

# Efecto de la microinyección de carbachol en diferentes núcleos de la amígdala del lóbulo temporal sobre el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) del gato

Karina Simón Arceo,\* José María Calvo\*

## Summary

The aim of the present study was to test the hypothesis that the central nucleus (CN) of the temporal lobe amygdala (AMG) participates in the cholinergic drive for rapid eye movement (REM) sleep. Eleven chronically implanted freely moving cats with electrodes for sleep and PGO wave recordings were used. Guide tubes were implanted for carbachol microinjection (4  $\mu\text{g}$  / 0.25  $\mu\text{l}$ , 8  $\mu\text{g}$  / 0.50  $\mu\text{l}$  and 16  $\mu\text{g}$  / 1.0  $\mu\text{l}$ ) in the central, lateral and basal amygdaloid nuclei, and in the periphery of the AMG. Results showed that a single carbachol microinjection exclusively into the CN induced a prolonged enhancement of REM sleep lasting for more than five days. We also observed that REM sleep enhancement was accompanied by a marked enhancement of slow wave sleep (S) episodes with PGO waves, which are normally brief transitions from S to REM sleep. No effects on REM sleep's amount were observed when carbachol was applied into the basal and lateral amygdaloid nuclei, or in the periphery of the AMG. Our findings strongly support the hypothesis that a cholinergic drive for REM sleep comes from the CN of the AMG. We conclude that AMG is a prosencephalic limbic structure participating in REM sleep induction.

## Resumen

El objetivo del presente estudio fue poner a prueba la hipótesis de que el núcleo central (NC) de la amígdala del lóbulo temporal (AMG), participa en la inducción colinérgica del sueño con movimientos oculares rápidos (MOR). Se utilizaron once gatos en preparación crónica con electrodos para el registro del sueño y de los potenciales PGO. A los animales también se les implantaron cánulas guía para aplicar microinyecciones de carbachol (4  $\mu\text{g}$  / 0.25  $\mu\text{l}$ , 0.8  $\mu\text{g}$  / 0.50  $\mu\text{l}$  y 16  $\mu\text{g}$  / 1.0  $\mu\text{l}$ ) en los núcleos central, basal y lateral de la AMG, así como en la periferia de la AMG. Los resultados mostraron que una simple microinyección de carbachol en el NC de la AMG, provoca el aumento significativo y duradero (5 días) del sueño MOR. También observamos que el aumento del sueño MOR se acompañó del incremento significativo de los episodios de sueño en ondas lentas (SOL) con potenciales PGO, que son estados transicionales entre el SOL y el sueño MOR. Las microinyecciones de carbachol aplicadas en los núcleos lateral y basal de la AMG, o en la periferia de ésta, no provocaron ningún cambio del sueño MOR, ni de los estados transicionales que lo preceden. Nuestros resultados apoyan importantemente la hipótesis de que el NC amigdalino participa en el control colinérgico de la instalación del sueño MOR. Se concluye que la AMG es una estructura límbica prosencefálica que juega un papel en la inducción del sueño MOR.

## Introducción

El sueño es un estado fisiológico regulado a largo plazo y se ha encontrado que en su integración intervienen

mecanismos pontinos e hipotálamo-hipofisarios.<sup>36-38</sup> Sin embargo, aún no han sido bien delimitadas las estructuras prosencefálicas que pueden participar en la modulación del sueño, ni tampoco se ha logrado determinar con

\* División de Investigaciones en Neurociencias. Departamento de Cronobiología. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco 14370, México, D.F.

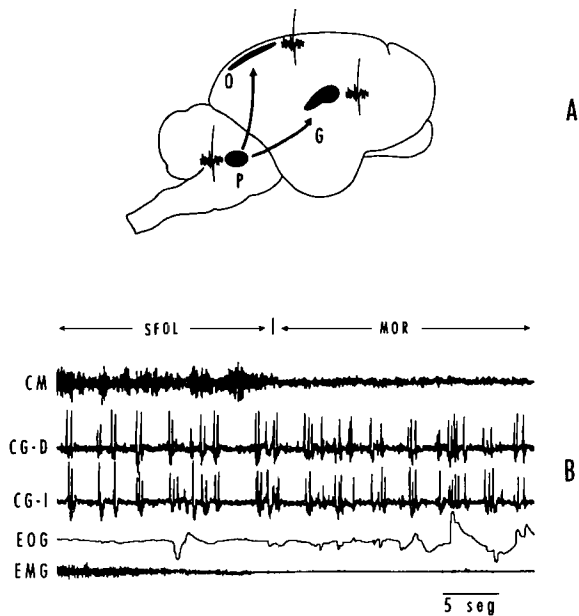


Figura 1. A: Representación esquemática del origen pontino (P) de los potenciales PGO y de su propagación hacia el cuerpo geniculado lateral (G) y la corteza occipital (O). B: Trazo poligráfico de la transición de un episodio de sueño fásico en ondas lentas (SFOL) al sueño MOR. Nótase el aumento de la frecuencia de los potenciales PGO durante el sueño MOR, en este caso registrados en el cuerpo geniculado derecho e izquierdo (CG-D y CG-I respectivamente). CM, corteza motora; EOG, electrooculograma; EMG, electromiograma.

precisión a través de qué neurotransmisor o factor humoral puede ser modulado. Por otro lado, las alteraciones afectivas o los cuadros alucinatorios cursan frecuentemente con trastornos del sueño, particularmente con insomnio,<sup>11</sup> pero existen pocas investigaciones acerca de la interacción fisiológica entre las regiones donde se integran los mecanismos del sueño y los sistemas cerebrales donde se integran las emociones, como el sistema límbico, cuya alteración además provoca episodios alucinatorios.<sup>6,7,26-28,62</sup>

Durante el dormir ocurren alternativamente dos estados principales del sueño, el sueño de ondas lentas (SOL) y el sueño con movimientos oculares rápidos (MOR). El sueño MOR se distingue poligráficamente por desincronización electroencefalográfica (EEG), atonía muscular, fenómenos fásicos como los movimientos oculares rápidos (MORs) y los potenciales ponto-geniculo-occipitales (PGO).<sup>2,40</sup> El sueño MOR y los MORs son fenómenos necesarios para el cerebro y también están regulados a largo plazo; si privamos de esta fase del sueño por varias horas o días, a una persona o a un animal, el sueño MOR se recupera hasta un 70 % y los MORs hasta un 85 %, <sup>29,39,53,59,67</sup>

El sueño MOR siempre está precedido (20 a 30 segundos) por periodos transicionales donde comienzan a

ocurrir los potenciales PGO, denominados periodos de sueño fásico en ondas lentas (SFOL)<sup>63</sup> (fig. 1). El hecho de que los potenciales PGO siempre precedan e incrementen su frecuencia durante el sueño MOR y que sean los responsables de los MORs,<sup>20,21</sup> ha permitido postular que sus mecanismos de generación forman un componente central de los mecanismos de instalación y mantenimiento del sueño MOR.<sup>12,41,56</sup>

El sueño MOR se integra en varios núcleos distribuidos en la región pontina del tallo cerebral.<sup>33,56-58</sup> Las neuronas localizadas del campo tegmental gigantocelular (FTG) y el campo tegmental magnocelular (FTM), aumentan tónicamente su frecuencia de descarga desde unos segundos antes y durante el sueño MOR.<sup>25,57,61</sup> Por otra parte, las células de los núcleos tegmentales laterodorsal y pedunculopontino, así como las de la región parabraquial (PBL) del tegmento pontino, descargan en salvas precediendo a los potenciales PGO para generarlos.<sup>24,57</sup> Estas regiones generadoras de los potenciales PGO forman un componente principal de los mecanismos de inducción del sueño MOR.

La hipótesis de la naturaleza colinérgica del sueño MOR propuesta inicialmente por Hernández-Peón y cols.<sup>31</sup> y Jouvet<sup>35</sup> ha sido apoyada en varios trabajos experimentales. La aplicación tópica de carbacol, un agente colinomimético, en el FTG, el FTM y el *Peri-locus coeruleus-α* provoca la pronta ocurrencia de episodios prolongados de sueño MOR.<sup>4,65,66,68-70</sup> En trabajos recientes hemos encontrado que una sola microinyección de carbacol en la región PBL, provoca la ocurrencia ininterrumpida de salvas de potenciales PGO durante 20 a 24 horas y que este fenómeno va seguido del aumento significativo y duradero del sueño MOR y los episodios de SFOL durante 6 a 8 días.<sup>16,17,22,23,32</sup> Este hallazgo apoya importantemente la participación de la acetilcolina y de la región PBL en la generación de los potenciales PGO y en la inducción del sueño MOR. Por otra parte, permite explorar el papel de estructuras prosencefálicas anatómica y fisiológicamente relacionadas con la región PBL, en la inducción del sueño MOR.

La amígdala del lóbulo temporal (AMG), a través de su núcleo central, proyecta y recibe fibras de la región PBL.<sup>8,9,44,47-51,55</sup> Además, el núcleo central, a diferencia de otros núcleos amigdalinos, contiene células colinérgicas.<sup>1</sup> En estudios previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que los potenciales PGO se propagan desde su origen pontino hacia diferentes estructuras del sistema límbico y entre ellas, a la AMG.<sup>18</sup> Asimismo, hemos encontrado que la AMG ejerce un control facilitatorio sobre los potenciales PGO, ya que su estimulación eléctrica durante el sueño MOR, provoca el aumento significativo de estos potenciales,<sup>14</sup> en cambio, la lesión electrolítica de la AMG provoca la disminución de los potenciales PGO.<sup>15</sup>

El hecho de que la estimulación eléctrica amigdalina provoque el aumento de los potenciales PGO y de que su núcleo central contenga células colinérgicas, permiten pensar que la AMG participa en la inducción del sueño MOR a través de su núcleo central y que en este fenómeno puede intervenir un mecanismo colinérgico. En apoyo de esto último, hemos encontrado que la activación colinérgica del núcleo central amigdalino aumenta significativamente el porcentaje del sueño MOR.<sup>13</sup> Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue fortalecer esta hipótesis, aplicando microinyecciones de carbacol en diferentes núcleos amigdalinos y comparando su efecto sobre la tasa diaria del sueño MOR.

## Métodos

Se utilizaron 11 gatos machos adultos, con un peso entre 3.5 y 4.5 Kg, preparados con electrodos a permanencia para el registro poligráfico del sueño y la vigilia (electroencefalograma, EEG; electrooculograma, EOG; electromiograma, OMG) y con electrodos para el registro de los potenciales PGO en ambos cuerpos geniculados laterales. Los animales también fueron preparados con cánulas guía para la administración de carbacol en ambos complejos nucleares amigdalinos. Las intervenciones quirúrgicas para la colocación de los electrodos se llevaron a cabo bajo anestesia con pentobarbital sódico (33 mg / Kg).

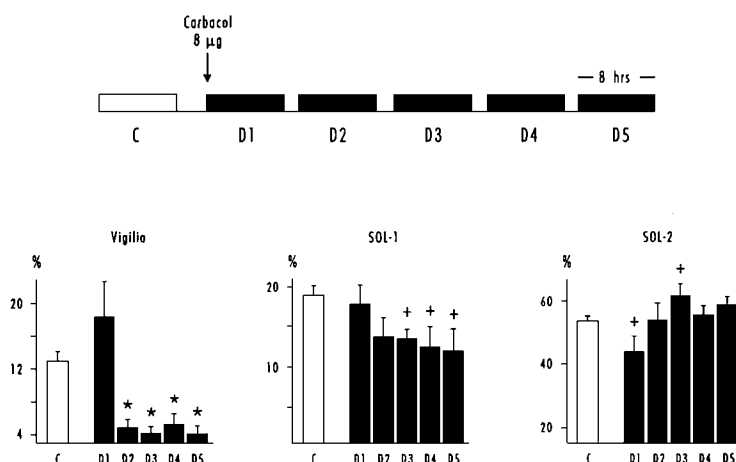
Las puntas de las cánulas guía fueron colocadas estereotáxicamente<sup>60</sup> a 2 mm por arriba del límite superior del núcleo central amigdalino. Para la microinyección de

carbacol en los diferentes núcleos amigdalinos (central, basal y lateral), se utilizaron cánulas inyectoras de diferentes longitudes. Las cánulas guía tenían adheridos 2 alambres de acero inoxidable para el registro de los cambios electrográficos provocados por el carbacol.

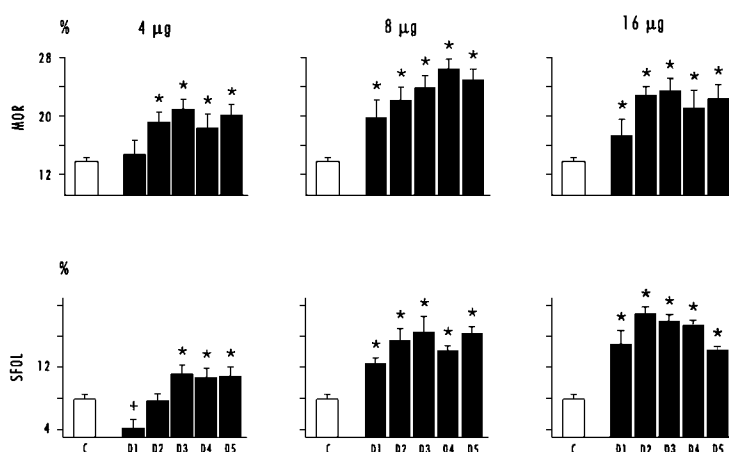
Inmediatamente después de las intervenciones quirúrgicas los animales fueron sometidos a un periodo de recuperación de 10 a 15 días. Durante este tiempo, los gatos permanecieron en la cámara de registro, con acceso libre al agua y alimentos y bajo un ciclo de luz-oscuridad constante (12:12 h). Antes de comenzar la serie experimental, los gatos fueron habituados a las condiciones de registro durante 8 horas (10:00 - 18:00 h), en 8 días consecutivos.

Después del periodo de habituación, se llevaron a cabo 3 registros de 8 horas de sueño en 3 días consecutivos, en situaciones de control. Posteriormente, se aplicó una microinyección de carbacol, unilateral o bilateral, en un núcleo amigdalino, y se llevaron a cabo registros poligráficos de la misma duración durante 5 días consecutivos. A partir de los registros poligráficos se determinó visualmente los periodos de vigilia, SOL-1, SOL-2, SFOL y sueño MOR.<sup>64</sup> De esta manera, se analizó el efecto de diferentes dosis de carbacol (4 µg / 0.25 µl salina, 8 µg / 0.50 µl salina y 16 µg / 1.0 µl salina), microinyectado en el núcleo central, el núcleo basal o en el núcleo lateral de la AMG.

Se aplicaron un total de 65 microinyecciones y entre cada microinyección se dejó un lapso de 8 días. Los datos acerca de la organización del sueño se obtuvieron a partir de 352 registros polisomnográficos, de los cuales 27 se efectuaron en condiciones de control y los restan-



**Figura 2.** En la parte superior se muestra esquemáticamente el protocolo experimental utilizado para los registros poligráficos del sueño en situaciones de control (C, n = 27) y durante 5 días consecutivos (D1 a D5, n = 6) después de la administración de carbacol. En la parte inferior se muestra el efecto de una microinyección (8 µg / 0.5 µl salina) bilateral aplicada en el núcleo central amigdalino sobre el porcentaje de vigilia, del sueño de ondas lentas 1 (SOL-1) y del sueño de ondas lentas 2 (SOL-2). Las barras representan los valores promedio ± error estándar + p < 0.05; \* p < 0.01. C vs D1 a D5.



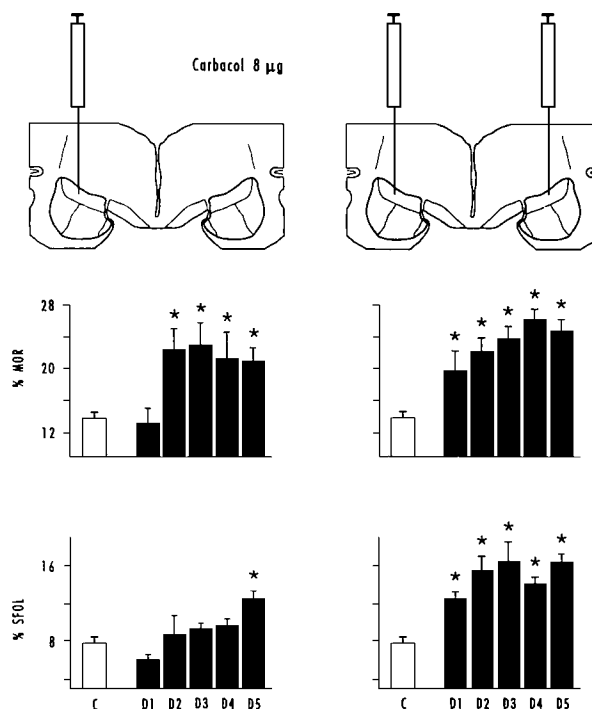
**Figura 3.** Efecto del carbacol aplicado bilateralmente en el núcleo central amigdalino en dosis simples de 4 µg (n = 12), 8 µg (n = 6) y 16 µg (n = 5), sobre el porcentaje del sueño MOR y de los episodios SFOL. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ ; \*  $p < 0.01$ , C vs DI a D5. Nótase que hay una tendencia hacia un mayor aumento mientras mayor sea la dosis administrada, principalmente en los episodios de SFOL. C, control (n = 27); DI a D5, días posteriores a la aplicación del carbacol.

tes bajo el efecto de las microinyecciones de carbacol. El análisis estadístico del porcentaje, número, duración promedio de cada una de las fases del sueño, fueron calculados mediante un programa computacional para la valoración del sueño del gato.<sup>19</sup> Todas estas variables fueron promediadas en situaciones de control y en cada uno de los 5 días siguientes a la microinyección de carbacol. Estas variables también fueron promediadas de acuerdo al sitio de inyección. Las diferencias entre los valores promedio obtenidos en situaciones de control y los obtenidos después de la administración del carbacol, fueron valoradas estadísticamente mediante las pruebas de ANOVA y "t" de Student. Las diferencias entre los valores promedio obtenidos con las microinyecciones en los diferentes núcleos amigdalinos, también fueron evaluadas estadísticamente mediante las pruebas de ANOVA y "t" de Student.

Al finalizar las series experimentales los gatos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital y fueron perfundidos con formaldehído al 20 %. Al día siguiente sus cerebros fueron extraídos y colocados en formaldehído al 20 % durante 15 días. Posteriormente se hicieron cortes histológicos de 40 a 60 µm, para localizar los sitios de inyección del carbacol en los diferentes núcleos amigdalinos.<sup>30</sup>

## Resultados

El análisis de la organización del sueño mostró que la aplicación de una simple microinyección de carbacol en el núcleo central amigdalino, provoca la disminución



**Figura 4.** En la parte superior se representa esquemáticamente la administración unilateral (izquierda) y bilateral (derecha) de una dosis simple de carbacol (8 µg). En la parte inferior se muestra el efecto de estas dosis sobre el porcentaje del sueño MOR y de los episodios de SFOL. Nótase que las dosis unilaterales (n = 12) tienen un menor efecto que las bilaterales (n = 6), especialmente sobre el porcentaje de SFOL. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  error estándar. 1,  $p < 0.01$ , C vs. DI a D5. C, control (n = 27); DI a D5, días posteriores a la aplicación del carbacol.

significativa del porcentaje del estado de vigilia y del SOL-1 durante los días siguientes a la microinyección. Asimismo, provoca cambios discretos, aunque estadísticamente significativos, de la fase SOL-2 (fig. 2). En cambio, el porcentaje del sueño MOR y de los episodios de SFOL aumenta significativamente durante los 5 días posteriores a la microinyección de carbacol. Este aumento es producido por todas las dosis de carbacol empleadas (4 µg / 0.25 µl salina, 8 µg / 0.50 µl salina y 16 µg / 1.0 µl salina), observándose una tendencia hacia un mayor aumento, mientras mayor sea la dosis administrada, principalmente en el porcentaje de los episodios de SFOL (fig. 3). Cabe señalar que tanto el porcentaje de sueño MOR, como el de los episodios SFOL, alcanzaron incrementos hasta del 100 % alrededor del segundo y cuarto día después de la microinyección de carbacol.

Los resultados también mostraron que el aumento en el porcentaje del sueño MOR y de los episodios SFOL es mayor cuando el carbacol se aplica de manera bilateral (fig. 4).

El incremento del porcentaje del sueño MOR provocado por el carbacol, se debe al aumento significativo del número de episodios de esta fase del sueño, ya que no se encontraron cambios significativos de la duración promedio de los episodios de MOR. Por otro lado, el aumento del porcentaje de los periodos de SFOL, se debió al aumento significativo tanto del número, como de la duración promedio de estos episodios (fig. 5).

El análisis del efecto del carbacol de acuerdo a los núcleos amigdalinos donde fue aplicado, mostró que el aumento prolongado del porcentaje del sueño MOR y de los episodios de SFOL, solamente se provoca al aplicar el carbacol en el núcleo central de la AMG. En cambio, cuando las microinyecciones son aplicadas en el núcleo

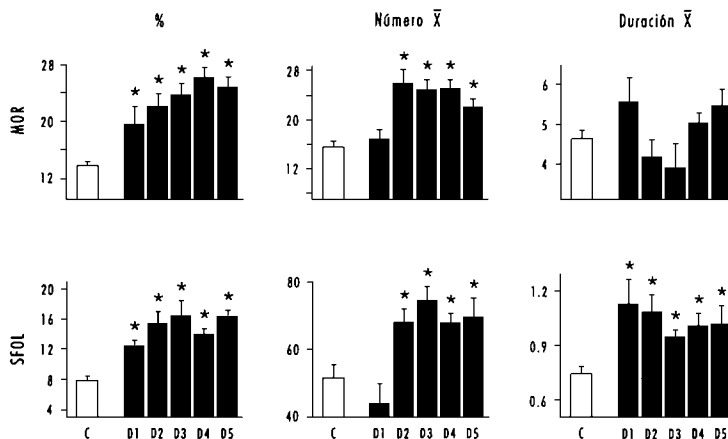
basal o en el núcleo lateral de la AMG, o bien, en sitios fuera de la AMG, no se observa ningún cambio significativo del porcentaje del sueño MOR y de los episodios SFOL, durante los 5 días de registro. Los valores promedio del porcentaje de sueño MOR y de los episodios de SFOL, obtenidos con las microinyecciones de carbacol aplicadas en los núcleos amigdalinos basal y lateral, o fuera de la AMG, fueron significativamente menores que los valores obtenidos al aplicar el carbacol en el núcleo central de la AMG (fig. 6).

## Discusión

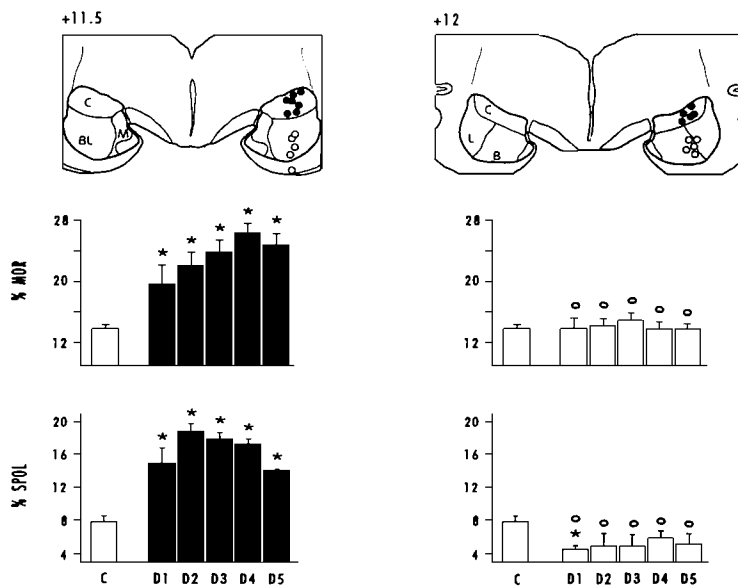
Los resultados del presente trabajo corroboran los obtenidos en trabajos previos de nuestro laboratorio<sup>13</sup> y apoyan la hipótesis de que la AMG participa en la instalación del sueño MOR, particularmente a través de su núcleo central y mediante un mecanismo colinérgico.

El hecho de que la activación colinérgica del núcleo central amigdalino provoque el aumento del sueño MOR, como consecuencia de un aumento significativo del número de sus episodios, apoya el papel de la AMG en los mecanismos de instalación del sueño MOR. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la AMG no participa en los mecanismos de mantenimiento de esta fase del sueño, pues la duración promedio de los episodios de MOR no mostró cambios significativos.

Otro resultado del presente estudio que apoya el papel de la AMG en la instalación del sueño MOR, es el aumento tanto del número, como de la duración media de los episodios de SFOL, que son estados transicionales entre el SOL y el sueño MOR. Esto indica que la AMG favorece la ocurrencia de los estados que preceden al



**Figura 5.** Efecto de una microinyección bilateral de carbacol (8 µg) en el núcleo central amigdalino sobre el porcentaje, número promedio y duración promedio de los episodios de sueño MOR y de SFOL. Las barras representan los valores promedio ± error estándar. \* p < 0.01. C vs D1 a D5. C, control (n = 27); D1 a D5 (n = 6), días posteriores a la aplicación del carbacol.



**Figura 6.** En la parte superior se representan esquemáticamente los sitios de las microinyecciones de carbaccol en los diferentes núcleos amigdalinos. Los círculos negros indican los sitios donde el carbaccol provocó el aumento del sueño MOR y de los episodios de SFOL. Los círculos blancos indican los sitios donde el carbaccol no tuvo ningún efecto. C, núcleo central; BL, núcleo basolateral; L, núcleo lateral; B, núcleo basal. Las gráficas constituidas por barras negras representan el efecto de una dosis bilateral de carbaccol (8 µg), aplicada en el núcleo central amigdalino, sobre el porcentaje del sueño MOR y de los episodios de SFOL (n = 6 microinyecciones). Las gráficas constituidas por barras blancas representan la ausencia del efecto del carbaccol aplicado en los núcleos C, BL, L y B amigdalinos (n = 15 microinyecciones). Las barras representan los valores promedio  $24 \pm$  error estándar. C, control (n = 27); D1 a D5, días posteriores a la aplicación del carbaccol. \*  $p < 0.01$ , C vs D1 a D5. O,  $p < 0.01$ , D1 a D5 de las microinyecciones en el núcleo central (barras negras) vs D1 a D5 de las microinyecciones en los demás núcleos amigdalinos.

MOR y es probable que este fenómeno facilite su aparición. Es de interés destacar que en los episodios de SFOL es donde comienzan a ocurrir los potenciales PGO, cuyos mecanismos constituyen un componente importante de los mecanismos de instalación del MOR. En trabajos previos hemos encontrado que la AMG facilita la ocurrencia de los potenciales PGO.<sup>14</sup> Probablemente la AMG facilita la aparición de potenciales PGO mediante un mecanismo colinérgico durante los episodios de SFOL, favoreciendo la instalación del MOR.

El incremento duradero (5 días) del MOR y de los episodios de SFOL no pueden ser explicados por un efecto sostenido del carbaccol, ya que el tiempo de su acción farmacológica es de alrededor de 8 minutos. Lo que indica que probablemente el carbaccol provoca cambios a largo plazo del metabolismo celular, a través de segundos mensajeros acoplados a los receptores muscarínicos. Es bien conocido que la unión del carbaccol con los receptores muscarínicos activa a la fosfolipasa C (FLC) a través de la proteína G.<sup>45</sup> La activación de la FLC genera segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato. Se ha demostrado que las

señales celulares que aumentan los niveles internos de  $Ca^{2+}$  y de DAG, modulan diversas funciones celulares mediante la activación de la proteína cinasa C (PCC).<sup>10,46</sup> En el sistema nervioso central, la activación de la PCC se ha relacionado con el aumento de la liberación de los neurotransmisores<sup>42,43</sup> y con cambios de la plasticidad neuronal.<sup>34,54</sup> Con base en estos hallazgos, puede pensarse que el carbaccol produce cambios duraderos en la responsividad de las neuronas colinérgicas o colinoceptivas del núcleo central amigdalino, aumentando sus impulsos excitatorios hacia la región PBL, la cual se ha demostrado que participa en la instalación del sueño MOR.

Es importante señalar que el efecto tan prolongado del carbaccol sobre el sueño MOR, sólo se produce cuando es aplicado en estructuras que contienen células colinérgicas, como la región PBL y el núcleo central amigdalino. En cambio, cuando el carbaccol se aplica en el FTG, que carece de células colinérgicas, se induce la aparición de episodios prolongados de sueño MOR, pero este efecto dura aproximadamente 18 a 20 horas.<sup>16</sup> Todo esto apoya la importancia de la acetilcolina en la inducción del sueño MOR y de los estados transitorios que lo preceden.

En numerosos estudios experimentales se ha demostrado la instalación del sueño MOR por la aplicación de carbacol en el FTG.<sup>3-5,69,70</sup> Sin embargo, esta estructura carece de neuronas colinérgicas y se ha propuesto que los impulsos colinérgicos los recibe de la región PBL.<sup>52</sup> En apoyo a esto está el hecho de que la activación colinérgica de la región PBL produce el aumento duradero del sueño MOR.<sup>16,32</sup> Los resultados del presente estudio sugieren que la región PBL está a su vez modulada por la AMG; por lo tanto, nuestro estudio muestra que la AMG puede formar parte de los circuitos neuronales prosencefálicos que modulan la inducción del sueño MOR y que esta modulación puede llevarse a cabo mediante un mecanismo colinérgico. Nuestros resultados también apoyan la existencia de un circuito límbico colinérgico para la instalación del sueño MOR, propuesto por Hernández-Peón.<sup>31</sup>

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los señores Carlos Jiménez Rodríguez y Carlos Camacho García por su excelente ayuda técnica durante el desarrollo de los experimentos. Este estudio fue parcialmente subvencionado por el proyecto 3564-N9311 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## Referencias

1. AMARAL DG, PRICE JL, PITKANEN A, CARMICHAEL ST: Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. En: JP Aggleton (ed). *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. Willey-Liss, Inc., 1-66, Nueva York, 1992.
2. ASERINSKY E, KLEITMAN N: Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science*, 118:273-274, 1953.
3. BAGHDOYAN HA, LYDIC R, CALLAWAY CW, HOBSON JA: The carbachol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose dependent and antagonized by centrally administered atropine. *Neuropsychopharmacol*, 2:67-79, 1989.
4. BAGHDOYAN HA, RODRIGO-ANGULO ML, MCCARLEY RW, HOBSON JA: Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res*, 306: 39-52, 1984.
5. BAGHDOYAN HA, RODRIGO-ANGULO ML, MCCARLEY RW, HOBSON JA: A neurochemical gradient in the pontine tegmentum for the cholinergic induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res*, 414:245-261, 1987.
6. BEAR DM: Hemispheric asymmetries in emotional function: A reflection of lateral specialization in cortical-limbic connection. En: BK Doane, KE Livingston (eds). *The Limbic System Functional Organization and Clinical Disorders*. Raven Press, 29-41, Nueva York, 1986.
7. BEAR MD, SCHENK L, BENSON MD: Increased autonomic responses to neuronal and emotional stimuli in patients with temporal lobe epilepsy. *Am J Psychiatry*, 138:843-845, 1981.
8. BERNARD JF, ALDEN M, BESSON JM: The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex. *A Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. J Comp Neurol*, 329:201-229, 1993.
9. BERNARD JF, CARROUE J, BESSON JM: Efferent projections from the external parabrachial area to the forebrain: a *Phaseolus Vulgaris leucoagglutinin* study in the rat. *Neurosci Lett*, 122:257-260, 1991.
10. BERRIDGE MJ: Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem*, 56:159-193, 1987.
11. BUELA-CASAL G, NAVARRO-HUMANES JF: *Avances en la Investigación del Sueño y sus Trastornos*. Siglo Veintiuno de España Editores, S.A. 1-458, Madrid, 1990.
12. CALLAWAY CW, LYDIC R, BAGHDOYAN HA, HOBSON JA: Pontogeniculooccipital waves: spontaneous visual system activity during rapid eye movement sleep. *Cell Mol Neurobiol*, 7:105-149, 1987.
13. CALVO JM: El sistema límbico y el sueño. *Anales. Instituto Mexicano de Psiquiatría*, 4: 47-55, 1993.
14. CALVO JM, BADILLO S, MORALES-RAMIREZ M, PALACIOS-SALAS P: The role of temporal lobe amygdala in pontogeniculo-occipital activity and sleep organization in cats. *Brain Res*, 403:22-30, 1987.
15. CALVO JM, BADILLO S, PALACIOS-SALAS P: Participación del sistema límbico en la regulación de los fenómenos fásicos del sueño paradójico. *Anales. Instituto Mexicano de Psiquiatría*, 101-109, 1988.
16. CALVO JM, DATTA S, QUATTROCHI J, HOBSON JA: Cholinergic microstimulation of the peribrachial nucleus in the cat. 2. Delayed and prolonged increases in REM sleep. *Arch Ital Biol*, 130:285-301, 1992.
17. CALVO JM, DATTA S, STICKGOLD R, QUATTROCHI J, HOBSON JA: Prolonged REM sleep enhancement following carbachol microinjection in the peribrachial region of the dorsolateral pons. *Sleep Res*, 20 (resumen):16, 1991.
18. CALVO JM, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Phasic activity of basolateral amygdala, cingulate gyrus, and hippocampus during REM sleep in the cat. *Sleep*, 7:202-210, 1984.
19. CALVO JM, FERNANDEZ-MAS R: Amygdaloid kindling during wakefulness and paradoxical sleep in the cat. 2. Sleep organization changes produced by kindling development. *Epilepsy Res*, 9:175-183, 1991.
20. CESPUGLIO R, LAURENT JP, CALVO JM: Organisation anatomique des activités phasiques provoquées par la reserpine au niveau du système oculo-moteur. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 40:12-24, 1976.
21. CESPUGLIO R, LAURENT JP, JOUVET M: Etude des relations entre l'activité ponto-geniculo-occipitale (PGO) et la motricité oculaire chez le chat sous reserpine. *Brain Res*, 83:319-335, 1975.
22. DATTA S, CALVO JM, QUATTROCHI J, HOBSON JA: Long-term enhancement of REM sleep following cholinergic stimulation. *Neuroreport*, 2:619-622, 1991.
23. DATTA S, CALVO JM, QUATTROCHI J, HOBSON JA: Cholinergic microstimulation of the peribrachial nucleus in the cat. 1. Immediate and prolonged increases in ponto geniculo-occipital waves. *Arch Ital Biol*, 130:263-284, 1992.
24. DATTA S, HOBSON JA: Neuronal activity in the caudolateral peribrachial pons. Relationship to PGO waves and rapid eye movements. *J Neurophysiol*, 71:95-109, 1994.
25. DATTA S, PARE D, OAKSON G, STERIADE M: Thalamic-projecting neurons in brainstem cholinergic nuclei increase their firing rates one minute in advance of EEG desynchronization associated with REM sleep. *Soc Neurosci Abstr*, 15(resumen):452-45, 1989.
26. DOANE BK, LIVINGSTON KF: *The Limbic System*. Raven Press, Nueva York, 1986.
27. FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Reminiscences elicited by electrical stimulation of the temporal lobe in humans. En: R Druker-Colin, JL McGaugh (eds). *Neurobiology of Sleep and Memory*. Academic Press, 273-280, Nueva York, 1977.
28. FISH DR, GLOOR P, QUESNEY FL, OLIVIER A: Clinical responses to electrical brain stimulation of the temporal and frontal lobes in patients with epilepsy pathophysiological implications. *Brain*, 116:397-414, 1993.
29. FOOTE SL: Compensatory changes in REM sleep time of cats during *ad libitum* sleep and following brief REM sleep deprivation. *Brain Res*, 54:261-276, 1973.

30. GUZMAN-FLORES C, ALCARAS M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology. *Bol Inst Estud Med Biol*, 16:29-31, 1958.
31. HERNANDEZ-PEON R, CHAVEZ-IBARRA G, MORGANE PJ, TIMO-IARIA C: Limbic cholinergic pathways involved in sleep and emotional behavior. *Exp Neurol*, 8:93-111, 1963.
32. HOBSON JA, DATTA S, CALVO JM, QUATTROCHI J: Acetylcholine as a brain state modulator-triggering and long-term regulation of REM sleep. *Cholinergic Function and Dysfunction*, 98, 1993.
33. HOBSON JA, STERIADE M: The neuronal basis of behavioral state control. En: V Mountcastle (ed). *Handbook of Physiology*. American Physiological Society, Bethesda, 701-823, 1986.
34. HUANG KP: The mechanisms of protein kinase C activation. *Trends Neurosci*, 12:425-432, 1989.
35. JOUVET M: Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch Ital Biol*, 100:125-206, 1962.
36. JOUVET M: The role of monoamines and acetylcholine containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. En: M Jouvet, G Moruzzi (eds). *Neurophysiology and Neurochemistry of Sleep and Wakefulness. Reviews of Physiology*. 166-307, Nueva York, 1972.
37. JOUVET M: Hypnogenic indolamine-dependent factors and paradoxical sleep rebound. En: WP Koella (ed). *Sleep 1982. Physiology, Pharmacology, Sleep Factors, Memory, Sleep Deprivation, Hypnotics*. Karger, Basel, 2-18, Nueva York, 1982.
38. JOUVET M: Neuromédiateurs et facteurs hypnogènes. *Rev Neurol*, 140:389-400, 1984.
39. JOUVET M: Mécanismes des états de sommeil. En: O Benoit (ed). *Physiologie du Sommeil*. Masson, 1-18, Nueva York, 1984.
40. JOUVET M, MICHEL F: Correlations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique. *C R Soc Biol*, 153:422-425, Paris, 1959.
41. JOUVET M, MICHEL F, COURJON J: Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique. *C R Soc Biol*, 153:1024-1028, Paris, 1959.
42. MALENKA RC, AYOUB GS, NICOLL RA: Phorbol esters enhance transmitter release in rat hippocampal slices. *Brain Res*, 403:198-203, 1987.
43. MALENKA RC, MADISON DV, NICOLL RA: Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*, 321:175-177, 1986.
44. MEHLER WR: Subcortical afferent connections of the amygdala in the monkey. *J Comp Neurol*, 190:733-762, 1980.
45. NATHANSON N: Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Ann Rev Neurosci*, 10:195-236, 1987.
46. NISHIZUKA Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334:661-665, 1988.
47. NOMURA S, MIZUNO N, ITOH K, MATSUDA K, SUGIMOTO T, NAKAMURA Y: Localization of parabrachial nucleus neurons projecting to the thalamus or the amygdala in the cat using horseradish peroxidase. *Exp Neurol*, 64:375-385, 1979.
48. NORGREN R: Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol*, 166:17-30, 1976.
49. NORITA M, KAWAMURA K: Subcortical afferents to the monkey amygdala: an HRP study. *Brain Res*, 190:225-330, 1980.
50. OTTERSEN OP: Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat: III. Afferents from the lower brainstem. *J Comp Neurol*, 202:335-356, 1981.
51. PRICE JL, RUSSCHEN FT, AMARAL DG: The limbic region. II: The amygdaloid complex. En: A Bjorklund, T Hokfelt, LW Swanson (eds). *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 5. Integrated Systems of the CNS, part 1. Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala, Retina*. Elsevier, 279-388, Nueva York 1987.
52. QUATTROCHI J, MAMELAK AN, MACKLIS JD, MADISON R, HOBSON JA: Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol fluorescent microspheres. *Science*, 245:984-986, 1989.
53. RECHTSCHAFFEN A, BERGMANN BM, EVERSON CA, KUSHIDA CA, GUILLILAND MA: Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*, 12:68-87, 1989.
54. ROUTTENBERG A: Protein Kinase C activation leading to protein F1 phosphorylation may regulate synaptic plasticity by presynaptic terminal growth. *Behav Neuronal Biol*, 44:186-200, 1985.
55. RUSSCHEN FT: Amygdalopetal projections in the cat: II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde techniques. *J Comp Neurol*, 207:157-176, 1982.
56. SAKAI K: Some anatomical and physiological properties of pontomesencephalic tegmental neurons with special reference to the PGO waves and postural atonia during paradoxical sleep in the cat. En: JA Hobson, MAB Brazier (eds). *The Reticular Formation Revisited*. Raven Press, 427-447, Nueva York, 1980.
57. SAKAI K: Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. En: DJ McGinty (ed). *Brain Mechanisms of Sleep*. Raven Press, 111-137, Nueva York, 1985.
58. SAKAI K, JOUVET M: Brain stem PGO-ON cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res*, 194:1980, 1980.
59. SALLANON M, JANIN M, BUDA C, JOUVET M: Serotonergic mechanisms and sleep rebound. *Brain Res*, 268:95-104, 1983.
60. SNIDER RS, NIEMER WT: *A Stereotaxic Atlas of the Cat Brain*. Chicago Press, Chicago, 1961.
61. STERIADE M, PARÉ D, DATTA S, OAKSON G, CURRO-DOSSI R: Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J Neurosci*, 10:2560-2579, 1990.
62. TAMMINGA CA, THAKER GK, BUCHANAN R, KIRKPATRICK B, ALPHS LD, CHASE TN, CARPENTER WT: Limbic system abnormalities identified in schizophrenia using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose and neocortical alterations with deficit syndrome. *Arch Gen Psychiatry*, 49:522-530, 1992.
63. THOMAS J, BENOIT O: Individualisation d'un sommeil à ondes lentes et activité phasique. *Brain Res*, 5:221-235, 1967.
64. URSIN R, STERMAN MB: *A Manual for Standardized Scoring of Sleep and Waking in the Adult Cat*. Brain information service / Brain Research Institute. Los Angeles, 1981.
65. VANNI-MERCIER G, SAKAI K, 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*, 130:41-45, 1991.
66. 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*, 127:133-164, 1989.
67. VIMONT-VICARY P, JOUVET-MONIER D, DELORME F: Effets EEG et comportementaux des privations de sommeil paradoxal chez le chat. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 20:439-449, 1966.
68. VIVALDI E, MCCARLEY RW, HOBSON JA: Evocation of desynchronized sleep signs by chemical microstimulation of the pontine brainstem. En: JA Hobson, MAB Brazier (eds). *The Reticular Formation Revisited*. Raven Press, 513-529, Nueva York, 1980.
69. YAMAMOTO K, MAMELAK AN, QUATTROCHI J, HOBSON JA: A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: locus of sensitive region. *Neuroscience*, 39:279-293, 1990.
70. YAMAMOTO K, MAMELAK AN, QUATTROCHI J, HOBSON JA: A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: spontaneous and drug-induced neuronal activity. *Neuroscience*, 39:295-304, 1990.