fármaco pasando rápidamente a la circulación sanguínea, produciendo efectos en menor tiempo aunque de forma menos específica que la administración intracerebral, ya que aún después de atravesar la barrera hematoencefálica y penetrar la pirilamina en el SNC esta se uniría a los receptores H1 repartidos por todo el encéfalo.

Se utilizó en todos los casos una dosis de 1 mg/Kg. Esta dosis se había visto previamente que era suficiente para ver efectos en el CVS de gatos (*Lin 2000*). Los efectos de acuerdo a los resultados de este autor consistieron en un aumento duradero de la actividad electroencefalográfica de ondas lentas (especialmente de sueño lento profundo) asociado a descenso de vigilia y mucho más notablemente de sueño REM. También se ha descrito que la pirilamina por vía sistémica produce aumento de sueño lento y disminución de sueño REM en perros (*Wauquier et al. 1981*). En nuestros experimentos es claro que los animales presentaron con la administración de la misma dosis i.p. de pirilamina una disminución de sueño REM que duró al menos ,el total de las 6 horas de registro, pero a diferencia de lo reseñado por *Lin 2000* y *Wauquier et al. 1981* los cambios en las otras fases del ciclo no alcanzaron valores significativos. No obstante, es de reseñar que si que se dio una tendencia a tener más sueño lento en nuestros animales, pero en los experimentos basales nuestros gatos ya de por sí presentaron poca vigilia y bastante sueño lento y es posible por tanto, que esta circunstancia junto a que la dosis de pirilamina administrada no fue muy grande, determinara que no se dieran en nuestros experimentos aumentos tan marcados de sueño lento como en los experimentos realizados por los otros autores.

El hecho de que no detectáramos disminuciones significativas para la vigilia y la somnolencia así como aumentos de sueño lento tras la administración i.p de pirilamina no fue óbice para que en nuestros experimentos combinados administrando pirilamina i.p. previamente a las microinyecciones intracerebrales de histamina ocurriera el bloqueo de los cambios producidos por la histamina

observados en aquellos estados del CVS. Así, nuestros resultados para los experimentos combinados indican que tanto en el grupo I (con las inyecciones de histamina en el TPD) como en el grupo II (con las inyecciones de histamina en el vRPO) todos los aumentos significativos en el tiempo de permanencia tanto en vigilia (en el grupo I), como en vigilia y somnolencia (en el grupo II) producidos por la aplicación de histamina en estas regiones del tegmento pontino fueron bloqueados por la administración previa de pirilamina i.p. También la disminución del tiempo de permanencia en sueño lento provocada por la administración de histamina (grupo II) se bloqueó por la administración previa de pirilamina, incluso en algunas horas de estos experimentos combinados el tiempo de permanencia en SL se situó por encima de los valores de los registros control. Se puede concluir por tanto que los cambios en vigilia, somnolencia y sueño lento producidos por la histamina en el tegmento pontino son mediados a través de los receptores H1. Estos resultados coinciden con los encontrados por el grupo de Sakai donde la inyección previa de pirilamina previno el incremento de vigilia y la disminución de sueño lento producido por sus inyecciones histamina en el tegmento pontino de gatos (*Lin et al. 1996*). Estos resultados fueron también encontrados en rata (*Monti et al. 1986*)

No se ha prestado mucha atención sobre el hecho de que la pirilamina y otros antihistamínicos antagonistas de los receptores H1 (*Marzanatti et al. 1989*) puedan determinar descenso de sueño REM tal como ha ocurrido en nuestros experimentos. A veces se ha aludido a que este hecho pueda estar producido por las propiedades anticolinérgicas de estos fármacos ya que pueden unirse a receptores muscarínicos (*Wauquier et al. 1981; Kubo et al. 1987*). Sin embargo hay autores que sostienen que la pirilamina tiene una afinidad 1000 veces mayor por los receptores H1 que por los muscarínicos. En nuestro caso la dosis administrada de 1mg/kg estaría muy lejos de poseer capacidad anticolinérgica, lo que hace pensar que otro mecanismo distinto al mediado por los receptores colinérgicos pueda estar implicado en la disminución de sueño REM provocada por la pirilamina. No está claro cuál puede ser el mecanismo por el cual la pirilamina pueda determinar reducción del sueño REM. Este efecto podría ser una consecuencia secundaria al aumento de sueño lento, sin embargo, en nuestros experimentos con pirilamina la reducción de sueño REM ha estado presente



aún cuando los cambios en los otros estados del ciclo no fueron significativos. Esto indica por tanto, que la pirilamina actuando sobre receptores histaminérgicos pueda tener unas acciones *per se* suprimiendo directamente el sueño REM.

Los ratones Knock-out para histamina descarboxilasa (HDC) y por tanto deficientes en histamina presentan un aumento significativo de sueño REM (*Parmentier et al. 2002*), mientras que en ratones Knock-out para receptores H1 (*Huang et al. 2006*) no encontraron ningún cambio en el tiempo de permanencia en sueño REM ni en ningún otro estado del CVS, lo que lleva a sugerir a estos autores que otro receptor distinto al H1 debería estar implicado en el control del sueño REM por histamina, mencionando a los receptores H2 y H3. Sin embargo, aunque no se da relevancia en el texto, hay que señalar que en el trabajo de *Huang et al. 2006* los autores describen que hay un aumento significativo en el número de periodos de sueño REM durante la fase de luz para los ratones sin receptores H1, pero la duración media de cada episodio se ve reducida, por lo que no afecta de forma significativa al aumento en el tiempo de permanencia. Por tanto, el hecho de que estos animales no expresen cambios en el tiempo total de permanencia en sueño REM no quiere decir que los receptores H1 dejen de tener un papel regulando esta fase del sueño.

En nuestros experimentos combinados -a diferencia del bloqueo detectado en los cambios de la vigilia, somnolencia y sueño lento con la administración previa de pirilamina i.p. producidos por la histamina al interaccionar principalmente en los grupos dorsal y ventral- los cambios en el sueño REM distaron de ser bloqueados por el antagonista H1, observando que en los experimentos combinados llevados a cabo en los tres grupos de nuestros animales el sueño REM siguió siempre disminuido con respecto a los experimentos control e incluso de forma más acusada que en los experimentos en los que solo se realizó la administración intracraneal de histamina. Estos resultados están de acuerdo con los expuestos en el trabajo del grupo de Sakai (*Lin et al. 1996*) que al igual que nosotros, en sus experimentos combinados encontraron que, con la administración previa de histamina se producía un descenso significativo del sueño que alcanzaba las 6 horas de registro. No obstante en los experimentos de estos autores los efectos de la histamina intracraneal fueron menos

robustos que los nuestros. En cualquier caso, puesto que la selectividad de la pirilamina por los receptores H1 es muy alta frente a los otros tipos de receptores H2 y H3 (*Parsons y Ganellin 2006*) los efectos supresores de sueño REM mediados por histamina al actuar sobre el tegmento pontino son potenciados cuando se bloquean los receptores H1. Nuestros experimentos demuestran que los efectos supresores del sueño REM de la pirilamina se dan tanto a nivel del vRPO -donde la reducción del sueño REM por histamina viene dada por un bloqueo en la aparición de los episodios del sueño REM-, como del TPD -donde la reducción de esta fase de sueño viene dada por la falta de consolidación de sus episodios-. También en la línea de nuestros resultados, otro experimento combinado con la inyección de pirilamina 20 min antes de un agonista de los receptores H1 no bloqueo los efectos en el sueño REM (*Monti et al. 1986*) lo que hace sugerir a este autor que existen dos mecanismos de acción distintos de la histamina en el control de la vigilia y del sueño lento y por otra parte del sueño REM. En cualquier caso, además de precisar posibles mecanismos que puedan sustentar la acción supresora de la pirilamina sobre el sueño REM, deberían hacerse experimentos combinados utilizando agonistas selectivos de los otros receptores histaminérgicos para poder determinar los receptores que en concreto median las acciones sobre el sueño REM al interaccionar la histamina con las distintas áreas del tegmento pontino.

En relación con los efectos promotores del sueño REM producidos de forma inmediata (en la primera hora) en alguno de nuestros animales cuando se administró histamina en el vRPO, aunque no podemos dar resultados definitivos ya que solo se llevaron a cabo experimentos combinados en uno de estos animales, es de destacar que en este animal hubo un bloqueo de sueño REM en la primera hora de registro por la administración de pirilamina i.p indicando que el efecto rápido facilitador de sueño REM producido por la histamina en la región del vRPO puede estar mediado por los receptores H1 de histamina.

### Mecanismos celulares

Además de conocer el tipo de receptor implicado en los efectos en el CVS mediados por la histamina en las distintas regiones del tegmento pontino, es muy difícil concretar otros mecanismos celulares por los cuales se puedan producir aquellos efectos ya que como mencionamos anteriormente, en el capítulo de planteamiento y objetivos, el tegmento pontino es una región muy heterogénea tanto desde el punto de vista morfológico, como bioquímico y funcional (*Reinoso-Suárez et al. 2010*).

En la región del TPD -explorada con nuestras microinyecciones de histamina de pequeño volumen en el grupo I de nuestros experimentos- se encuentran entremezcladas neuronas colinérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas y gabaérgicas (*Jones and Beaudet 1987; Sakai 1991; Rodrigo-Angulo et al. 2000, 2005; Brown et al 2008*). Al TPD llega una fuerte innervación de fibras histaminérgicas procedentes del núcleo tuberomamilar hipotalámico que parecen establecer sinapsis con las neuronas del TPD principalmente a nivel somático (*Lin et al. 1996*). Se ha encontrado una alta densidad de receptores H1 en grupos colinérgicos del tronco del encéfalo (*Brown et al. 2001*) y estudios in vitro han revelado que la histamina excita las neuronas colinérgicas del tronco del encéfalo mediante los receptores H1 (*Thakkar, 2011*). Por tanto, tal como fue propuesto por *Lin et al. 1996*, los efectos vigilantígenos promotores de la activación cortical observados por la administración de histamina en esta zona podría ser causada a través de las proyecciones ascendentes de las células colinérgicas del TPD y mediada por los receptores H1.

El grupo de Sakai descarta a las células noradrenérgicas como células implicadas en los efectos de la histamina en el tegmento pontino porque los efectos con sus inyecciones de histamina en el tercio caudal de la región de perilocus coeruleus alfa donde se encuentran más concentradas las células noradrenérgicas que las colinérgicas fueron menos robustos que los encontrados tras inyecciones más rostrales (*Lin et al. 1996*) ó bien, porque no encontraron efectos sobre el sueño REM tras la microdiálisis de la histamina en esta zona (*Crochet y Sakai 1999*). Sin embargo, nuestras microinyecciones de histamina con menor volumen en el TPD quedaron situadas en el tercio caudal de la región del perilocus coeruleus alfa y junto a un

aumento de vigilia determinaron claramente una supresión de sueño REM, supresión que no se presentó por inhibición de los mecanismos primarios desencadenantes de esta fase del sueño sino por falta de consolidación o mantenimiento de la misma una vez que estuviera presente. Nuestros resultados indican que el papel vigilantígeno de la histamina al actuar sobre esta zona del TPD -donde hay una concentración células noradrenérgicas- posiblemente arrastre secundariamente a disminuir el otro estado que cursa con un EEG activado, esto es el sueño REM por falta de su mantenimiento o consolidación. Dado que las neuronas noradrenérgicas forman parte del sistema reticular ascendente de activación pero están silentes durante el sueño REM, no se puede descartar -a la vista de nuestros resultados- que mecanismos noradrenérgicos estén mediando en los efectos de la histamina cuando actúa en el TPD.

Respecto a los efectos de la histamina sobre las células serotoninérgicas parece que puede tener distintos efectos (excitatorios o inhibidores) según las distintas poblaciones de neuronas serotoninérgicas. No se conocen cuales pueden ser los efectos de la histamina al actuar concretamente sobre células serotoninérgicas del TPD. Asimismo está descrito que mecanismos gabaérgicos puedan estar presentes en acciones de la histamina sobre células serotoninérgicas. Así, la aplicación extracelular de histamina en células serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe en ratas produjo una rápida depresión en la tasa de disparo de estas. Esta inhibición no se bloqueó por pirilamida u otros antagonistas de los receptores H1 pero si fue bloqueada por uno de los antagonistas de los receptores H2 que también mostraban afinidad por los receptores GABA; además el hecho de que otros antagonistas H2 sin afinidad por receptores GABA no bloquearon dichos efectos permite suponer que el efecto de la histamina en este caso es mediado por mecanismos GABAérgicos (*Lakoski and Aghajanian 1983*). Son necesarios pues, más experimentos a nivel celular para poder concretar el papel de la histamina en las distintas poblaciones bioquímicas de células que se encuentran presentes en el TPD y que hacen que se expresen los cambios en los estados y arquitectura del CVS cuando la histamina actúa en esta región.

Respecto a los mecanismos celulares en los que la histamina pueda incidir al actuar en la región del vRPO hay que atender a que la respuesta puede ser dual. Por un lado puede haber una respuesta facilitadora del sueño REM mucho menos constante y duradera que la otra respuesta que es de signo opuesto, es decir, inhibidora de sueño REM.

En el vRPO se encuentran células glutamatérgicas (*Lai et al. 1999*), serotoninérgicas (*Rodrigo-Angulo et al. 2000*) y gabaérgicas (*De la Roza y Reinoso-Suárez 2006*). El vRPO recibe aferencias que se originan en los núcleos y células colinérgicas del tegmento mesopontino (*Rodrigo-Angulo et al. 2005*) y una densa proyección gabaérgica desde el diencefalo (*De la Roza et al. 2004, Rodrigo-Angulo et al. 2008*); además de aferencias hipocretinérgicas desde el hipotálamo posterior junto con otras que podrían ser histaminérgicas (*Nuñez et al. 2006*). De hecho está demostrado que (aunque en bajo porcentaje) existen terminales histaminérgicas inervando las regiones del RPO (*Semba 1993*).

De acuerdo a nuestros resultados la región de vRPO es la mediadora de que la histamina actuando en el tegmento pontino pueda favorecer el desencadenamiento de sueño REM, tal como se indicó que podía ocurrir esporádicamente en los trabajos del grupo de Sakai (ver mas arriba), ya que la respuesta facilitadora del sueño REM, cuando ha ocurrido en nuestros experimentos solo se ha dado en animales con administración de histamina en el vRPO. El hecho de que solo hayamos encontrado respuestas facilitadoras de sueño REM en experimentos con administración de histamina en el vRPO, está de acuerdo con el papel funcional propuesto para esta región de ser capaz de reclutar todos los subsistemas implicados en las distintas manifestaciones bioeléctricas que definen al sueño REM, para en definitiva, desencadenar esta fase del sueño (*Reinoso-Suárez et al. 1994, Garzón et al. 1998 Moreno-Balandrán et al. 2008*). La facilitación de sueño REM en nuestros experimentos con histamina en el vRPO ha ocurrido con una corta latencia, ha quedado restringida a la primera hora de los registros y la hemos observado en animales en los en sus registros basales presentaron sueño REM al poco de ser conectados al polígrafo (esto es, en la primera hora de los registros) .Esto abre la

posibilidad de que la histamina pueda potenciar el sueño REM una vez que se haya instalado o cuando haya una alta probabilidad de que lo haga.

Los efectos facilitadores de sueño REM mediados por histamina en el vRPO podrían ser explicados en base a estudios *in vitro* que han demostrado que las células del vRPO responden despolarizándose y aumentando la frecuencia de su descarga ante la presencia en el medio de histamina al igual que por acetilcolina (Nuñez *et al.* 1997, 1998). Por tanto, es posible, que este efecto inductor del sueño REM de la histamina pueda estar producido por los mismos mecanismos celulares de acción propuestos para la generación de sueño REM inducido por carbacol en el vRPO, esto es, activación de las células de proyección posiblemente de naturaleza glutamatérgica (Nuñez *et al.* 2002). En base a nuestros resultados estos efectos podrían estar mediados por los receptores H1 aunque se necesitaría contar con experimentos en los que se pudiera llevar a cabo la potenciación de sueño REM con histamina de forma no ocasional sino sistemática para poder explorar la naturaleza de los receptores histamínicos a nivel del vRPO para mediar efectos facilitadores del sueño REM.

Sin embargo, dado que las neuronas histaminérgicas son activas en vigilia y silentes en el sueño REM (Vanni-Mercier *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2006) no deja de resultar paradójico que de alguna manera al actuar sobre el vRPO la histamina pueda desencadenar sueño REM. Es más concordante con estos hechos que la histamina tenga un papel inhibitorio de los mecanismos activos que promueven sueño REM a nivel del vRPO. Este papel inhibitorio ha quedado también demostrado en nuestros experimentos en el vRPO con la respuesta de supresión de sueño REM que fue homogénea en todos los animales a partir de la segunda hora de los registros. Esta supresión de sueño REM se debió a un bloqueo de su desencadenamiento desde sueño lento, lo cual indica que esta pueda ser una respuesta primaria de la histamina en el vRPO a la cual, como consecuencia secundaria, se añadiría la respuesta vigilantígena que también hemos observado en los animales de este grupo. Puesto que la histamina es un neurotransmisor excitatorio es muy posible que su actuación en el vRPO esté mediada por la facilitación de mecanismos inhibitorios locales. De

hecho, desde el punto de vista celular, experimentos en curso en nuestro laboratorio llevados a cabo *in vivo* en ratas anestesiadas están demostrando que, al contrario de los experimentos *in vitro*, la histamina *in vivo* produce una acción inhibitoria las neuronas del vRPO bloqueando la respuesta unitaria evocada por estimulación del vRPO contralateral.

Los mecanismos locales inhibitorios de la histamina en el vRPO pueden ser de naturaleza gabaérgica; o bien, pueden ser también facilitadores de la neurotransmisión de las células serotoninérgicas de esta región (*Rodrigo-Angulo et al. 2000*) ya que la serotonina produce respuestas inhibitorias en el vRPO (*Nuñez et al. 1998*). Sin embargo, son importantes los resultados de otros experimentos que nos permiten suponer que los efectos inhibidores del sueño REM de la histamina al actuar sobre esta zona del tegmento pontino estén mediados por mecanismos gabaérgicos. Los efectos inhibidores histaminérgicos en esta zona del vRPO están producidos por un descenso significativo del número de periodos de sueño REM al igual que ocurre mediante administración de muscimol (agonista GABA<sub>A</sub>) (*Sanford et al. 2003*) en el RPO. Por otra parte, la hipocretina en el vRPO a través de mecanismos gabaérgicos (*Nuñez et al. 2006*) actúa disminuyendo la frecuencia de los episodios REM por un bloqueo específico de las transiciones desde el sueño lento (*Moreno-Baladrán et al. 2008*), tal como ha ocurrido en los presentes experimentos.

Los mecanismos gabaérgicos a través de los cuales la histamina puede operar en el vRPO pueden ser múltiples y pueden operar tanto a nivel metabólico como a nivel neural tanto postsináptico como presináptico.

A nivel metabólico, una de las vías de degradación de la histamina es mediante la enzima DAO que degrada la histamina en ácido imidazol 4-acético (IMA). Esta vía metabólica ha carecido de interés ya que la enzima DAO se pensaba que no estaba presente en el SNC, sin embargo, estudios relativamente recientes han demostrado que se encuentran niveles especialmente altos de esta enzima en células gliales del puente en ratas (*Ono K et al. 2009*) concretamente en astrocitos de la formación reticular pontina (*Sasabe et al. 2012*). El IMA tiene la misma afinidad por los receptores GABA<sub>A</sub> que el propio GABA y tiene efectos inhibitorios en la tasa de

disparo de las células por lo que parece tener una función similar al GABA presumiblemente por la activación de un receptor común y ,aunque se ha detectado la presencia de IMA en el cerebro ,su origen exacto es aún desconocido pero se hipotetiza con que una aplicación exógena de histamina produciría un aumento del IMA (*Tunnicliff, 1998*).

A nivel neural porque las propias terminales histaminérgicas localizadas en el vRPO puedan liberar GABA, ya que está demostrado que el GABA colocaliza en las células histaminérgicas (*Panula et al. 1989; Brown et al. 2001; Thakkar 2011*) o bien, porque la histamina active a las células gabaérgicas locales del vRPO. Otro posible efecto postsináptico podría darse por el efecto activador que la histamina tiene sobre el receptor Beta3–GABA(A) puesto que ha sido recientemente descubierto que la histamina tiene una afinidad por este receptor semejante a la que tiene para los receptores H1 y H2 (*Seeger et al. 2012*). No obstante, la existencia de aquel receptor gabaérgico no está demostrada de manera precisa en el cerebro. Además de estos mecanismos postsinápticos, son muy probables los mecanismos presinápticos para la liberación de GABA por parte de su activación por proyecciones histaminérgicas dada la gran profusión de terminales gabaérgicos presentes en el vRPO (*De la Roza y Reinoso-Suárez 2006*) .Esto conduciría a una disfacilitación de las células efectoras (probablemente glutamatérgicas) de esta región, con lo cual se produciría bloqueo para desencadenar sueño REM tal como ha ocurrido en nuestros experimentos.

Por último y en relación con el tipo de receptores histaminérgicos que puedan estar mediando estas acciones, ya hemos indicado que con nuestros experimentos no hemos podido llegar a conclusiones definitivas sobre el papel de los receptores H1 en los efectos de la histamina en el sueño REM. Para confirmar o rechazar su mediación son necesarios experimentos con antagonistas de este receptor que no tuvieran efectos de por si tan marcados sobre el sueño REM como ocurre con la pirilamina. Por otra parte, no hay que descartar la posibilidad de que el efecto inhibitor del sueño REM pueda estar mediado por otro tipo de receptores como son los receptores H3. En relación a estos receptores que funcionan tanto como



autoreceptores como heteroreceptores, diversos estudios han confirmado que la histamina por medio de ellos (debido a la inhibición de canales de calcio presináptico) inhibe la liberación otros neurotransmisores entre ellos la acetilcolina (*Brown et al. 2001*) y de esta manera se podrían bloquear las aferencias colinérgicas al vRPO y producir inhibición del sueño REM. Actualmente hay indicaciones muy consistentes sobre la utilización de los ligandos de los receptores H3 para corregir desordenes del sueño y la vigilia así como tratamiento de la narcolepsia (*Celanire et al. 2005*).

# Conclusiones

---

1. La aplicación de histamina mediante microinyecciones (55-165mM) con un volumen de 20-30 $\mu$ L, en distintas zonas del tegmento pontino indicó que la histamina produce efectos diferenciales en las distintas zonas donde se administró, que no deben ser atribuidos al posible efecto vasodilatador de esta sustancia, ya que, tras microinyecciones equimolares y de volumen semejante de nitroprusiato en las mismas áreas, todos los estados del CVS presentaron una notable estabilidad en sus proporciones.
2. En el TPD la histamina produjo efectos, que se manifestaron entre la primera y la cuarta hora de los registros, consistentes en un aumento significativo de la vigilia con disminución del tiempo de permanencia en sueño REM. Estos cambios se produjeron a expensas del aumento en la duración de los episodios de vigilia y disminución en los de sueño REM. La histamina pues al interaccionar con el TPD, incide sobre los mecanismos de mantenimiento de los estados del CVS y no tanto en los mecanismos desencadenadores de los mismos, favoreciendo la consolidación de la vigilia y produciendo un efecto contrario en el mantenimiento del sueño REM.
3. En la región del vRPO los cambios más consistentes y homogéneos ocurrieron entre la segunda y la quinta hora tras administrar histamina. Afectaron a las proporciones de los 4 estados del CVS y consistieron en aumento en el tiempo de permanencia en vigilia y somnolencia y disminución en sueño lento y en sueño REM. A excepción del sueño lento en el que se dio una disminución significativa en la duración de sus episodios, los cambios en las proporciones de los otros 3 estados se produjeron por cambios en el número de episodios. Tras las inyecciones de histamina en el vRPO están pues favorecidos mecanismos de desencadenamiento de vigilia y somnolencia, mientras que hay bloqueo para el desencadenamiento del sueño REM.
4. En los efectos inmediatos de la administración de histamina en el vRPO no hay supresión de sueño REM, podrían incluso darse fenómenos facilitatorios posiblemente relacionados con predisposición inicial del animal a presentar sueño REM y sustentados por acciones excitatorias de la histamina en la actividad unitaria de las células del vRPO.

5. La histamina en el RPC solo produce efectos muy tardíos consistentes en una disminución significativa del sueño REM. Este hecho, junto con que la disminución en el tiempo de permanencia en sueño REM ocurrió a expensas de un menor número de episodios (como en el grupo II) pero también por una disminución en la duración de los mismos (como en el grupo I) parecen indicar que pudieran ser debidos a difusión tanto a las zonas vecinas del TPD y del vRPO más que por mecanismos específicos de la histamina al actuar en esta región caudal.
  
6. Los receptores H1 están implicados en los efectos producidos en los estados de vigilia al interaccionar con el TPD ( Grupo I); y de vigilia, somnolencia y sueño lento al interaccionar con el vRPO (Grupo II), puesto que los cambios en estos estados se bloquean ante la administración previa de pirilamina (antagonista H1).
  
7. La Pirilamina, administrada intraperitonealmente, determina por sí misma una supresión consistente de sueño REM y al ser utilizada en experimentos combinados con administración de histamina intracerebral no determina el bloqueo de la reducción de sueño REM mediada por las distintas regiones del tegmento pontino, lo cual sugiere que desde el punto de vista de los receptores puedan existir dos mecanismos de acción distintos de la histamina en el control de la vigilia y del sueño lento y por otra parte del sueño REM.
  
8. La histamina produce distintos efectos en los mecanismos intrínsecos de la arquitectura del CVS al ser administrada en las regiones dorsales o ventrales del tegmento pontino. Así en el TPD, están sustentados los mecanismos que consolidan o mantienen tanto la vigilia activa como tranquila (somnolencia), determinando una reducción secundaria del sueño REM por falta de consolidación de sus episodios. En cambio en el vRPO la acción primaria sería el bloqueo de las transiciones desde sueño lento a sueño REM lo que daría lugar a que secundariamente se favoreciera el desencadenamiento de vigilia y somnolencia.

9. Los efectos vigilantígenos primarios de la histamina en el TPD estarían basados en acciones excitatorias de la histamina en las células de esta región que presentan proyecciones ascendentes. De acuerdo a la heterogeneidad bioquímica de esta región, las células del TPD sobre las que actúe la histamina pueden ser de otra naturaleza además de colinérgicas.
  
10. La reducción de sueño REM producido por histamina en el vRPO por bloqueo de mecanismos desencadenantes de este estado, estaría mediada por la facilitación por parte de la histamina de mecanismos inhibitorios locales en el vRPO. Estos mecanismos inhibitorios pueden ser de muy diversos tipos pero es probable que respondan a un aumento de la transmisión Gabaérgica en esta región.

# Referencias

---

- Aserinsky E. Periodic respiratory pattern occurring in conjunction with eye movements during sleep. *Science*. 1965 .150(3697):763-6.
- Aserinsky E. The discovery of REM sleep. *J Hist Neurosci*. 1996 .5(3):213-27.
- Aserinsky E and Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 1953 .118(3062):273-4.
- Baghdoyan HA, Monaco AP, Rodrigo-Angulo ML, Assens F, McCarley RW, Hobson JA. Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984 .231(1):173-80.
- Bakker RA, Nicholas MW, Smith TT, Burstein ES, Hacksell U, Timmerman H, Leurs R, Brann MR, Weiner DM. In vitro pharmacology of clinically used central nervous system-active drugs as inverse H(1) receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 .322(1):172-9.
- Barbier AJ and Bradbury MJ. Histaminergic control of sleep-wake cycles: recent therapeutic advances for sleep and wake disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007 .6(1):31-43.
- Barbier AJ, Aluisio L, Lord B, Qu Y, Wilson SJ, Boggs JD, Bonaventure P, Miller K, Fraser I, Dvorak L, Pudiak C, Dugovic C, Shelton J, Mazur C, Letavic MA, Carruthers NI, Lovenberg TW. Pharmacological characterization of JNJ-28583867, a histamine H(3) receptor antagonist and serotonin reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol*. 2007 .576(1-3):43-54.
- Bongers G, de Esch I, Leurs R. Molecular Pharmacology of the Four Histamine Receptors. *Adv Exp Med Biol*. 2010.709:11-19.
- Bosch D and Schmid S. Activation of muscarinic cholinergic receptors inhibits giant neurones in the caudal pontine reticular nucleus. *Eur J Neurosci*. 2006 .24(7):1967-75
- Bremer F. Nouvelles recherches sur le mécanisme du sommeil. *C.R.Soc.Biol*.1936. 122:460:464
- Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol*. 2001 .63(6):637-72.
- Brown RE, McKenna JT, Winston S, Basheer R, Yanagawa Y, Thakkar MM, McCarley RW. 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*. 2008 .27(2):352-63.
- Callaway CW, Lydic R, Baghdoyan HA, Hobson JA. Pontogeniculooccipital waves: spontaneous visual system activity during rapid eye movement sleep. *Cell Mol Neurobiol*. 1987 .7(2):105-49.
- Capece ML, Baghdoyan HA, Lydic R. Carbachol stimulates [35S]guanylyl 5'-(gamma-thio)-triphosphate binding in rapid eye movement sleep-related brainstem nuclei of rat. *J Neurosci*. 1998. 18:3779-85.
- Celanire S, Wijtmans M, Talaga P, Leurs R, de Esch IJ. Keynote review: histamine H3 receptor antagonists reach out for the clinic. *Drug Discov Today*. 2005 .10(23-24):1613-27.
- Chase MH and Morales FR. The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annu Rev Psychol*. 1990.41:557-84.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M.

- Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 1999 .98(4):437-51.
- Connelly W.M., Shenton F.C., Lethbridge N., Leurs R., Waldvogel H.J, Faull R.L., Lees G, Chazot, P.L. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br. J. Pharmacol.* 2009., 157, 55–63.
- Crochet S and Sakai K. Effects of microdialysis application of monoamines on the EEG and behavioural states in the cat mesopontine tegmentum. *Eur J Neurosci*. 1999.11(10):3738-52.
- Crochet S, Onoe H, Sakai K. A potent non-monoaminergic paradoxical sleep inhibitory system: a reverse microdialysis and single-unit recording study. *Eur J Neurosci*. 2006 .24(5):1404-12.
- Davis H, Davis PA, Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. Changes in human brain potentials during the onset of sleep. *Science*. 1937 .86(2237):448-50.
- De Andrés I. Ciclo vigilia-sueño. *En: Manual de Neurociencia. Eds. J.M.Delgado, A. Ferrus, F.Mora y Fco.J. Rubio, Ed. Sintesis, Madrid 1998. pp:801-821.*
- De Andrés I, Garzón M, Reinoso-Suárez F. Functional Anatomy of Non-REM Sleep. *Front Neurol*. 2011.2:70.
- De La Roza C, Martínez-Mena J, Sánchez-Valle ME, Reinoso-Suárez F. Projections from the cat posterior lateral hypothalamus to the ventral part of the oral pontine reticular nucleus contain a GABAergic component. *Brain Res*. 2004. 1020(1-2):118-29.
- De La Roza C and Reinoso-Suárez F . Gabaergic structures in the ventral part of the oral pontine reticular nucleus: An ultrastructural immunogold analysis. *Neuroscience*. 2006. 142:1183-1193.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998.95(1):322-7.
- Del Cid-Pellitero E and Garzón M. Medial prefrontal cortex receives input from dorsal raphe nucleus neurons targeted by hypocretin1/orexinA-containing axons. *Neuroscience*. 2011a.172:30-43.
- Del Cid-Pellitero E and Garzón M. Hypocretin1/OrexinA-containing axons innervate locus coeruleus neurons that project to the Rat medial prefrontal cortex Implication in the sleep-wakefulness cycle and cortical activation. *Synapse*. 2011b. 65(9):843-57.
- Del Cid-Pellitero E and Garzón M. Hypocretin1/OrexinA axon targeting of laterodorsal tegmental nucleus neurons projecting to the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2011c .21(12):2762-73.
- Evans BK, Armstrong S, Singer G, Cook RD, Burnstock G. Intracranial injection of drugs: comparison of diffusion of 6-OHDA and guanethidine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1975.3(2):205-28.
- Freund N, Manns M, Rose J. A method for the evaluation of intracranial tetrodotoxin injections. *J Neurosci Methods*. 2010. .186(1):25-8.
- Garzón M. Estudio morfofuncional de los núcleos reticular oral y reticular caudal del tegmento pontino como regiones generadoras del sueño paradójico. *Tesis doctoral*. 1996. *Universidad Autónoma de Madrid*.



- Garzón M, de Andrés I, Reinoso-Suárez F. Neocortical and hippocampal electrical activities are similar in spontaneous and cholinergic-induced REM sleep. *Brain Res.* 1997 .766(1-2):266-70.
- Garzón M, De Andrés I, Reinoso-Suárez F. Sleep patterns after carbachol delivery in the ventral oral pontine tegmentum of the cat. *Neuroscience.* 1998 .83(4):1137-44.
- Gerashchenko D, Chou TC, Blanco-Centurion CA, Saper CB, Shiromani PJ. Effects of lesions of the histaminergic tuberomammillary nucleus on spontaneous sleep in rats. *Sleep.* 2004. 27(7):1275-81.
- Gerber U, Greene RW, McCarley RW. Repetitive firing properties of medial pontine reticular formation neurones of the rat recorded in vitro. *J Physiol.* 1989 .410:533-60.
- Gnadt JW and Pegram GV. Cholinergic brainstem mechanisms of REM sleep in the rat. *Brain Res.* 1986. 384:29-41.
- Gómez-Montoya J, Gutiérrez-Rivas E, de Andrés I, Reinoso-Suárez F. Alternance of states within the sleep wakefulness cycle .An approach to its study. *Rev Esp Fisiol.* 1978. *PubMed PMID: 741059.*
- Guo RX, Anaclet C, Roberts JC, Parmentier R, Zhang M, Guidon G, Buda C, Sastre JP, Feng JQ, Franco P, Brown SH, Upton N, Medhurst AD, Lin JS. Differential effects of acute and repeat dosing with the H3 antagonist GSK189254 on the sleep-wake cycle and narcoleptic episodes in Ox-/- mice. *Br J Pharmacol.* 2009 .157(1):104-17.
- Hancock AA, Esbenshade TA, Krueger KM, Yao BB. Genetic and pharmacological aspects of histamine H3 receptor heterogeneity. *Life Sci.* 2003 .73(24):3043-72.
- Hayaishi O and Huang ZL. Role of orexin and prostaglandin E(2) in activating histaminergic neurotransmission. *Drug News Perspect.* 2004 .17(2):105-9.
- Huang ZL, Mochizuki T, Qu WM, Hong ZY, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O. Altered sleep-wake characteristics and lack of arousal response to H3 receptor antagonist in histamine H1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. 103(12):4687-92.
- Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF (eds). "The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology, and technical specification," 1st Edn. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine. 2007.
- Ireland-Denny L, Parihar AS, Miller TR, Kang CH, Krueger KM, Esbenshade TA, Hancock AA. Species-related pharmacological heterogeneity of histamine H(3) receptors. *Eur J Pharmacol.* 2001 .433(2-3):141-50.
- Jones BE. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 .26(11):578-86.
- Jones BE. Neurobiology of waking and sleeping. *Handb Clin Neurol.* 2011;98:131-49.
- Jones BE and Beaudet A. Distribution of acetylcholine and catecholamine neurons in the cat brainstem: a choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 1987a. 261(1):15-32.
- Jones BL and Kearns GL. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther.* 2011. 89(2):189-97.
- Kilduff TS and Peyron C. The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends Neurosci.* 2000 .23(8):359-65. *PubMed PMID: 10906799.*

- Klocker J, Mätzler SA, Huetz GN, Drasche A, Kolbitsch C, Schwelberger HG. Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm Res.* 2005 .54 Suppl 1:S54-7.
- Koyama Y and Sakai K. Modulation of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons by acetylcholine and monoamines applied iontophoretically in unanesthetized cats. *Neuroscience.* 2000.96(4):723-33
- Krenzer M, Anacleit C, Vetrivelan R, Wang N, Vong L, Lowell BB, Fuller PM, Lu J. Brainstem and spinal cord circuitry regulating REM sleep and muscle atonia. *PLoS One.* 2011.6(10):e24998.
- Kubo N, Shirakawa O, Kuno T, Tanaka C. Antimuscarinic effects of antihistamines: quantitative evaluation by receptor-binding assay. *Jpn J Pharmacol.* 1987 .43(3):277-82.
- Lai YY, Clements JR, Wu XY, Shalita T, Wu JP, Kuo JS, Siegel JM. Brainstem projections to the ventromedial medulla in cat: retrograde transport horseradish peroxidase and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol.* 1999.408(3):419-36.
- Lakoski JM and Aghajanian GK. Effects of histamine, H1- and H2-receptor antagonists on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983 .227(2):517-23.
- Lazarov NE and Gratzl M. Selective expression of histamine receptors in rat mesencephalic trigeminal neurons. *Neurosci Lett.* 2006 .404(1-2):67-71.
- Lee KH, Broberger C, Kim U, McCormick DA. Histamine modulates thalamocortical activity by activating a chloride conductance in ferret perigeniculate neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 .101(17):6716-21.
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci.* 2005 .25(28):6716-20.
- Ligneau X, Landais L, Perrin D, Piriou J, Uguen M, Denis E, Robert P, Parmentier R, Anacleit C, Lin JS, Burbán A, Arrang JM, Schwartz JC. Brain histamine and schizophrenia: potential therapeutic applications of H3-receptor inverse agonists studied with BF2649. *Biochem Pharmacol.* 2007a .73(8):1215-24.
- Lin JS. Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. *Sleep Med Rev.* 2000 Oct;4(5):471-503.
- Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res.* 1989 .479(2):225-40
- Lin JS, Sakai K, Jouvet M. Hypothalamo-preoptic histaminergic projections in sleep-wake control in the cat. *Eur J Neurosci.* 1994 Apr 1;6(4):618-25.
- Lin JS, Hou Y, Sakai K, Jouvet M. Histaminergic descending inputs to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat. *J Neurosci.* 1996 .16(4):1523-37.
- Lin JS, Dauvilliers Y, Arnulf I, Bastuji H, Anacleit C, Parmentier R, Kocher L, Yanagisawa M, Leheret P, Ligneau X, Perrin D, Robert P, Roux M, Lecomte JM, Schwartz JC. An inverse agonist of the histamine H(3) receptor improves wakefulness in narcolepsy: studies in orexin-/- mice and patients. *Neurobiol Dis.* 2008 Apr;30(1):74-83.

- Lin JS, Anaclet C, Sergeeva OA, Haas HL. The waking brain: an update. *Cell Mol Life Sci.* 2011 .68(15):2499-512.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 1999 .98(3):365-76.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK .Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2001 .435(1):6-25.
- Manquillo A. Estudio de los mecanismos colinérgicos y gabaérgicos mediados por el tegmento pontino rostral en las fases del ciclo vigilia-sueño. *Tesis doctoral.* 2000. *Universidad Autónoma de Madrid.*
- Marzanatti M, Monopoli A, Trampus M, Ongini E. Effects of non-sedating histamine H1-antagonists on EEG activity and behavior in the cat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989 .32(4):861-6.
- Mignot E, Taheri S, Nishino S. Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat Neurosci.* 2002 .5 Suppl:1071-5.
- Monti JM. The role of tuberomammillary nucleus histaminergic neurons, and of their receptors, in the regulation of sleep and waking. In: Rapid Eye Movement Sleep. Regulation and Function. Mallick BN, Pandi-Perumal SR, McCarley RW, Morrison AR (Eds). *Cambridge University Press. Cambridge.* 2011. pp: 223-233.
- Monti JM, Pellejero T, Jantos H. Effects of H1- and H2-histamine receptor agonists and antagonists on sleep and wakefulness in the rat. *J Neural Transm.* 1986.66(1):1-11.
- Monti JM, Orellana C, Boussard M, Jantos H, Olivera S. Sleep variables are unaltered by zolantidine in rats: are histamine H2-receptors not involved in sleep regulation?. *Brain Res Bull.* 1990 .25(2):229-31.
- Moreno-Balandrán E, Garzón M, Bódalo C, Reinoso-Suárez F, de Andrés I. Sleep-wakefulness effects after microinjections of hypocretin 1 (orexin A) in cholinceptive areas of the cat oral pontine tegmentum. *Eur J Neurosci.* 2008 .28(2):331-41
- Moruzzi G and Magoun HW. Brain Stem Reticular Formation and Activación of EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 1949. 1: 455-473. Artículo reimpresso en: *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1995 .7(2):251-67
- McCarley RW and Hobson JA. Discharge patterns of cat pontine brain stem neurons during desynchronized sleep. *J Neurophysiol.* 1975.38(4):751-66.
- Nishino S, Sakurai E, Nevsimalova S, Yoshida Y, Watanabe T, Yanai K, Mignot E. Decreased CSF histamine in narcolepsy with and without low CSF hypocretin-1 in comparison to healthy controls. *Sleep.* 2009.32(2):175-80.
- Nuñez A, de Andrés I, García-Austt E. Relationships of nucleus reticularis pontis oralis neuronal discharge with sensory and carbachol evoked hippocampal theta rhythm. *Exp Brain Res.* 1991.87(2):303-8
- Nuñez A, De la Roza C, Rodrigo-Angulo ML, Buño W, Reinoso-Suárez F. Electrophysiological properties and cholinergic responses of rat ventral oral pontine reticular neurons in vitro. *Brain Res.* 1997 .754(1-2):1-11.

- Núñez A, Buño W, Reinoso-Suárez F. Neurotransmitter actions on oral pontine tegmental neurons of the rat: an in vitro study. *Brain Res.* 1998 .804(1):144-8. *PubMed PMID:* 9729346.
- Núñez A, Rodrigo-Angulo ML, De Andrés I, Reinoso-Suárez F. Firing activity and postsynaptic properties of morphologically identified neurons of ventral oral pontine reticular nucleus. *Neuroscience.* 2002.115(4):1165-75.
- Núñez A and Amzica F. The mechanisms behind the generation of the slow oscillations found in EEG recordings during sleep. *Rev Neurol.* 2004 .39(7):628-33.
- Núñez A, Moreno-Balandrán ME, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M, De Andrés I. Relationship between the perifornical hypothalamic area and oral pontine reticular nucleus in the rat. Possible implication of the hypocretinergic projection in the control of rapid eye movement sleep. *Eur J Neurosci.* 2006 Nov;24(10):2834-42.
- Oishi Y, Huang ZL, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O. Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A1 receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. 105(50):19992-7.
- Ono K, Shishido Y, Park HK, Kawazoe T, Iwana S, Chung SP, Abou El-Magd RM, Yorita K, Okano M, Watanabe T, Sano N, Bando Y, Arima K, Sakai T, Fukui K. Potential pathophysiological role of D-amino acid oxidase in schizophrenia: immunohistochemical and in situ hybridization study of the expression in human and rat brain. *J Neural Transm.* 2009 .116(10):1335-47.
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience.* 1989.28(3):585-610.
- Parmentier R, Ohtsu H, Djebbara-Hannas Z, Valatx JL, Watanabe T, Lin JS. Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *J Neurosci.* 2002 .22(17):7695-711.
- Parsons ME and Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2006 .147 Suppl 1:S127-35.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.* 1998. 18(23):9996-10015.
- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM. A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience.* 2002.114(1):173-93.
- Próspero García O and Drucker Colín R. Control neural del ciclo vigilia-sueño: mecanismos neurofisiológicos y neuroquímicos. Factores inductores del sueño. En: Sueño y procesos cognitivos. Ramos Platón MJ (Ed). Editorial Síntesis S.A. Madrid. 1996. pp:131-160.
- Quattrochi JJ and Hobson JA. Carbachol microinjection into the caudal peribrachial area induces long-term enhancement of PGO wave activity but not REM sleep. *J Sleep Res.* 1999. 8(4):281-90.
- Ramos Platón MJ. El sueño normal. En: Sueño y procesos cognitivos. Ramos Platón MJ (Ed). Editorial Síntesis S.A. Madrid. 1996a. pp:21-55.

- Ramos Platón MJ. Funciones del sueño. En: Sueño y procesos cognitivos. Ramos Platón MJ (Ed). Editorial Síntesis S.A. Madrid. 1996b. pp:79-101.
- Reinoso-Suárez F. Topographischer Hirnatlas der Katze für experimental-physiologische Untersuchungen. In: Darmstadt. E. Merck AG. 1961
- Reinoso-Suárez F. Neurobiología del sueño. *Rev. Med. Universidad de Navarra*. 2005. 49:8-17.
- Reinoso-Suárez F, Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E and de Andrés I. Thalamic connections of the enhancement of paradoxical sleep signs. In: The Diencephalon and Sleep. M. Mancía and G. Marini (Eds). Raven Press. New York. 1990. pp. 49-63.
- Reinoso-Suárez F, De Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E. Location and anatomical connections of a paradoxical sleep induction site in the cat ventral pontine tegmentum. *Eur J Neurosci*. 1994.6(12):1829-36.
- Reinoso-Suárez F, de Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M. Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep. *Sleep Med Rev*. 2001.5(1):63-77.
- Reinoso-Suárez F, De La Roza C, Rodrigo-Angulo ML, De Andrés I, Núñez A, Garzón M.. GABAergic mechanisms in the ventral oral pontine tegmentum —the REM sleep induction site— in the modulation of sleep-wake states. In: *GABA and Sleep*. Monti JM, Pandi-Perumal SR and Möhler H( Eds). Springer, Basel. 2010. pp. 233-252.
- Reinoso-Suárez F, de Andrés I, Garzón M. Functional anatomy of the sleep-wakefulness cycle: wakefulness. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2011.208:1-128.
- Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E, Reinoso-Suárez F. Serotonergic connections to the ventral oral pontine reticular nucleus: implication in paradoxical sleep modulation. *J Comp Neurol*. 2000.418(1):93-105.
- Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E, Reinoso-Suárez F. A quantitative study of the brainstem cholinergic projections to the ventral part of the oral pontine reticular nucleus (REM sleep induction site) in the cat. *Exp Brain Res*. 2005.160(3):334-43.
- Rodrigo-Angulo ML, Heredero S, Rodríguez-Veiga E, Reinoso-Suárez F. GABAergic and non-GABAergic thalamic, hypothalamic and basal forebrain projections to the ventral oral pontine reticular nucleus: their implication in REM sleep modulation. *Brain Res*. 2008.1210:116-25.
- Rojas-Zamorano JA, Esqueda-Leon E, Jimenez-Anguiano A, Cintra-McGlone L, Mendoza Melendez MA, Velazquez Moctezuma J. The H1 histamine receptor blocker, chlorpheniramine, completely prevents the increase in REM sleep induced by immobilization stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009.91(3):291-4.
- Sakai K. Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. In: Brain Mechanisms of Sleep. McGinty DJ, Drucker-Colín R, Morrison A and Parmeggiani P.L (Eds). Raven Press. New York. 1985. pp:111-137
- Sakai K. Physiological properties and afferent connection of the locus coeruleus and adjacent tegmental neurons involved in the generation of paradoxical sleep in the cat. In: *Neurobiology of the locus coeruleus*. Barnes CD and Pompeiano O (Eds). Progress in Brain Research. 1991. Vol 88:31-48

- Sakai K and Koyama Y. *Are there cholinergic and non-cholinergic PS-on neurons in the pons?: a microiontophoretic study in unanesthetized cats. In: Sleep Research. Chase MH, Roth T and O'Connor C (Eds). Los Angeles: Brain Information Service/Brain Research Institute. UCLA. 1995. Vol: 24A, pp: 148*
- Sanford LD, Tang X, Xiao J, Ross RJ, Morrison AR. GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *J Neurophysiol.* 2003.90(2):938-45.
- Sasabe J, Miyoshi Y, Suzuki M, Mita M, Konno R, Matsuoka M, Hamase K, Aiso S. D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 10;109(2):627-32. PubMed PMID: 22203986; PubMed Central.
- Scammell TE and Mochizuki T. Is low histamine a fundamental cause of sleepiness in narcolepsy and idiopathic hypersomnia?. *Sleep.* 2009 .32(2):133-4
- Seeger C,Christopeit T, Fuchs K, Grote K, Sieghart W, Danielson UH. Histaminergic pharmacology of homo-oligomeric  $\beta_3$   $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors characterized by surface plasmon resonance biosensor technology. *Biochem Pharmacol.* 2012. 84(3):341-51.
- Semba K. Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1993 .330(4):543-56.
- Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci.* 1998 .18(12):4705-21.
- Shigemoto Y, Shinomiya K, Mio M, Azuma N, Kamei C. Effects of second-generation histamine H1 receptor antagonists on the sleep-wakefulness cycle in rats. *Eur J Pharmacol.* 2004 .494(2-3):161-5.
- Soya A, Song YH, Kodama T, Honda Y, Fujiki N, Nishino S. CSF histamine levels in rats reflect the central histamine neurotransmission. *Neurosci Lett.* 2008 .430(3):224-9.
- Stahl SM. Selective histamine H1 antagonism: novel hypnotic and pharmacologic actions challenge classical notions of antihistamines. *CNS Spectr.* 2008 .13(12):1027-38.
- Steriade M and McCarley RW. *Brainstem control of wakefulness and sleep. Plenum, New York. 1990.*
- Strecker RE, Nalwalk J, Dauphin LJ, Thakkar MM, Chen Y, Ramesh V, Hough LB, McCarley RW. Extracellular histamine levels in the feline preoptic/anterior hypothalamic area during natural sleep-wakefulness and prolonged wakefulness: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience.* 2002.113(3):663-70.
- Takahashi K, Lin JS, Sakai K. Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci.* 2006.26(40):10292-8.
- Thakkar MM. Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep Med Rev.* 2011.15(1):65-74.
- Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot PL, Passani MB. Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neurosci Ther.* 2011 .17(6):620-8.
- Tokunaga S, Tsutsui R, Obara Y, Ishida T, Kamei C. Effects of histamine H1-antagonists on sleep-awake state in rats placed on a grid suspended over water or on sawdust. *Biol Pharm Bull.* 2009 .32(1):51-4.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.* 1998 .438(1-2):71-5.

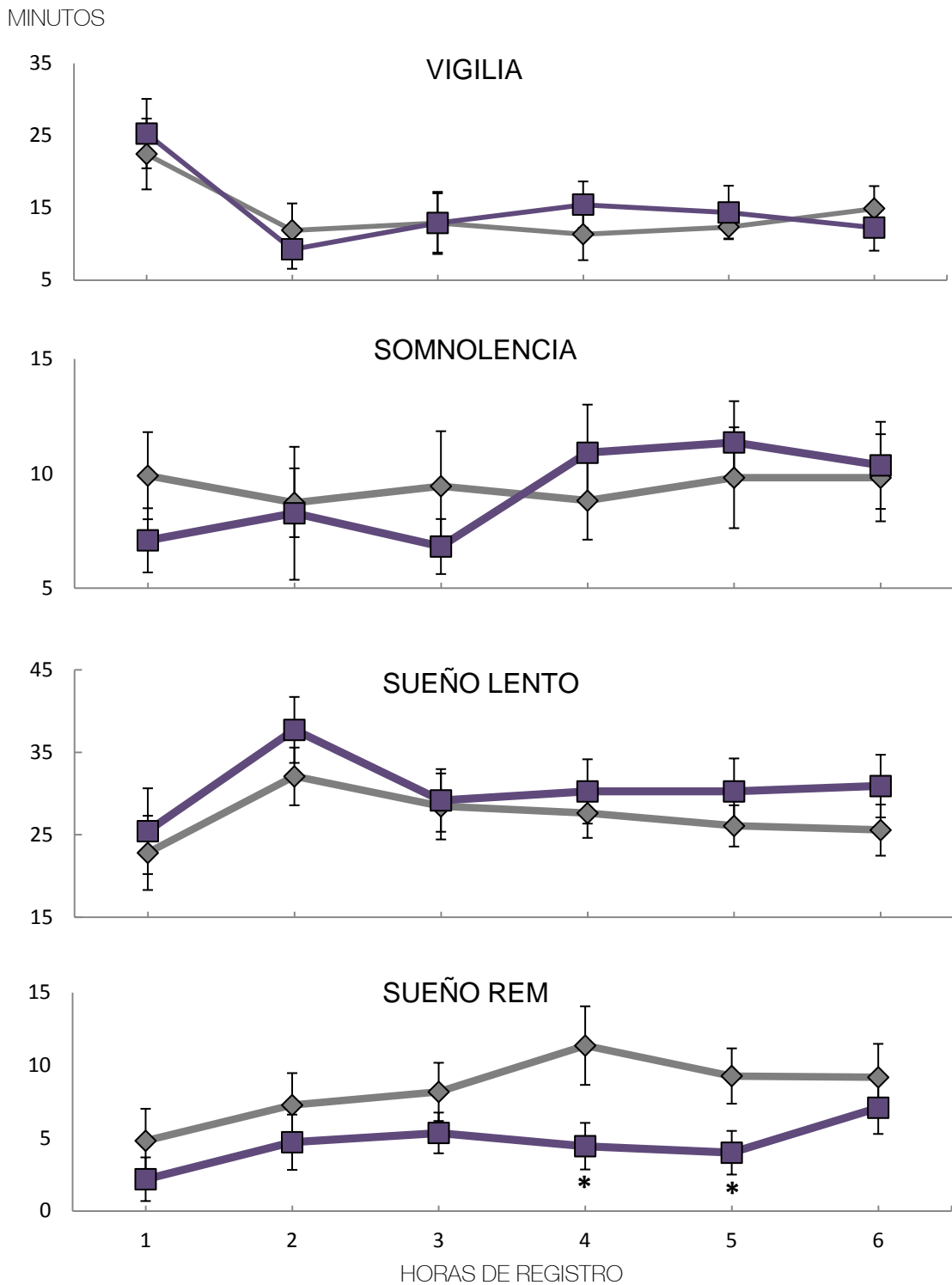
- Tunncliff G. Pharmacology and function of imidazole 4-acetic acid in brain. *Gen Pharmacol.* 1998 .31(4):503-9.
- Umehara H, Mizuguchi H, Fukui H. Identification of a histaminergic circuit in the caudal hypothalamus: an evidence for functional heterogeneity of histaminergic neurons. *Neurochem Int.* 2012 .61(6):942-7.
- Ursin R. and Serman M.B. A manual for standardized scoring of sleep and waking states in the adult cat. *Los Angeles: Brain Information Service/Brain Research Institute.* 1981.
- Valdés JL, Sánchez C, Riveros ME, Blandina P, Contreras M, Farías P, Torrealba F. The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *Eur J Neurosci.* 2010 .31(11):2073-85.
- Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M. Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol.* 1989 .127(3):133-64.
- Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M. Carbachol microinjections in the mediodorsal pontine tegmentum are unable to induce paradoxical sleep after caudal pontine and prebulbar transections in the cat. *Neurosci Lett.* 1991 .130(1):41-5.
- Vanni-Mercier G, Gigout S, Debilly G, Lin JS. Waking selective neurons in the posterior hypothalamus and their response to histamine H3-receptor ligands: an electrophysiological study in freely moving cats. *Behav Brain Res.* 2003 .144(1-2):227-41.
- Vertes RP. Hippocampal theta rhythm of REM sleep. In: Rapid Eye Movement Sleep.Regulation and Function. Mallick BN, Pandi-Perumal SR, McCarley RW, Morrison AR (Eds).*Cambridge University Press. Cambridge.* 2011. pp: 151-163.
- Vizuete ML, Traiffort E, Bouthenet ML, Ruat M, Souil E, Tardivel-Lacombe J, Schwartz JC. Detailed mapping of the histamine H2 receptor and its gene transcripts in guinea-pig brain. *Neuroscience.* 1997 .80(2):321-43.
- Waldmeier PC. Amine oxidases and their endogenous substrates (with special reference to monoamine oxidase and the brain). *J Neural Transm Suppl.* 1987.23:55-72.
- Wauquier A, Van den Broeck WA, Awouters F, Janssen PA. A comparison between astemizole and other antihistamines on sleep-wakefulness cycles in dogs. *Neuropharmacology.* 1981.20(9):853-9.
- Zarranz J and Reinoso-Suárez F. The pontine tegmentum and sleep-wakefulness states. *XXV Internat Cong Physiol Sci, Munich.* 1971. pp 618

## Anexo (figuras)

---



## Administración de pirilamina i.p -Tiempo de permanencia



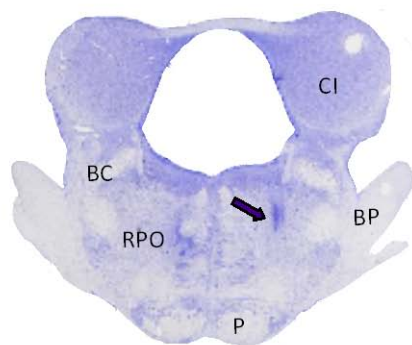
**Figura 1<sub>R</sub>**- Tiempo de permanencia (en minutos) en cada uno de los estados del CVS para los registros control (en línea gris) y tras la administración i.p de pirilamina (en línea morada) en cada una de las seis horas de registro.

\* Analisis post-hoc (Test de Fisher,  $p \leq 0.05$ )

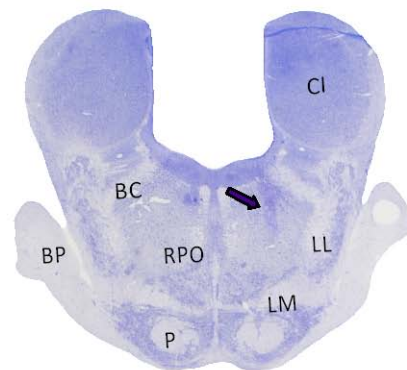


## Grupo I (TPD)- Localización de inyecciones

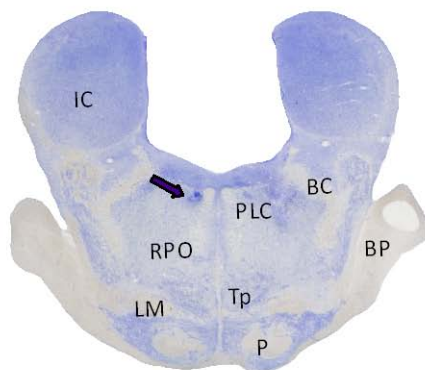
---



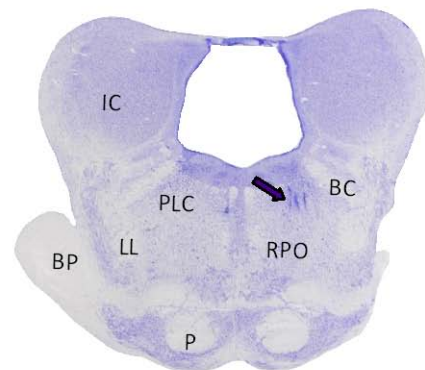
Gato-5



Gato-10



Gato-10

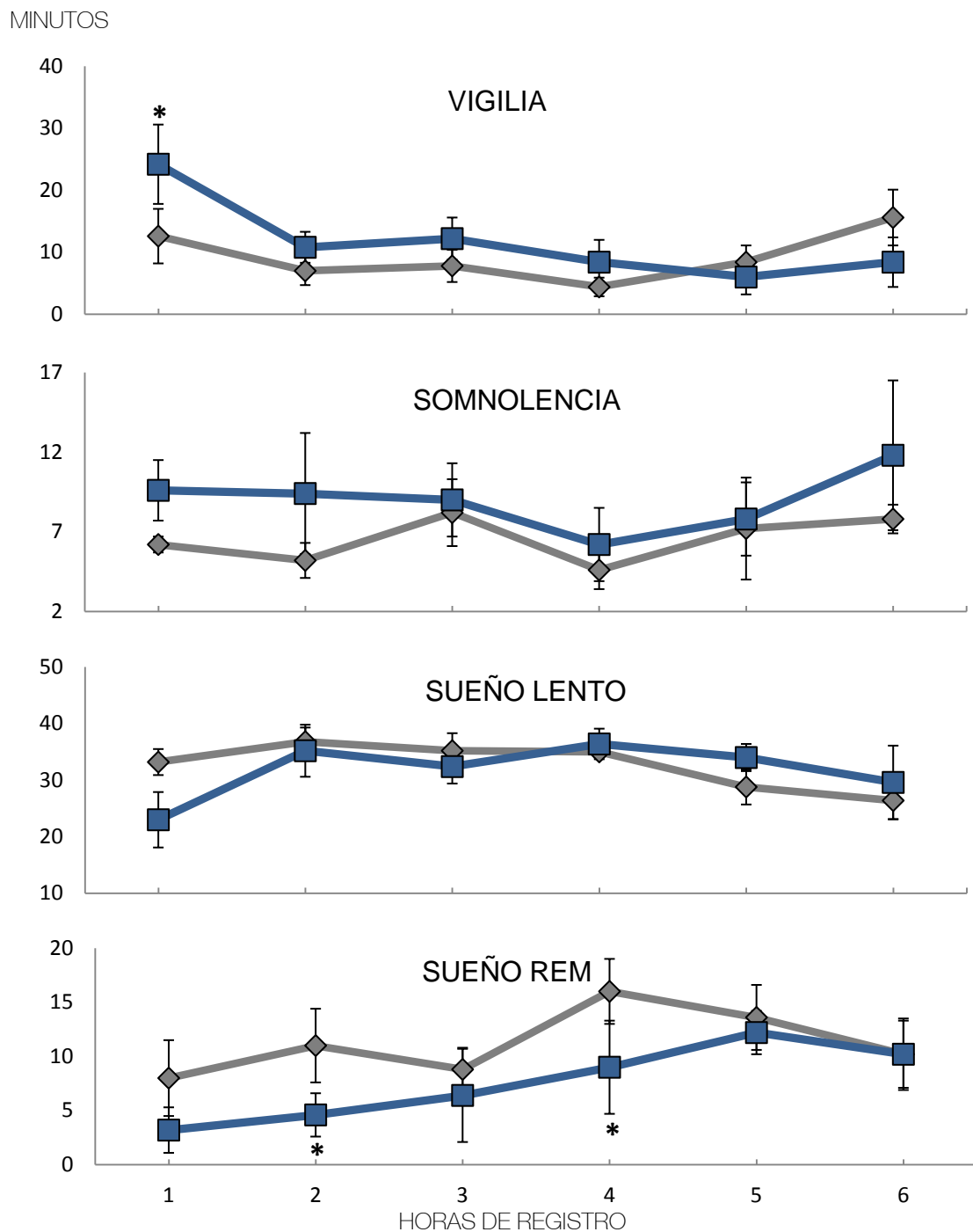


Gato-4

**Figura 2<sub>R</sub>**- Cortes histológicos teñidos con la tinción de Nissl donde se muestra la localización de las microinyecciones (flechas) en los animales del grupo I (TPD).

## GRUPO I (TPD) -Tiempo de permanencia

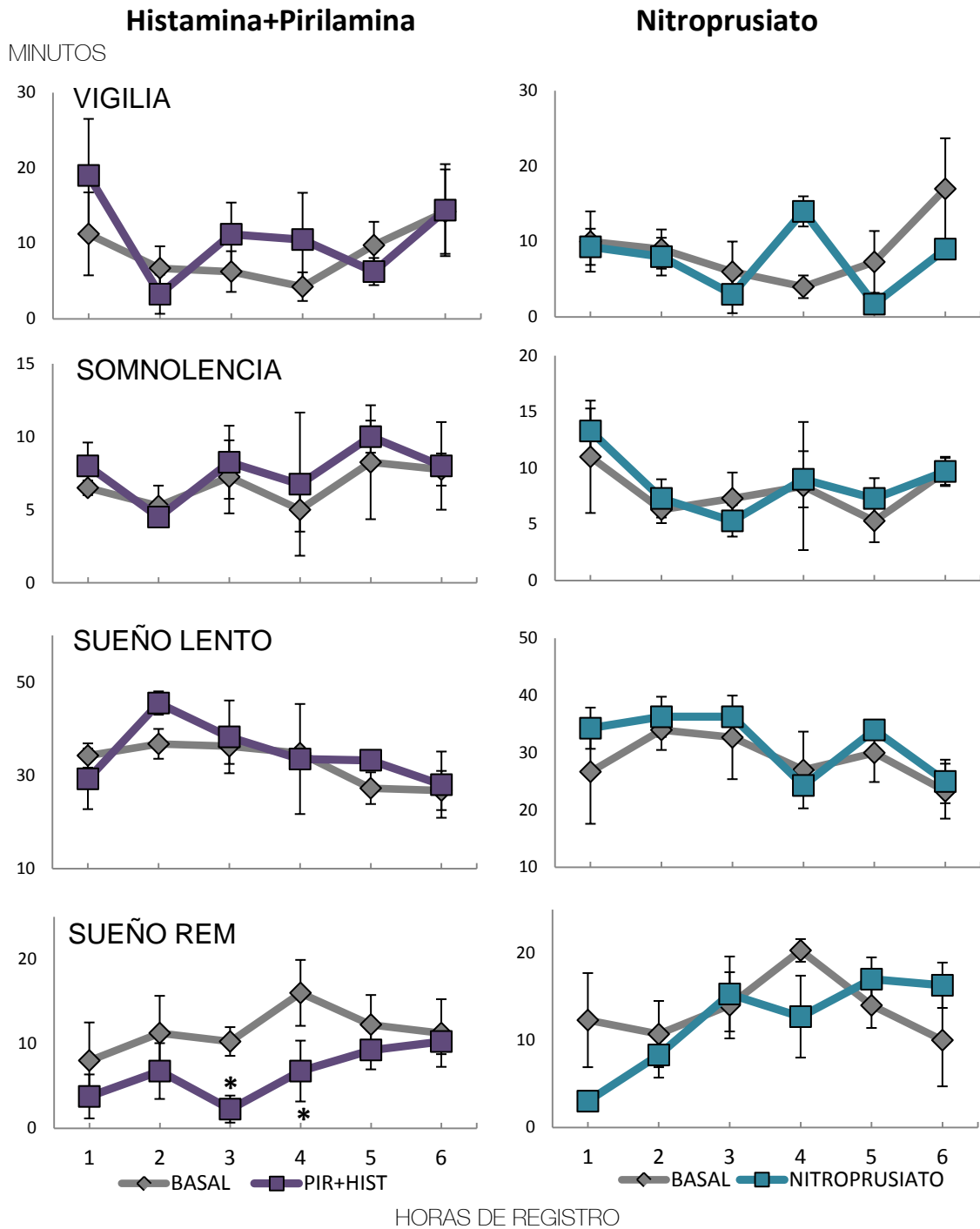
### Aplicación de histamina



**Figura 3<sub>R</sub>**- Tiempo de permanencia  $\pm$  error estándar (en minutos) en cada uno de los estados del CVS para los registros basales (línea gris) y tras la administración de histamina i.c. (línea azul) en los animales cuyas inyecciones se realizaron en la región dorsal del tegmento pontino oral (Grupo I).

\* Análisis post-hoc (Test de Fisher,  $p \leq 0.05$ )

## GRUPO I (TPD) - Tiempo de permanencia

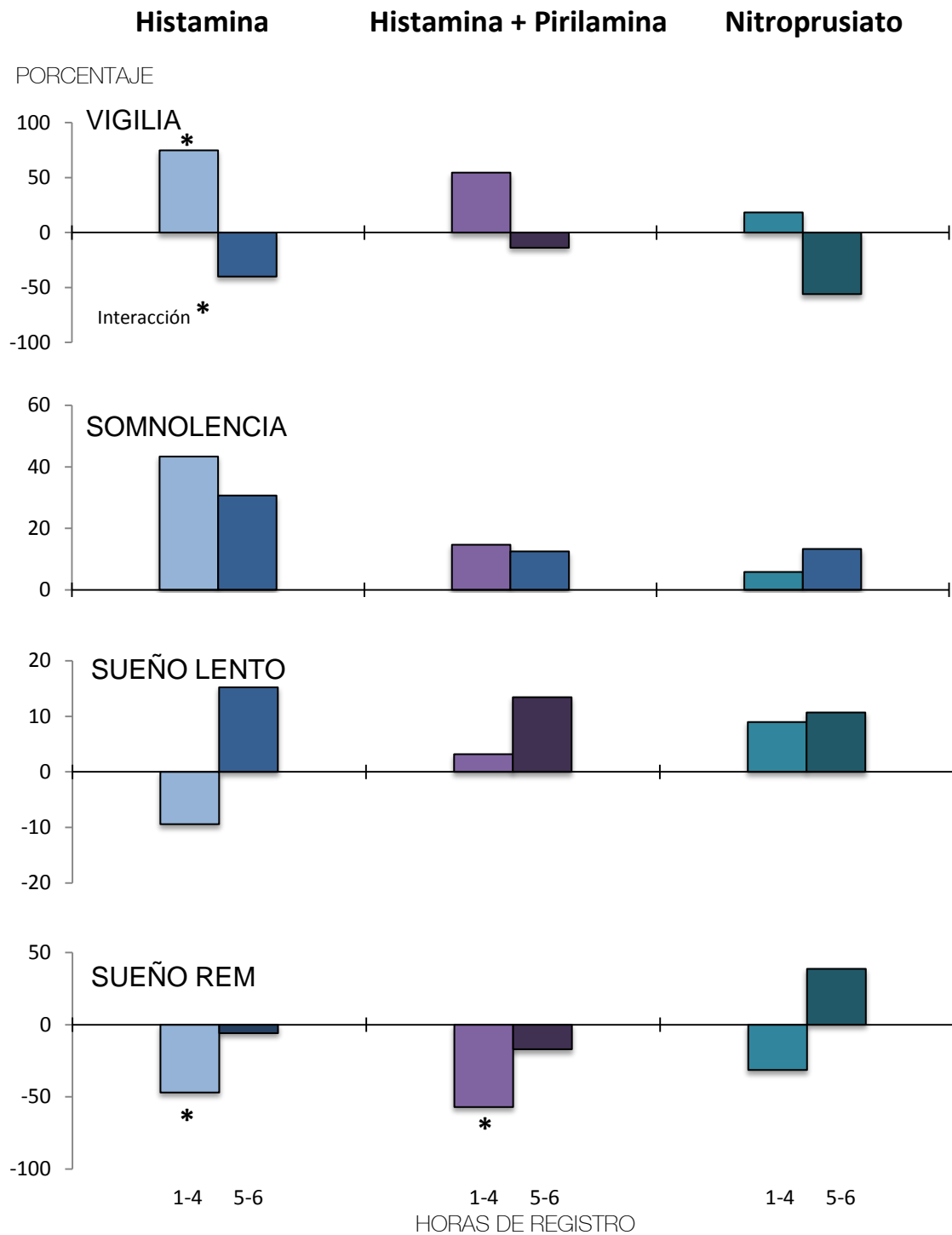


**Figura 4<sub>R</sub>**- Tiempo de permanencia  $\pm$  error estándar (en minutos) en cada uno de los estados del CVS en los registros basales (líneas grises) y tras la administración de histamina (i.c.)+ pirilamina (i.p.) y de nitroprusiato (i.c.) para las seis horas de registro en los animales cuyas inyecciones se realizaron en la región dorsal del tegmento pontino oral (Grupo I).

\* Análisis post-hoc ( $p \leq 0.05$ )

## GRUPO I (TPD) -Tiempo de permanencia

Datos agrupados por horas



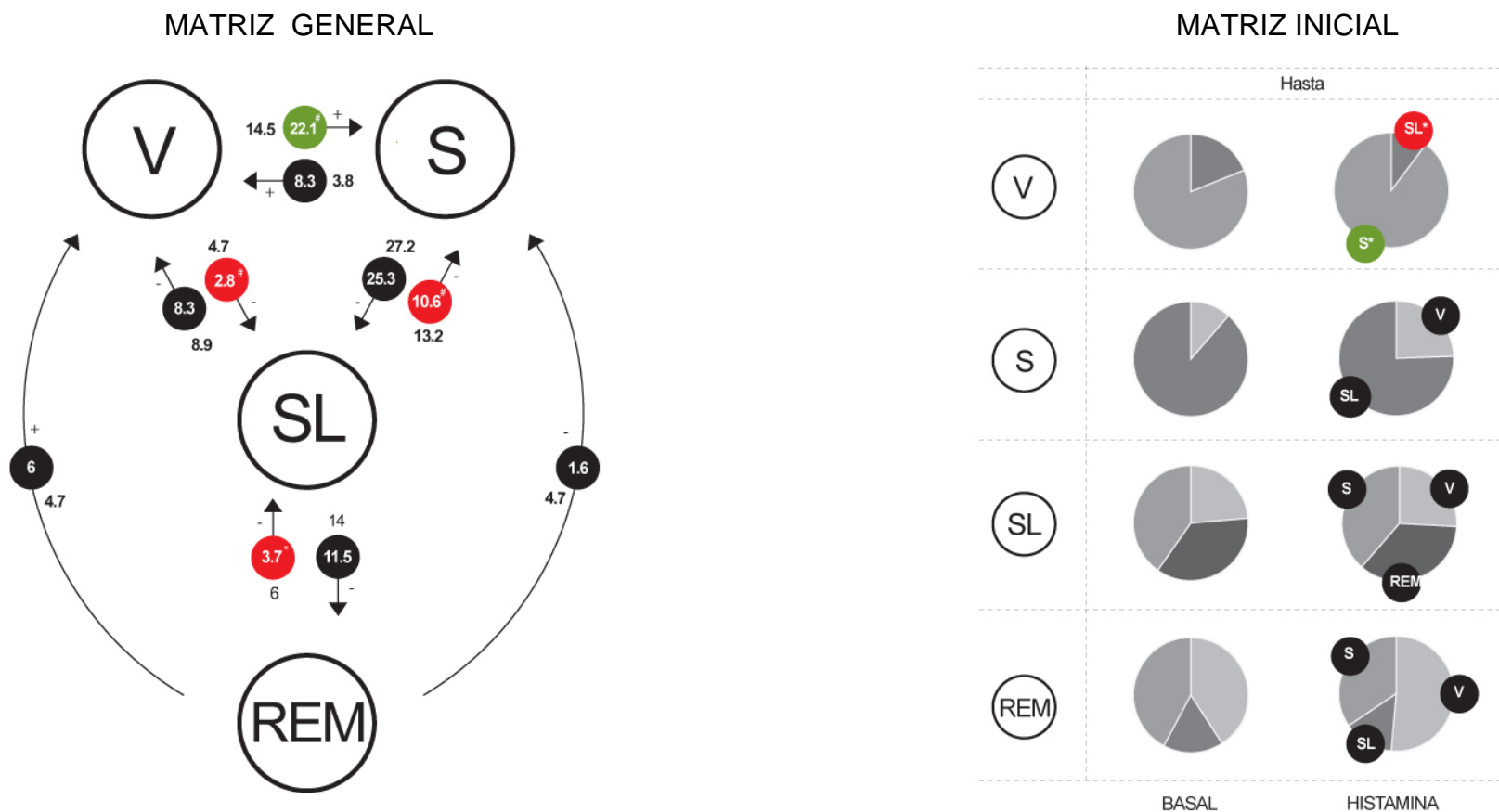
**Figura 5R.** Tiempo de permanencia en porcentaje de incremento/descenso con respecto a los valores basales para los distintos tratamientos administrados en la región dorsal del tegmento pontino (Grupo I) con los datos agrupados para las primeras cuatro horas de registro (1-4) y para las dos últimas (5-6).

\*Diferencia significativa con respecto a los basales ( $p \leq 0.05$ )



## GRUPO I (TPD) –Arquitectura del CVS

### Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS para el periodo de 1-4 horas

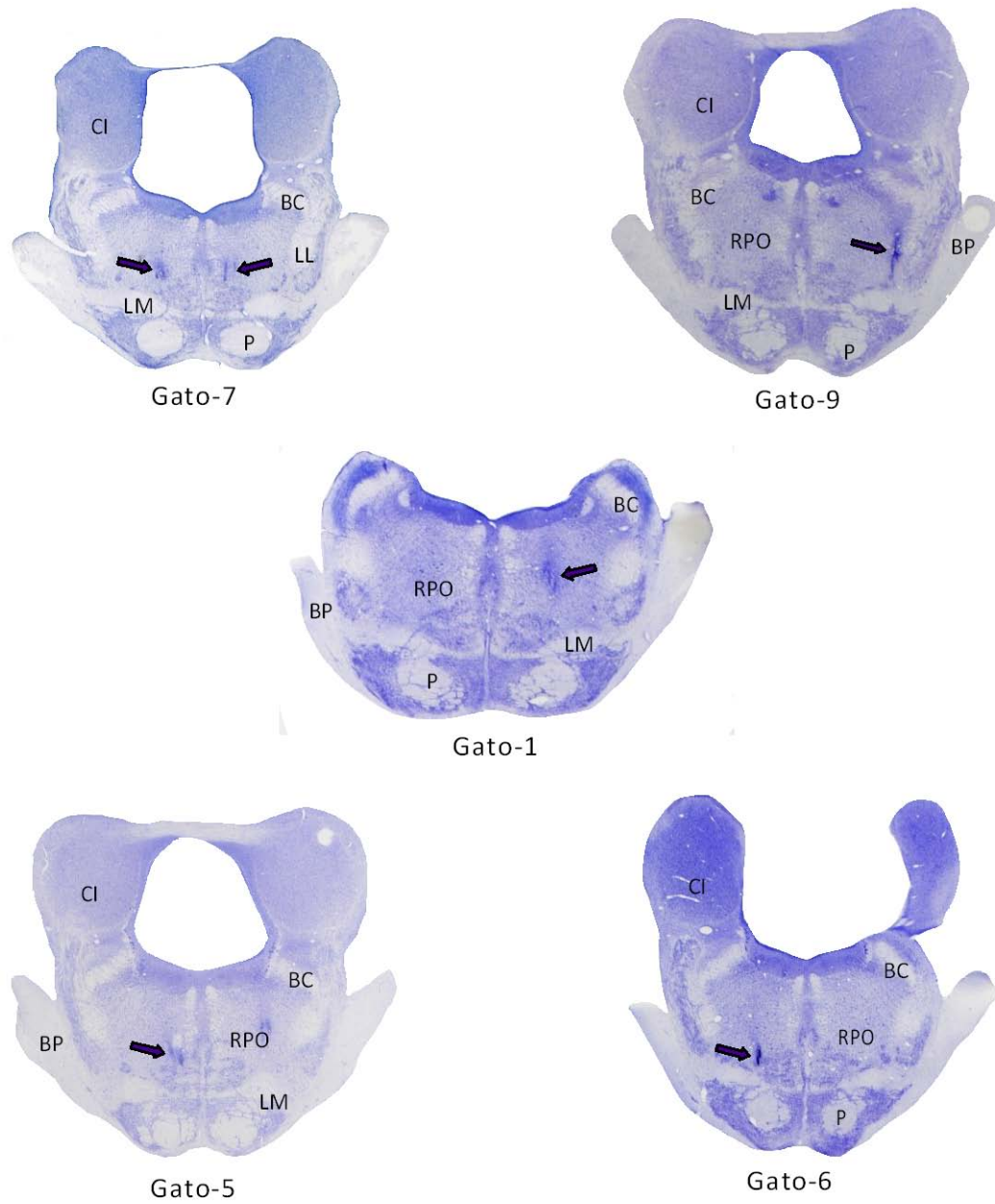


**Fig. 6<sub>R</sub>.** Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la aplicación de histamina en los animales del Grupo I (TPD) para las cuatro primeras horas de registro agrupadas. . La matriz general representa el porcentaje de cada transición con respecto al nº total de transiciones ocurridas en condiciones basales (fuera de los círculos) y tras la aplicación de histamina (dentro de los círculos). Los signos representan si este nº de transiciones aumento (+) o disminuyo (-) en valor absoluto. La matriz inicial representa el porcentaje que desde un estado concreto del CVS se produce a los otros del CVS. Los colores rojos indican descensos y los verdes indican aumentos significativos (\* $p \leq 0.05$ ) o cercanos a la significación (# $p \leq 0.1$ ) estadística tras la aplicación de histamina con respecto a los valores basales.



## Grupo II (vRPO)- Localización de inyecciones

---

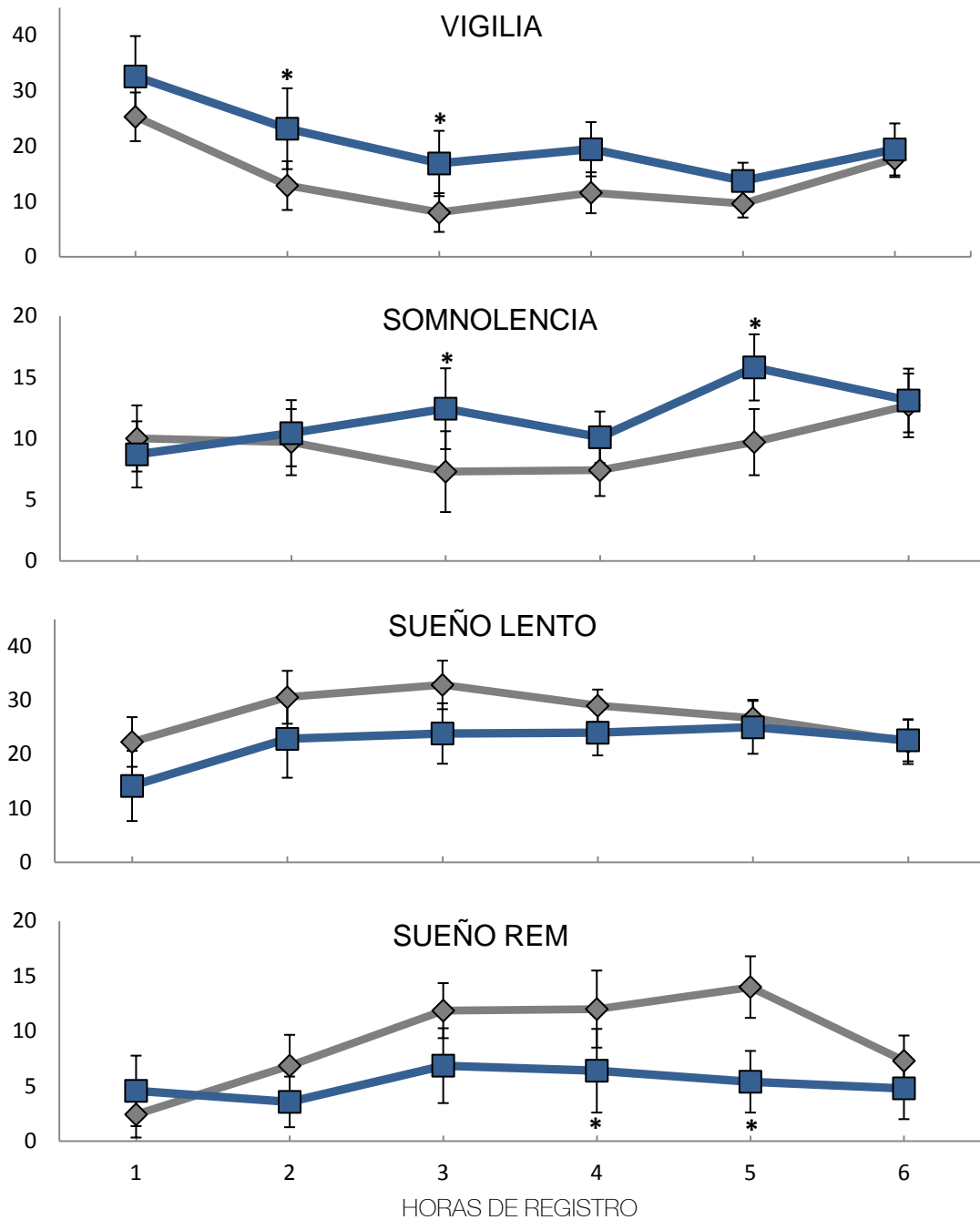


**Figura 7<sub>R</sub>**- Cortes histológicas teñidas con la tinción de Nissl donde se muestra la localización de las microinyecciones (flechas) en los animales del grupo II (vRPO).

## GRUPO II (vRPO) – Tiempo de permanencia

### Aplicación de histamina

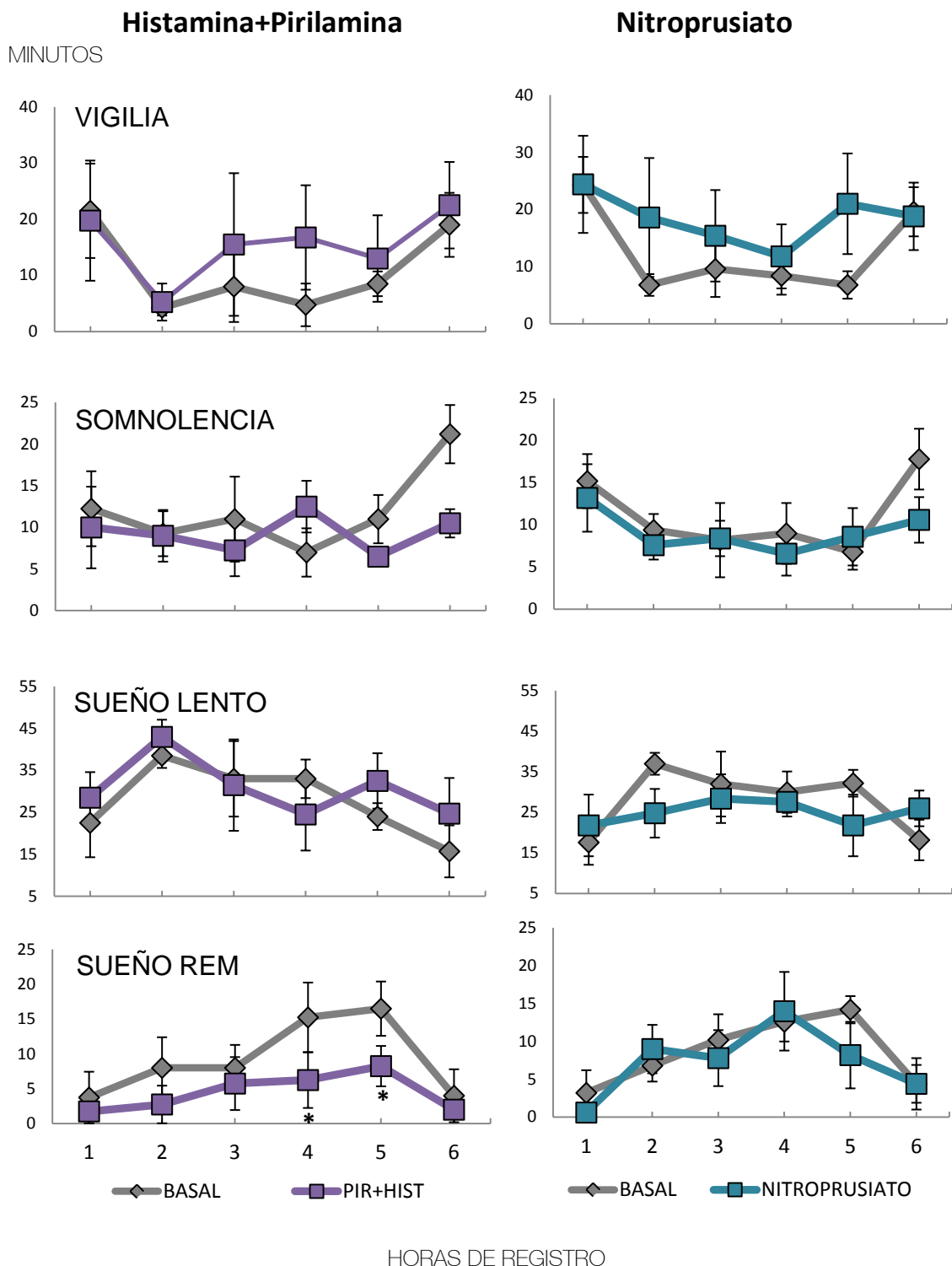
MINUTOS



**Figura 8<sub>R</sub>.**- Tiempo de permanencia  $\pm$  error estándar (en minutos) en cada uno de los estados del CVS para los registros basales (línea gris) y tras la administración de histamina i.c (línea azul) en los animales cuyas inyecciones se realizaron en la región ventral del tegmento pontino oral (grupo II).

\* Análisis post-hoc (Test de Fisher,  $p \leq 0.05$ )

## GRUPO II (vRPO) - Tiempo de permanencia

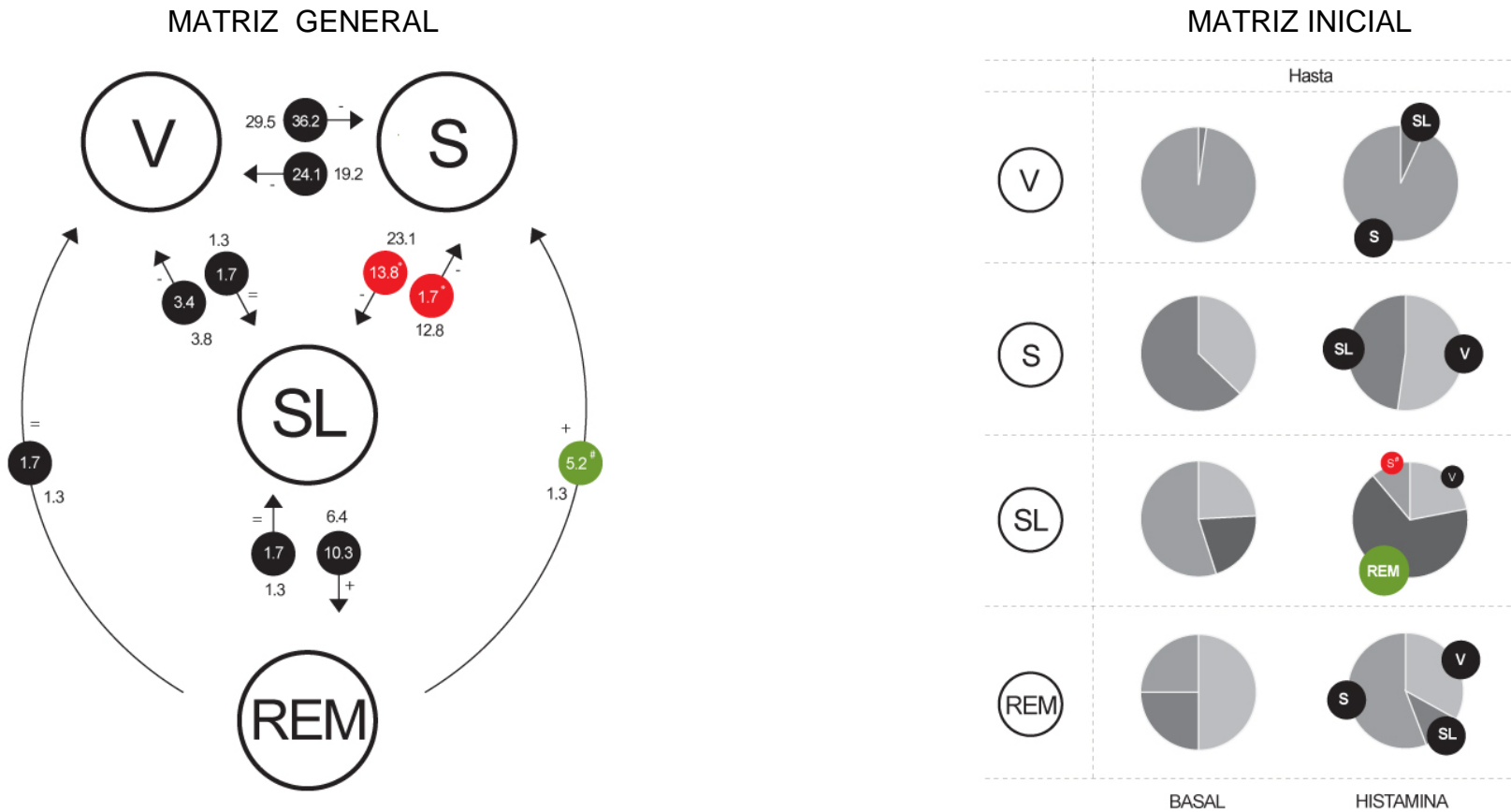


**Figura 9<sub>R</sub>.**- Tiempo de permanencia  $\pm$  error estándar (en minutos) en cada uno de los estados del CVS en los registros basales (líneas grises) y tras la administración de histamina (i.c.)+ pirilamina (i.p.) y de nitroprusiato (i.c.) para las seis horas de registro en los animales cuyas inyecciones se realizaron en la región ventral del tegmento pontino oral (Grupo II).

\* Análisis post-hoc ( $p < 0.05$ )

## GRUPO II (vRPO) –Arquitectura del CVS

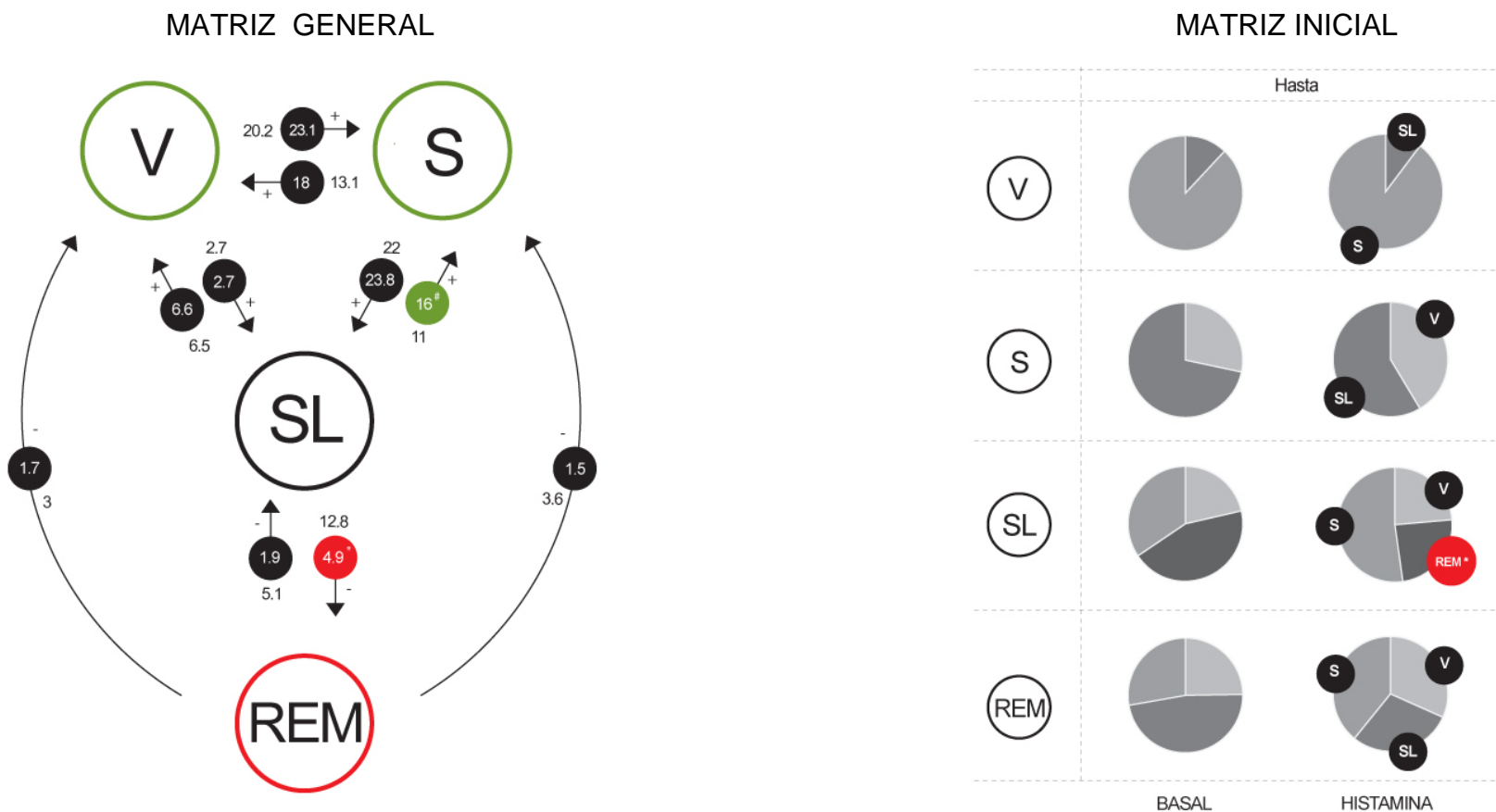
### Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS para la 1ª hora de registro



**Fig.10<sub>R</sub>**. Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la aplicación de histamina en los animales del Grupo II (vRPO) para la 1ª hora de registro. . La matriz general representa el porcentaje de cada transición con respecto al nº total de transiciones ocurridas en condiciones basales (fuera de los círculos) y tras la aplicación de histamina (dentro de los círculos). Los signos representan si este nº de transiciones aumento (+) o disminuyo (-) en valor absoluto. La matriz inicial representa el porcentaje que desde un estado concreto del CVS se produce a los otros del CVS. Los colores rojos indican descensos y los verdes indican aumentos significativos (\* $p \leq 0.05$ ) o cercanos a la significación (# $p \leq 0.1$ ) estadística tras la aplicación de histamina con respecto a los valores basales.

## GRUPO II (vRPO) –Arquitectura del CVS

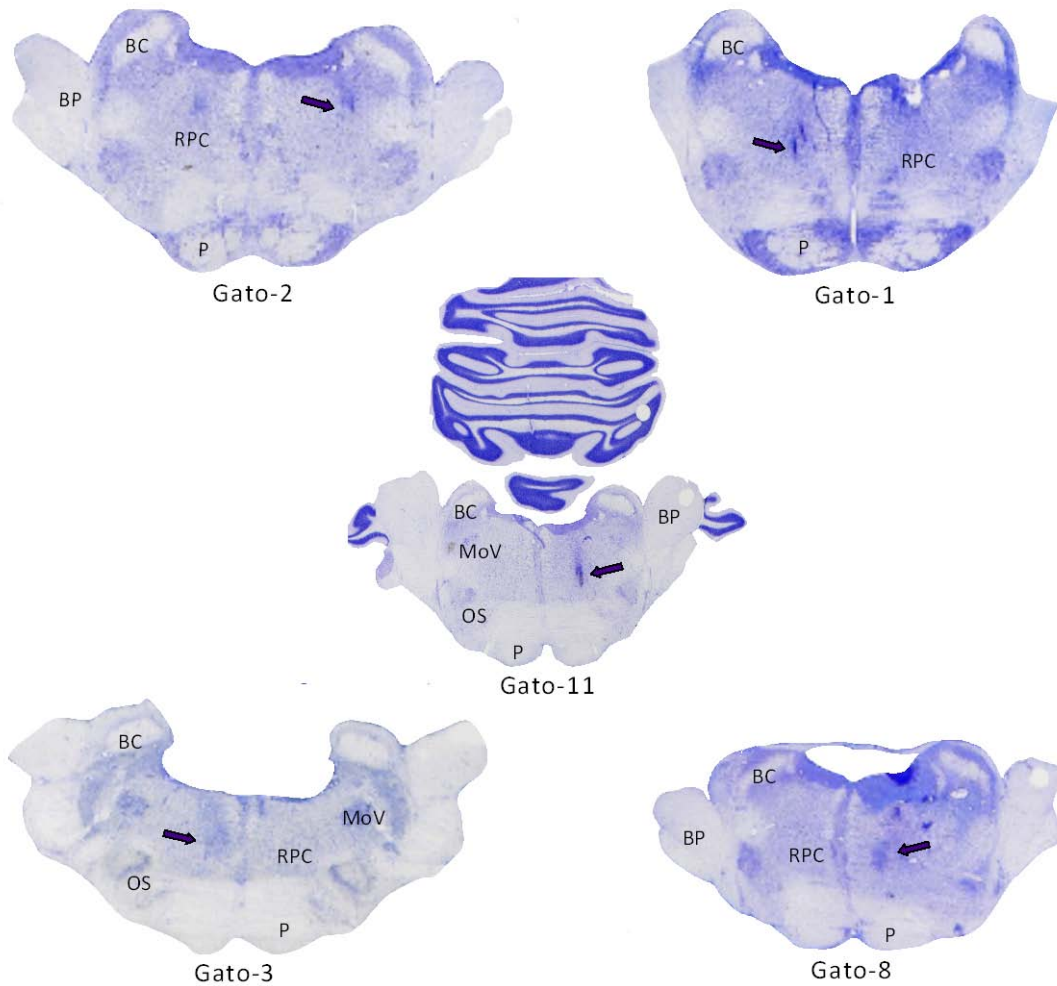
### Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS para la 2ª-5ª hora de registro



**Fig.11<sub>r</sub>**. Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la aplicación de histamina en los animales del Grupo II (vRPO) para el total de la 2ª a la 5ª hora de registro agrupadas. La matriz general representa el porcentaje de cada transición con respecto al nº total de transiciones ocurridas en condiciones basales (fuera de los círculos) y tras la aplicación de histamina (dentro de los círculos). Los signos representan si este nº de transiciones aumento (+) o disminuyo (-) en valor absoluto. La matriz inicial representa el porcentaje que desde un estado concreto del CVS se produce a los otros del CVS. Los colores rojos indican descensos y los verdes indican aumentos significativos (\*p<0.05) o cercanos a la significación (#p<0.1) estadística tras la aplicación de histamina con respecto a los valores basales.

## Grupo III (RPC)- Localización de inyecciones

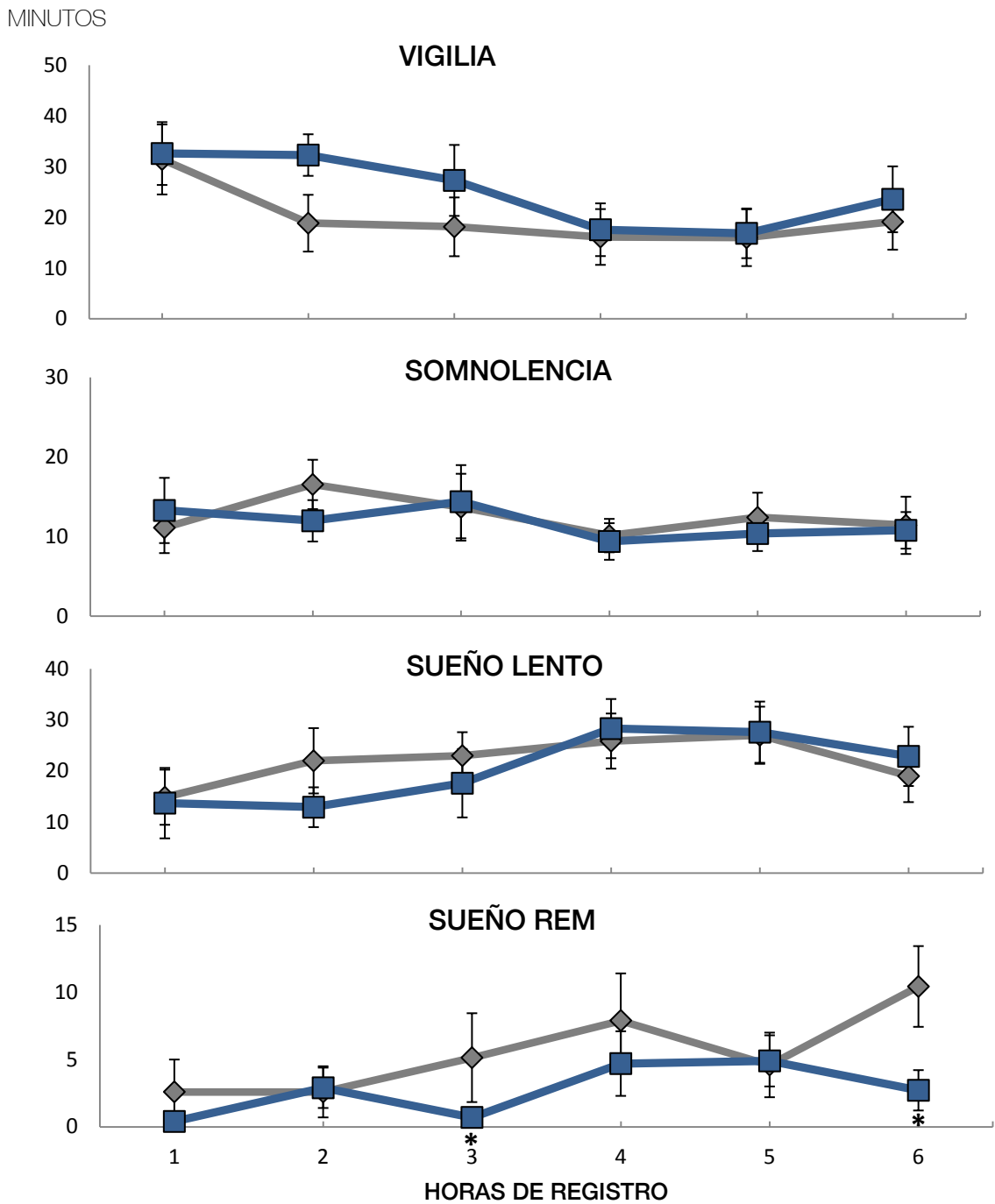
---



**Figura 12<sub>R</sub>.**- Cortes histológicos teñidos con la tinción de Nissl donde se muestra la localización de las microinyecciones (flechas) en los animales del grupo III (RPC).

## Grupo III (RPC)-Tiempo de permanencia

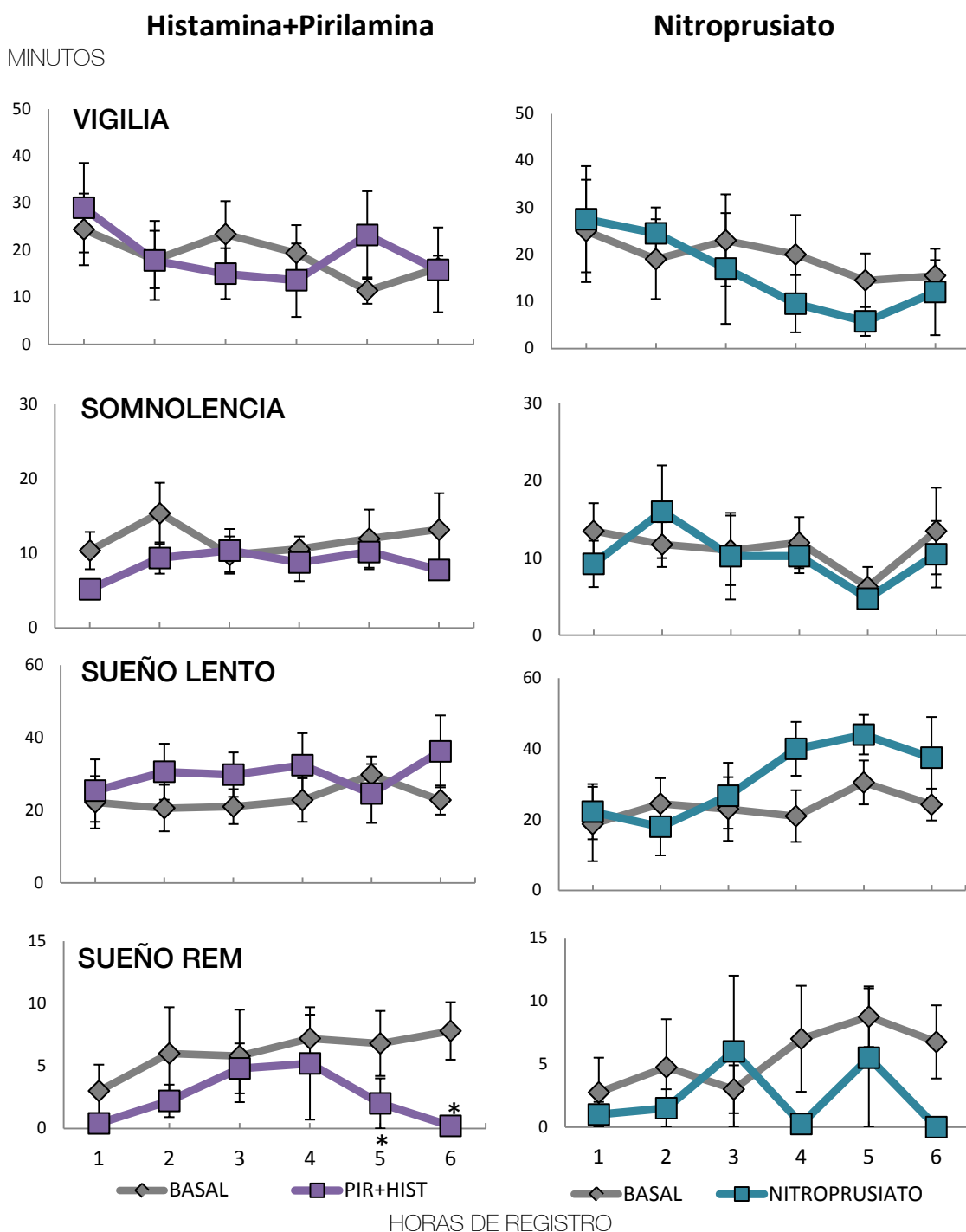
### Aplicación de histamina



**Figura 13<sub>R</sub>**.- Tiempo de permanencia  $\pm$  error estándar (en minutos) en cada uno de los estados del CVS para los registros basales (línea gris) y tras la administración de histamina i.c. (línea azul) en los animales cuyas inyecciones se realizaron en la región caudal del tegmento pontino (Grupo III).

\* Análisis post-hoc (Test de Fisher,  $p \leq 0.05$ )

## GRUPO III (RPC) - Tiempo de permanencia



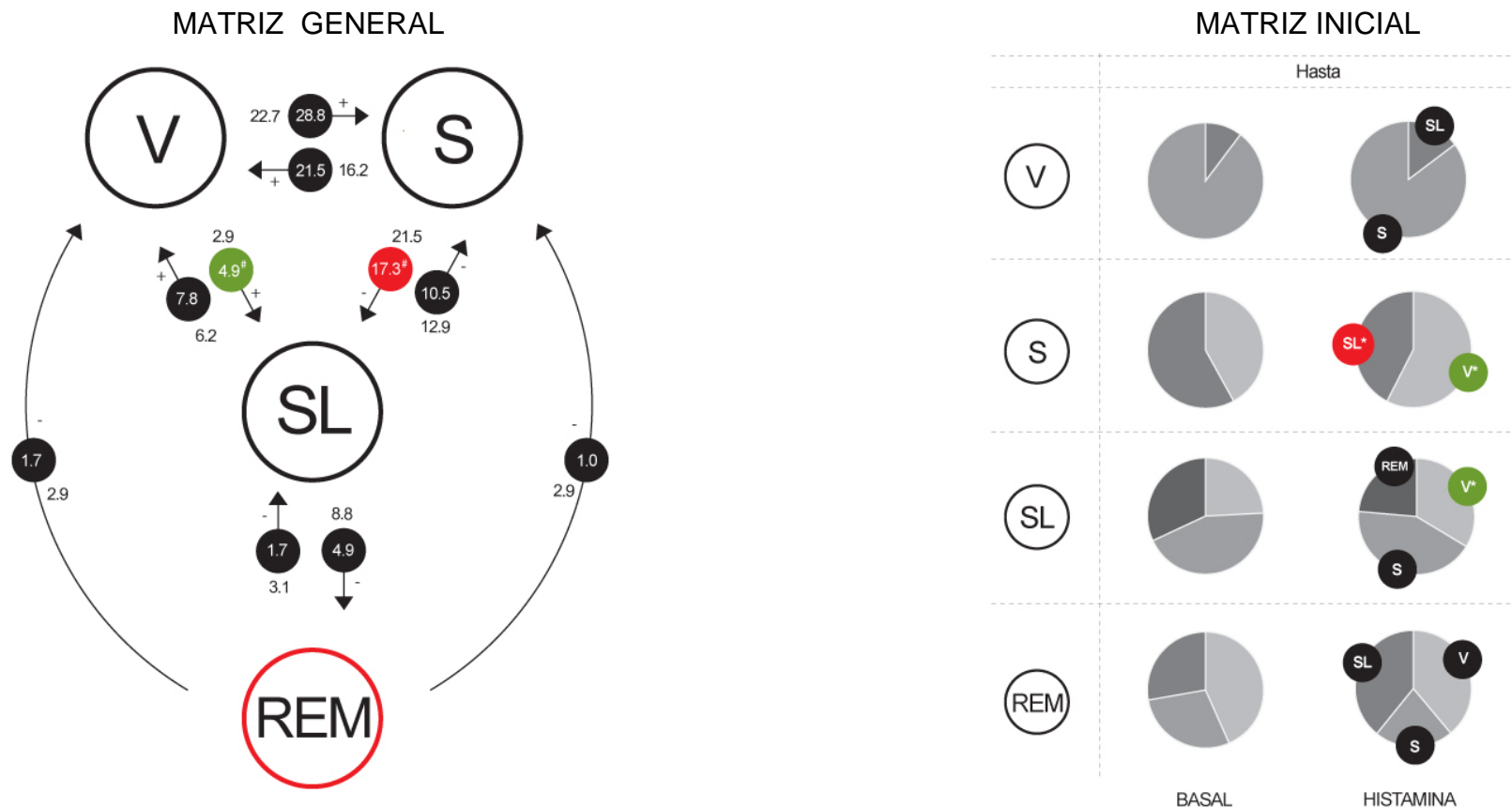
**Figura 14<sub>R</sub>**- Tiempo de permanencia  $\pm$  error estándar (en minutos) en cada uno de los estados del CVS en los registros basales (líneas grises) y tras la administración de histamina (i.c.)+ pirilamina (i.p.) y de nitroprusiato (i.c.) para las seis horas de registro en los animales cuyas inyecciones se realizaron en la región caudal del tegmento pontino (Grupo III).

\* Análisis post-hoc ( $p \leq 0.05$ )



## GRUPO III (RPC) –Arquitectura del CVS

### Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS para la 3ª-6ª hora de registro



**Fig.15<sub>R</sub>**. Análisis de las transiciones entre los distintos estados del CVS tras la aplicación de histamina en los animales del Grupo III (RPC) para el total de la 3ª a la 6ª hora de registro agrupadas. La matriz general representa el porcentaje de cada transición con respecto al nº total de transiciones ocurridas en condiciones basales (fuera de los círculos) y tras la aplicación de histamina (dentro de los círculos). Los signos representan si este nº de transiciones aumento (+) o disminuyo (-) en valor absoluto. La matriz inicial representa el porcentaje que desde un estado concreto del CVS se produce a los otros del CVS. Los colores rojos indican descensos y los verdes indican aumentos significativos (\*p ≤ 0.05) o cercanos a la significación (#p ≤ 0.1) estadística tras la aplicación de histamina con respecto a los valores basales.