



01965
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTOS AGUDOS DE LA INHIBICIÓN
DE RECEPTORES A FACTORES DE CRECIMIENTO
Y DE LA MAPK SOBRE EL SUEÑO EN LAS
ALTERACIONES INDUCIDAS POR HIVgp120

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PSICOBIOLOGÍA

P R E S E N T A

OSCAR DÍAZ RUIZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSCAR PRÓSPERO GARCÍA

COMITÉ DE TESIS:

DRA. MARÍA CORSI CABRERA

DRA. MATILDE VALENCIA FLORES

DR. JAVIER NIETO GUTIÉRREZ

DR. JORGE PALACIOS VENEGAS

MÉXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Dr. Oscar Próspero García por su apoyo, dirección y paciencia.

A la Dra. Luz Navarro Angulo.

Al Dr. Pietro Paolo Sanna.

A los compañeros y compañeras del laboratorio, una generación inolvidable.

A DGAPA-UNAM por el apoyo financiero al proyecto IN207799 otorgado al Dr. Oscar Próspero García

.....

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Índice

| | |
|--|-----|
| Introducción | 1 |
| Mitología | 1 |
| Historia de la investigación en sueño | 3 |
| Sueño en humanos | 11 |
| Sueño en la rata | 14 |
| Generadores del electroencefalograma | 14 |
| Teoría neurotrófica del sueño | 17 |
| Tirosinas cinasas | 19 |
| Receptores con actividad de tirosina cinasa | 20 |
| Factor de crecimiento epidérmico (EGF) | 22 |
| Receptor a EGF | 25 |
| Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) | 26 |
| Receptor a PDGF | 27 |
| Sida | 31 |
| Demencia, HIVgp120 y sueño | 33 |
| Hipótesis | 37 |
| Objetivos | 37 |
| Métodos | 38 |
| Resultados | 41 |
| Grupos control | 41 |
| Tirosinas cinasas | 43 |
| HIVgp120 | 55 |
| Discusión | 63 |
| Tirosinas cinasas | 63 |
| HIVgp120 | 74 |
| Conclusiones | 78 |
| Referencias | 80 |
| Anexo I | 94 |
| Anexo II | 99 |
| Artículo científico | 104 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

El sueño es un fenómeno fisiológico que acompaña al ser humano desde el nacimiento hasta la muerte (figura 1). Durante el transcurso de la vida pasamos cuando menos un tercio durmiendo y, a pesar de que diariamente experimentamos este fenómeno, poco conocemos de él.

Por las primeras descripciones mitológicas sabemos que el sueño, su misteriosa presencia y su función han acompañado a la historia del hombre desde siempre.

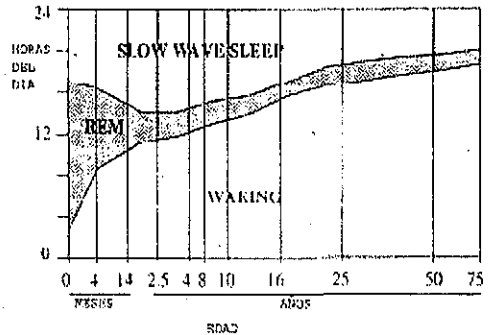


Figura 1. Distribución del sueño a lo largo de la vida del humano. www.sro.org

Mitología. Hypnos entre los griegos o Somnus entre los romanos son los nombres del dios del sueño (figura 2). Hypnos hijo concebido sin pareja por Nyx, diosa que reinó durante la noche que siguió a la creación del mundo. Nyx, es hija del Caos, madre de numerosos dioses primordiales y, al parecer,



Figura 2. Estatua de Hypnos. Museo de Almedinilla. Córdoba, España.

sucesora de Phanes, el dios creador. Hypnos tuvo un hermano gemelo, también concebido sin pareja, Tánatos, la muerte. Hypnos se unió a Pashitea, una de las gracias, con quién procreó tres hijos Icaelus, Morfeo y Fantaso, también conocidos como los Oniroi u Oneiros. Según la mitología, Hypnos vive al oeste, en el inframundo, en los dominios de Hades, hijo de Cronos y Rhea. Su morada es un palacio construido dentro de una gran cueva donde el sol jamás llega, como tampoco lo hace el canto del gallo que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

despierta al resto de mundo. Por lo anterior, Hypnos vive siempre en tranquilidad, paz y silencio. A un lado de su morada fluye Lete, el río del olvido, hijo de Eris, la discordia; y a sus orillas crecen amapolas y plantas que liberan fragancias somníferas. Hypnos lleva, todos los días, agua de Lete a los ojos de los mortales y junto al perfume de las flores y al suave murmullo de las lánguidas aguas se convierten en una invitación irresistible a dormir. Cuando Hypnos camina por su palacio es acompañado, a menudo, por su hermano gemelo Tánatos, por que cuando un mortal atraviesa la frontera del sueño su espíritu es reclamado por Tánatos pero también cuando un mortal debe regresar al mundo para reencarnar le hace beber y baña abundantemente sus ojos con agua de Lete para que no recuerde sus vidas anteriores. Cuando Hypnos descansa lo hace al centro de su palacio, en un lecho de ébano sobre blandas plumas y rodeado de cortinas negras (figura 3). Su sueño es apacible y plagado de historias. Es cuidado por sus tres hijos que son la fuente de todos los sueños, el grupo es dirigido de manera leal y devota por Morfeo. Morfeo brinda a su padre los ensueños que contienen presencia humana, Icelus provee los ensueños con animales y Phantasus ofrece el ensueño con formas inanimadas.



Figura 3. Hypnos y Morfeo en la morada del primero. www.loggia.com/myth/

Los Oniroi sólo se presentan a los mortales cuando están dormidos y pueden enviarles sueños verdaderos y falsos. Los verdaderos son predicciones que se verificaban, estos son enviados a través de la compuerta de cuerno o puerta de asta (*gate of horn*). Los sueños falsos, son ilusorios y están destinados a engañar, éstos llegan a través de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

compuerta de marfil o puerta de marfil (*gate of ivory*). El poder de Hypnos se centra en la capacidad para dominar tanto a dioses como a mortales, ya que todos necesitamos del sueño para vivir (Fluchaire P, 1994; Diccionario mitológico, Enciclopedia británica).

La mención del sueño en los textos mitológicos es una forma de conocer el aspecto poético. Sin embargo, el conocimiento no se ha limitado a eso ya que la investigación científica realizada desde hace varias décadas nos ha brindado sólidos conocimientos sobre la fisiología, anatomía y posible función del sueño. Este conocimiento lo tenemos gracias al arduo trabajo de muchos investigadores. Una breve semblanza sobre la historia del sueño es una forma de conocer el avance que hemos tenido.

Historia de la investigación en sueño. Los primeros trabajos científicos fueron descripciones conductuales tanto de seres humanos como de animales. De hecho, todo nuestro conocimiento del sueño proviene de dos observaciones, la primera conductual y la segunda electroencefalográfica. Aunque actualmente se comienza a describir a nivel molecular. Las primeras observaciones conductuales datan de 350 a.C. cuando Aristóteles describió al sueño como ..."una inhibición del sentido de la percepción para la conservación" (referido por Edelson E, 1992). En 1846, Edward Binns publicó el libro "The anatomy of sleep" (referido por Edelson E, 1992). En 1863, Kohlschutter describe la profundidad del sueño en humanos con base en la intensidad de un estímulo acústico (campanilla) para despertarlos. También formó una tabla numérica indicando la profundidad del sueño durante la noche ya que según sus observaciones, encontró que era más fácil despertar al principio que al final del sueño. A pesar de no variar la intensidad y frecuencia del estímulo (referido en Fischgold H, 1965). En 1868, W. Griesinger sugirió que las ensoñaciones estaban asociadas con periodos de movimientos oculares (Griesinger W, 1868; referido por Edelson E, 1992). En 1875, Richard Caton trabajando con conejos y monos y utilizando un galvanómetro, observó

variaciones de corriente en la "materia gris" las cuales tenían relación con la conducta (Caton R, 1875). Durante el último tercio de ese siglo, se publicaron los primeros escritos con detalles anatómicos y clínicos orientados hacia el determinismo neurofisiológico del sueño. Estos fueron realizados por Gayet en 1875 en Francia y por Mauthner en 1890 en Austria. Estos trabajos muestran la importancia de áreas mesencefálicas rostrales y de los efectos de las lesiones que existen en síndromes letárgicos (referido en Bremer F, 1974). Para finalizar el siglo, en 1899, Sigmund Freud publicó su estudio sobre las ensoñaciones donde comenta que durante el sueño, el cerebro se encuentra muy activo mientras que los músculos del cuerpo están totalmente relajados; especulando que esto era un mecanismo para prevenir la actuación de los sueños (referido en Chokroverty S, 1999).

En 1907, Rene Legendre y Henri Piéron describen la "hipnotoxina" a partir del líquido cefalorraquídeo de perros privados de sueño; pero es hasta 1913 cuando Piéron sugiere la relación entre algunas sustancias química corporales y el sueño en su libro *Le problème physiologique du sommeil* (Piéron H, 1913). Años después, en 1923, Nathaniel Kleitman muestra que la privación prolongada de sueño provoca descenso en la temperatura corporal, confusión en la conciencia y desorientación (referido en Kleitman N, 1939). Ese mismo año, J.A. MacWilliam describió dos estados de sueño:

el "no alterado" y el "alterado", el segundo lo asoció con incremento en la presión sanguínea y respiración (MacWilliam JA, 1923). En 1929, Hans Berger, Jefe del departamento de neurología del Hospital Estatal de Jena, realiza el primer registro de actividad eléctrica cerebral en humanos y usa el término electroencefalograma para referirse a sus registros de actividad eléctrica



Figura 4. Frederic Bremer, pionero en la investigación de la neurofisiología del sueño. www.wfsrs.org

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Berger H, 1929, 1938). Durante los siguientes 10 años Berger, continuó el registro de microseñales eléctricas cerebrales con un galvanómetro de Edlmann y después con un galvanómetro de bobina de Siemens. Las corrientes que observó apenas rebasaban el nivel de ruido provocado por los primitivos de los aparatos. A pesar de ello, logró registrar ondas regulares de 10 ciclos conocidas actualmente como ritmo alfa y demostró que la actividad eléctrica cerebral se deriva del tejido neural. Si bien al principio sus trabajos no fueron tomados en consideración por los especialistas, éstos encontraron el merecido reconocimiento cuando fueron confirmados por dos fisiólogos reconocidos, Adrian y Matthews, en 1934 (Maas JB, 1998).

Las epidemias de encefalitis viral que frecuentemente aparecían durante la década de 1920 brindaron un camino a Constantin von Economo para mostrar que los pacientes que morían con insomnio presentaban lesiones inflamatorias en el hipotálamo anterior mientras que los pacientes que morían con hipersomnia presentaban lesiones del hipotálamo posterior a nivel del núcleo oculomotor (von Economo C, 1930). Ese mismo año, Frederic Bremer (figura 4) desarrolló dos preparaciones con el cerebro de gatos. Éstas fueron denominadas el *encépale isolé* y el *cerveau isolé*, producidas por un corte de la unión de la médula oblongata con la médula espinal, el primero, y a nivel intercolicular, el segundo. En el *cerveau isolé*, Bremer, describe que el electrocorticograma de gatos tiene, persistentemente, ondas lentas de 6 a 10 Hz de amplitud regular y los gatos presentaban pupilas mióticas, similares a los animales que duermen. En tanto que en la preparación *encépale isolé* el ciclo sueño vigilia está intacto (figura 5). Concluyendo que el sueño es un estado pasivo, que aparece como resultado de la ausencia de estímulos externos. (Bremer F, 1974).

En 1937, Loomis, Harvey y Hobart describieron los resultados obtenidos después de 30 noches de registro electroencefalográfico en humanos. Observaron que el sueño está hecho de una serie de estados, cuyos cambios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ocurren espontáneamente, y aparentemente como resultado de un "estímulo interno". Esto los llevó a proponer que los estados de conciencia estaban compuestos por cinco niveles (figura 6). Uno le corresponde a la vigilia y los restantes a diferentes profundidades del sueño (Loomis A, 1937).

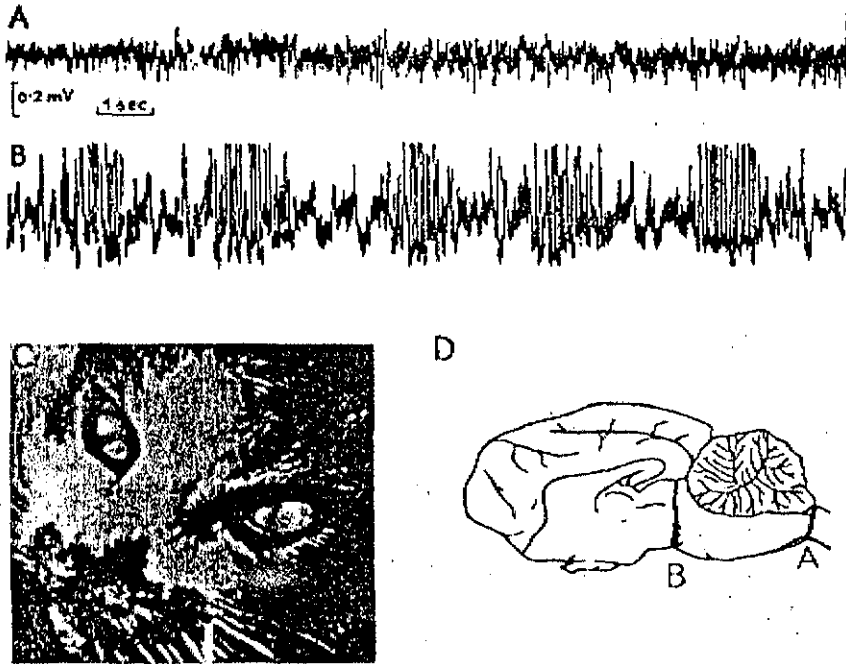


Figura 5. La preparación cerebral denominada *cerveau isolé* (Figura D, área B) realizada por Bremer en 1935 indujo sueño de ondas lentas corticales con espigas de gran amplitud (Figura B) y miosis (Figura C). En contraste, la preparación denominada *encéphale isolé* (Figura D, área A) indujo actividad cortical de bajo voltaje (A). Bremer F. *Bull. Acad. R. Med. Belg.* 1937; 4:68-86.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

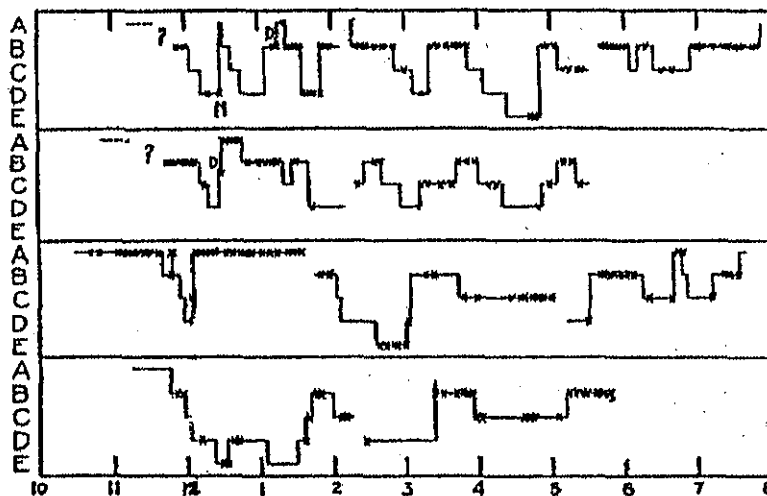


Figura 6. Probablemente el primer hipnograma de humano presentado en la historia del sueño. Loomis observó que durante las ensoñaciones (D) el electroencefalograma cambiaba hacia el estado B. Loomis A. *J Exp Psychol.* 1937; 21:127-144.

En 1939, Ranson realizó una serie de experimentos en monos con el fin de reproducir los experimentos de von Ecónomo. Sus resultados fueron parciales ya que no pudo reproducir los efectos observados en el sueño después de la lesión del hipotálamo anterior (Ranson SW, 1939). Años después, Nauta, en un artículo que tardó en ver la luz debido a los problemas de la guerra, reproduce los estudios hechos por von Ecónomo y publica una detallada validación histológica de las lesiones. Sin embargo, reporta que la lesión de ambas regiones hipotalámicas en la misma rata no modifica el ciclo sueño vigilia (Nauta WJH, 1946).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En 1944, Hess describió que la estimulación de bajo voltaje y baja frecuencia de un núcleo talámico (*massa intermedia*) inducía conducta de sueño en gatos (Hess WR, 1944). Posteriormente, Monnier mostró que la estimulación de los núcleos intralaminares del tálamo induce sueño y sincronización del electroencefalograma, llamándolo sueño ortodoxo (Monnier M, 1960). En 1949, aparece una reinterpretación a los trabajos de Bremer. Moruzzi y Magoun

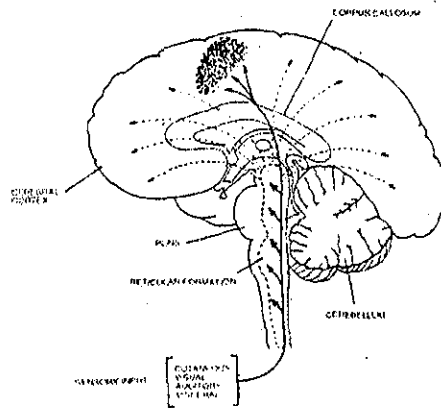


Figura 7. El sistema reticular activador del cerebro humano. www.sro.org

explican que en el corte que realizó Bremer existe una región necesaria para el mantenimiento de la vigilia, y diseñan una serie de experimentos que culminaron con la postulación de que la formación reticular del tallo cerebral influye sobre la corteza mediante un sistema de activación para inducir alerta, llamando a esto el sistema de activación reticular ascendente (figura 7) (Moruzzi G, 1949).

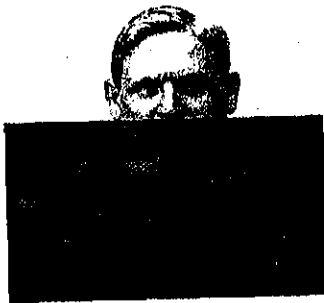


Figura 8. Dr. Nathaniel Kleitman, en una foto no fechada. www.wfsrs.org

Algunos años después, en 1952, Nathaniel Kleitman (figura 8) se interesó en la activación cerebral periódica, que según él, se reflejaba en la cantidad de movimientos oculares, a esto le llamó *basic rest-activity cycle* (BRAC) y encomendó esta investigación a su estudiante de doctorado, Eugene Aserinsky. Durante la investigación Aserinsky observó veloces movimientos oculares que se presentaban repentinamente durante el sueño. Esto originó en 1953, uno de los más grandes descubrimientos en la investigación del sueño;

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cuando Nathaniel Kleitman y Eugene Aserinsky describen el sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR).

Durante sus estudios de sueño, observaron periodos de movimientos oculares caracterizados por ondas de baja amplitud generalmente de 15 a 20 Hz y de 5 a 8 ciclos por segundo. Asociados con este estado encontraron cambios en los latidos del corazón y la respiración (figura 9). Cuando se despertaba a los sujetos durante esta fase, alrededor del 75% describía experiencias muy vívidas en sus ensoñaciones y el 25% restante reportó "la sensación de haber estado soñando" aunque sin recordar detalles. Cuando los sujetos eran despertados durante otra fase que no fuera de movimientos oculares rápidos, sólo 9% describió ensoñaciones y otro 9% la sensación de haber estado soñando (Aserinsky E, 1953).

Continuando con el tema, en 1957 Dement y Kleitman describen que el SMOR es recurrente durante la noche, formando ciclos que van de 90 a 100 minutos. Estos investigadores propusieron un sistema de cinco etapas para la clasificación del sueño: SMOR y sueño sin movimientos oculares, el segundo fue dividido en cuatro fases (Dement W, 1957). Un año después Dement muestra el patrón electroencefalográfico de bajo voltaje (SMOR) durante el sueño conductual del gato (Dement W, 1958).

Este fenómeno encontrado en el gato fue analizado por Jouvét (figura 10) y un año después, en 1959, describe uno de los principales fenómenos que se da en el sueño MOR, la atonía muscular. Casi todos habían asumido que la actividad muscular transcurría en forma similar a la profundidad del sueño, sin embargo, este investigador muestra que durante el sueño de ondas lentas había actividad muscular pero al llegar el SMOR la actividad muscular desaparecía (Jouvét M, 1959). Este descubrimiento fue confirmado dos años después en estudios con humanos realizado por Ralph Berger (Berger R, 1961). En 1960, Marcel Monnier descubre el péptido inductor de sueño delta (DSIP), un péptido que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cuando es inyectado en animales produce sueño e incrementa la cantidad de sueño MOR (referido en Chokroverty S, 1999). Un año después, en 1961, Jouvét de nuevo muestra que en el gato existe actividad eléctrica en la región del puente durante el SMOR y propone que el sueño está compuesto de dos diferentes estados, el sueño telencefálico (de ondas lentas [SOL]) y el rombencefálico (sueño paradójico o SMOR) (Jouvét M, 1961). Al año siguiente, Serman y Clemente muestran que tanto la estimulación eléctrica de alta y baja frecuencia en cerebro basal anterior, en la preparación realizada por Moruzzi así como en gatos normales, inducía la sincronización del EEG y sueño, respectivamente (Serman MB, 1962). Esto fue confirmado aunque por medios farmacológicos por Hernández-Peón, un año después (Hernández-Peón R, 1963).

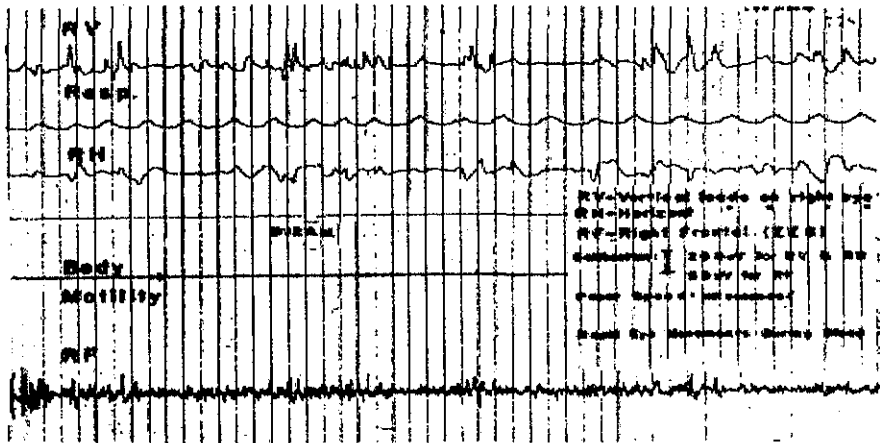


Figura 9. Aserinsky y Kleitman demostraron la existencia de movimientos oculares verticales (RV) y horizontales (RH) durante el sueño. Estos movimientos oculares estaban asociados a actividad cortical de baja amplitud (RF), movimientos corporales e incremento en la respiración. Aserinsky E. *Science*. 1953;118:273-274.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

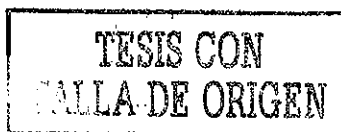
En 1962, Brooks encuentra que la misma actividad eléctrica descrita por Jouvét en el sueño MOR se observa en el núcleo geniculado lateral (referido en Chokroverty S, 1999) y casi inmediatamente Evarts completa el episodio demostrando la presencia de estas ondas en la corteza visual (Evarts EV, 1962). De 1962 a 1964 se describe la presencia de neuronas que contienen serotonina y noradrenalina en el tallo cerebral (Falck B, 1962; Dahlstrom A, 1964) y por último en 1965, Jouvét muestra las "conductas oníricas" después de lesionar el puente (referido en Chokroverty S, 1999). Durante los siguientes años la investigación en sueño se acelera y el número de descubrimientos se incrementa. Todos los estudios de sueño tienen en común que utilizan la electroencefalografía, así que en 1968 Alan Rechtschaffen y Anthony Kales publican el manual para estudios de sueño en humanos (Rechtschaffen A, 1968) y dos años después aparece un manual similar para estudios en la rata (Timo-laria C, 1970). Durante esos mismos años se publica el manual de las fases de sueño en gatos (Grahmstedt S, 1980; Ursin 1981).



*Figura 10. Michael Jouvét,
www.wfsrs.org*

Sueño en el humano y en la rata. La definición científica de sueño se basa en características conductuales y criterios fisiológicos. Los criterios conductuales incluyen 1) disminución o ausencia de movilidad, 2) ojos cerrados, 3) menor respuesta a los estímulos externos, 4) postura característica y 5) reversibilidad del estado. (Tobler I, 1995). Los criterios fisiológicos están basados en los descubrimientos de la electroencefalografía, la electrooculografía y la electromiografía.

Sueño en humanos. El ciclo sueño-vigilia en el humano consiste en vigilia, sueño de ondas lentas (SOL) que se divide en cuatro estados (I, II, III, IV) y



SMOR. Durante la vigilia, el EEG presenta un patrón de bajo voltaje y alta frecuencia conocido como ritmo α y β . El tono muscular es elevado y hay actividad ocular. El sueño lento o sueño no MOR ocupa entre 75 y 80% del tiempo total de sueño en el adulto. El estado I ocupa entre 3 y 8% del tiempo de sueño, el EEG presenta ondas de bajo voltaje (50 a 75 μ V) y de 5 a 7 Hz de frecuencia, aparecen las llamadas ondas vértex con una amplitud mayor a 200 μ V. El estado II, ocupa 45 a 55%, se presentan los husos de sueño con una frecuencia de 12 a 14 Hz y una duración mínima de 0.5 segundos, formando 6 o 7 ondas; también aparecen los complejos K que son ondas negativas seguidas de curvas positivas con duración mayor a medio segundo. El estado III y IV, o sueño delta, ocupan entre 15 y 20%; se dice que es estado III cuando se observa por lo menos 20% pero no más de 50% de actividad lenta (2 Hz) con amplitud promedio de 75 μ V en la época. Se dice que es en el estado IV cuando existe un mínimo de 51% de la actividad previamente descrita para estado III en la época. De manera global se observa que conforme desaparece la vigilia e inicia el estado I en el electroencefalograma aparece una disminución de las ondas alfa hasta llegar a ser menos del 50% de una época. Las ondas alfa son remplazadas por ondas theta (y algunas beta) acompañadas por algunos movimientos oculares lentos, el tono muscular disminuye paulatinamente. A los pocos minutos el hipnograma muestra ráfagas de espigas de 12 a 16 Hz mezcladas con complejos K, no se observan movimientos oculares y el tono muscular es menor en comparación al estado I.

Paulatinamente el sueño progresa a los últimos estados caracterizados por ondas delta que constituyen entre 20 o más del 50% de una época. Los estados III y IV son brevemente interrumpidos por episodios de estado II, el cual continua con el primer episodio de sueño MOR, 60 a 90 minutos después de la aparición de sueño (figura 11). (Chokroverty S. 1999; Carskadon M, 2000). El sueño MOR ocupa entre 20 y 25% del tiempo total de sueño. Con base en los criterios antes mencionados (EOG, EMG, EEG) puede ser dividido en dos estados: tónico y fásico. El estado tónico se caracteriza por

desincronización del EEG, hipotonía o atonía de los principales grupos musculares y depresión de los reflejos mono o polisinápticos. El estado fásico es discontinuo y superimpuesto al estado tónico. Se observan espasmos musculares faciales o en las extremidades, irregularidades cardíacas, respiratorias y no existe regulación de la temperatura a nivel central (Chokroverty S. 1999; Carskadon M, 2000).

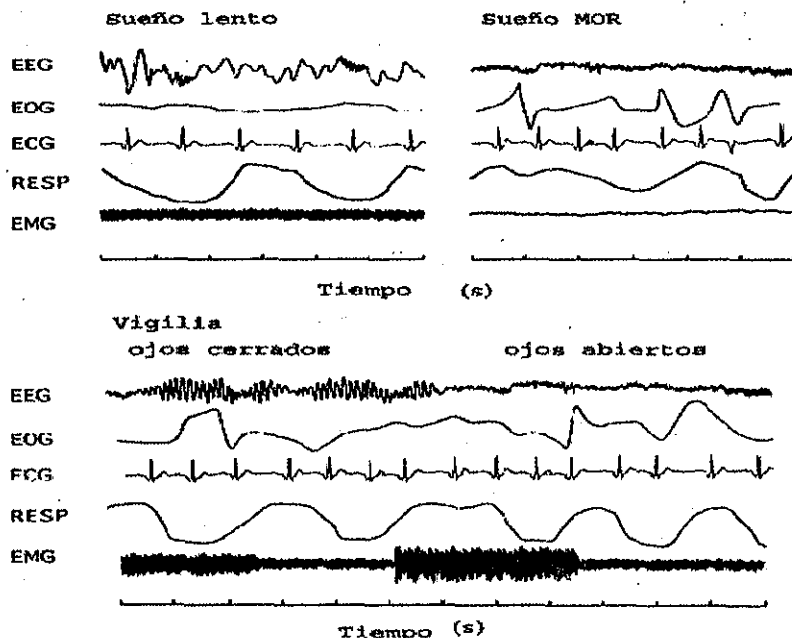


Figura 11. Características electrofisiológicas de la vigilia y los diferentes estado del sueño en humano. EEG = electroencefalograma; EOG=electrooculograma; ECG=Electrocorticograma; RES=respiración; EMG=electromiograma. Nicolau MC, Prog. Neurobiol. 2000; 62:379-406.

El primer período de sueño MOR aparece después de 90 minutos de iniciado el sueño y dura solo unos minutos. El sueño del individuo progresa a estado II, seguido por el estado III y IV antes de iniciar el segundo sueño MOR. Un ciclo total de sueño consiste de la secuencia de sueño no MOR y sueño MOR con duración aproximada de 90 a 110 minutos. Generalmente se observan durante

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

una noche cuatro a seis ciclos de sueño. La duración del sueño MOR se incrementa conforme transcurre la noche llegando a ser mas amplio durante la mañana o al final de la noche. En contraste, el sueño lento o no MOR predomina a principio de la noche (Chokroverty S. 1999; Carskadon M, 2000).

Sueño en la rata. En la rata, la vigilia se presenta con actividad cortical rápida (40 Hz), ondas de 60 μV en registros monopares y hasta 80 μV en bipares. Se observa ritmo theta que va de 5 a 9 ciclos por segundo (cs) y amplitud hasta de 200 μV ; el EMG es muy activo. Este estado representa alrededor del 20% del ciclo sueño-vigilia. El sueño se divide en SOL (I y II) y MOR; los cuales forman ciclos con duración aproximada de 10 minutos. El estado I se caracteriza por ondas corticales de 2 a 10 cs y de 400 μV en registros monopares, mientras que en bipares llegan a 350 μV ; el EMG disminuye en amplitud. Esta fase ocupa entre el 15 y 30% del ciclo. Posteriormente transita al estado II donde aparecen espigas que se incrementan en número, duración y amplitud. La frecuencia de las espigas varia de 5 a 15 cs; el tono muscular va desapareciendo. Esta fase ocupa alrededor del 50%. El SMOR está caracterizado por ondas de baja amplitud (80 μV) y alta frecuencia, se observa ritmo theta en el hipocampo y el tono muscular está ausente; esta fase de sueño representa alrededor del 8 a 10% del ciclo (Timo-faria C, 1970; Gottesmann C, 1992).

Generadores del electroencefalograma. Los electrodos de superficie en humanos y los de profundidad que se implantan permanentemente en el cráneo de animales pueden detectar los cambios de frecuencia y amplitud en las señales eléctricas que el cerebro genera a lo largo del ciclo sueño vigilia. Las principales estructuras involucradas son la corteza cerebral, hipocampo, cerebro basal anterior, tálamo y tronco cerebral.

Corteza. Los primeros estudios fueron realizados por Evarts, demostrando que la actividad unitaria de neuronas piramidales corticales se reduce cuando el

sujeto está en SOL y se recupera, hasta un nivel similar a la vigilia, durante el sueño MOR. En esta fase los patrones son rítmicos en comparación con la vigilia. Posteriormente, Hobson demostró que la corteza de asociación del gato muestra una reducción en su frecuencia de disparo y presenta un patrón de actividad-reposo durante el SOL. Mientras que durante el sueño MOR su actividad aumenta en comparación con la vigilia. Steriade observó menor actividad, aunque en forma rítmica, en neuronas piramidales corticales durante el SOL, además que las interneuronas de esta región aumentan progresivamente su frecuencia de disparo hasta llegar a un máximo durante el sueño MOR. (ver Drucker-Colín R. 1990).

Hipocampo. En esta estructura se puede recoger el ritmo theta durante la vigilia activa y el sueño MOR. Se distinguen cuatro tipos de actividad. El primero, proviene de las células piramidales y granulares de la región superior del hipocampo y del giro o fascia dentada. Estas células aumentan su actividad durante el SOL y la disminuyen en vigilia y sueño MOR. El segundo tipo de actividad proviene de las células theta conocidas así por estar asociadas con la generación de este ritmo. El tercer ritmo, se encuentra en las neuronas de las fibras aferentes al hipocampo como la vía perforante o las fibras comisurales hipocámpales. Debido a que responden con un patrón de descarga similar a las células de Renshaw de la médula espinal se supone que son interneuronas que reducen su actividad durante la vigilia y el sueño MOR. Por último, encontramos las células de lugar (*place cells*), las cuales aumentan su frecuencia de disparo durante el sueño MOR (Drucker-Colín R. 1990).

Cerebro basal anterior. Esta región incluye el área preóptica en donde se ha observado, al igual que las células de la banda diagonal de Broca, de la sustancia innominada y el globo pálido, descargas de mayor frecuencia durante el SOL en comparación con la vigilia o el sueño MOR. Estas células aumentan su frecuencia de disparo entre 1 a 5 segundos antes de que se observen signos de sincronización del EEG. Esto sugiere que intervienen en la

sincronización del EEG aunque no se puede asegurar que faciliten el SOL. Por último, en el núcleo accumbens, un área involucrada en los procesos de adicción y recompensa, se ha mostrado que sus neuronas descargan preferentemente durante la vigilia y el sueño MOR. (ver Drucker-Colin R. 1990).

Tálamo. Los estudios realizados por Hess y Monnier mostraron que la estimulación de los núcleos de la masa intermedia o de los núcleos intralaminares del tálamo inducen SOL. Posteriormente, Steriade, describió los mecanismos por los cuales el tálamo genera los husos de sueño (*spindles*) que aparecen durante el SOL. La propuesta se basa en la actividad de las neuronas de los núcleos específicos talámicos. Las neuronas del núcleo reticular talámico y del tálamo presentan oscilaciones de actividad, mismas que están acopladas en forma invertida. Cuando las células del primero descargan, las del segundo están silentes y viceversa. Las neuronas colinérgicas del área mesopontina peribranquial inhiben la aparición de los husos del sueño, hiperpolarizando a las neuronas del núcleo reticular. Estas neuronas colinérgicas reducen su actividad espontánea sólo unos milisegundos antes y durante la aparición de los husos de sueño. (ver Drucker-Colin R. 1990).

Tronco cerebral. Moruzzi y Magoun fueron los primeros en demostrar que la activación de la formación reticular del tronco cerebral induce desincronización del EEG. Posteriormente se demostró que las células de la formación reticular mesencefálica aumentan su frecuencia de disparo unos milisegundos antes y durante los periodos de desincronización del EEG tanto en la vigilia como en el sueño MOR. Además, la actividad unitaria de las células de la formación reticular pontina (FRP) aumenta durante la vigilia activa y el sueño MOR. Por contraparte, la estimulación eléctrica y colinérgica de esta región produce desincronización del EEG. Las neuronas que forman el complejo del rafé y del *locus coeruleus* inervan regiones corticales. Actualmente se sabe que la actividad unitaria de estas células se reduce durante el sueño lento y prácticamente desaparece durante el sueño MOR. Esto sugiere que la

presencia de ondas lentas en el EEG dependen, al menos en parte, de la activación del cerebro basal anterior y de estructuras talámicas (ver Drucker-Colín R. 1990).

Tono postural. Las primeras descripciones fueron realizadas por Jouvet, quien mediante lesión del tercio caudal del *locus coeruleus* en el gato, indujo supresión de la atonía muscular durante el sueño paradójico. Esta lesión permitió observar la expresión de una conducta alucinatoria "de miedo y defensa contra un enemigo imaginario" en el gato. Por lo anterior se pensó que el *locus coeruleus* controlaba la atonía muscular. Recientemente se ha demostrado que la lesión que induce atonía muscular se localiza ventralmente a este núcleo. La estimulación colinérgica de esta región induce atonía sin inducir sueño MOR. Se propone que estas neuronas son las encargadas de la atonía ya que proyectan sus fibras axonales hacia el tracto del tegmento reticular lateral y hacen sinápsis con neuronas del núcleo magnocelular y núcleo paramediano. Estos núcleos proyectan sus axones por el tracto retículo espinal ventrolateral hacia diferentes niveles de la medula espinal haciendo sinápsis con interneuronas inhibitorias que al parecer utilizan glicina como neurotransmisor (ver Drucker-Colín R. 1990).

A pesar de los grandes avances antes descritos en la fisiología del sueño, una de las principales preguntas persiste, ésta es ¿cual es la función del sueño? Este tema se ha tratado de diseccionar mediante diversas propuestas cristalizadas como teorías cuya función es dar una explicación plausible a este fenómeno. A continuación, describo la teoría neurotrófica del sueño, como marco de referencia al tema de esta tesis.

Teoría neurotrófica del sueño. Las teorías que buscan explicar la función del sueño se clasifican en dos grandes familias: las que postulan que el sueño sirve para las funciones corporales y las que se enfocan al postulado de que el sueño sirve para mantener, reparar o consolidar sinápsis o circuitos neuronales. El principal problema asociado con las teorías enfocadas hacia la

función corporal es su incapacidad para explicar el porque la necesidad de perder la vigilia para realizar un "reparación" corporal. En contraste, y según la teoría neurotrófica, si el sueño sirve para estimular y preservar las sinápsis necesarias para la sobrevivencia del organismo pero que fueron insuficientemente estimuladas durante la vigilia, entonces se entiende la necesidad de detener los mecanismos que mantienen la vigilia. (Krueger JM. 1993).

El principal argumento en el que se basa la teoría neurotrófica del sueño es la organización funcional del cerebro tomando como punto angular la teoría propuesta por Edelman (Edelman GE, 1987) conocida como Darwinismo neuronal y cuyos principales argumentos son:

- Las conexiones macroscópicas dentro del cerebro están codificadas genéticamente.
- Las conexiones microscópicas se desarrollan por mecanismos epigenéticos.
- En organismos adultos, las conexiones específicas entre neuronas son dinámicas y dependientes de uso.
- Las conexiones dependientes de uso promueven la formación de grupos neuronales, que son la unidad fundamental de organización cerebral.

A estos puntos, James Kruger (figura 12) autor de la teoría neurotrófica del sueño (Krueger JM, 1993, 1995) añade que:

- La actividad cerebral desarrollada durante la vigilia promueve la estimulación desproporcionada de algunas sinápsis mientras que otras sinápsis también necesarias para la sobrevivencia del organismo no son suficientemente estimulados.
- El sueño serviría para brindar un modelo de estimulación neuronal que ayude a preservar sinápsis críticas para la sobrevivencia pero insuficientemente estimuladas durante la vigilia.

- La estimulación neuronal sería dependiente de la síntesis de sustancias, principalmente factores de crecimiento (citocinas), los cuales a su vez serían sintetizados dependiendo de la necesidad de su uso. Las sustancias generadas servirán para inducir oscilaciones de actividad neuronal cuya función será mantener, diseñar, rediseñar y preservar la sinápsis.
- El uso de sinápsis favorecerá la formación de grupos neuronales.

Las proyecciones anatómicas entre grupos neuronales les permitirá formar elementos de "alto orden" los cuales serán los coordinadores globales para ingresar al sueño.



Figura 12. James Krueger, autor de la teoría neurotrófica del sueño.
www.sro.org

A nivel de grupo neuronal, los factores de crecimiento sintetizados pueden interactuar con más de un grupo y sus efectos podrán diferir dependiendo del grupo neuronal. A nivel celular, los efectos moleculares de las sustancias sintetizadas pueden ser en la inducción de la síntesis de canales iónicos específicos o moléculas críticas para la "necesidad" sináptica. Esta teoría sugiere que la somnolencia es un estado que se da como resultado de que varios grupos neuronales entrarán en sueño, y el sueño aparece cuando un número "suficiente" de grupos neuronales se sincronizan.

Tirosinas cinasas. La teoría neurotrófica del sueño sugiere que los factores de crecimiento, que pertenecen a la familia de las citocinas, son algunas de las moléculas implicadas en los procesos funcionales del sueño. Las citocinas son una superfamilia de polipéptidos conformada por ocho subfamilias. Una de estas subfamilias está integrada por los factores de crecimiento (Ebadi M, 1997). Los factores de crecimiento al igual que la mayoría de las citocinas tienen como receptores proteínas con actividad de tirosina cinasa (figura 13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es decir que cuando el factor de crecimiento se une al receptor promueve la transferencia de un grupo fosfato al dominio intracelular del receptor.

Esta fosforilación provoca la activación de segundos mensajeros y la fosforilación de proteínas en el núcleo. La fosforilación de proteínas juega un papel central en la regulación de muchos procesos celulares. Los procesos desensibilización activados por tirosina cinasas (PC) son reversiblemente controlados por las proteínas fosfatasa (PF).

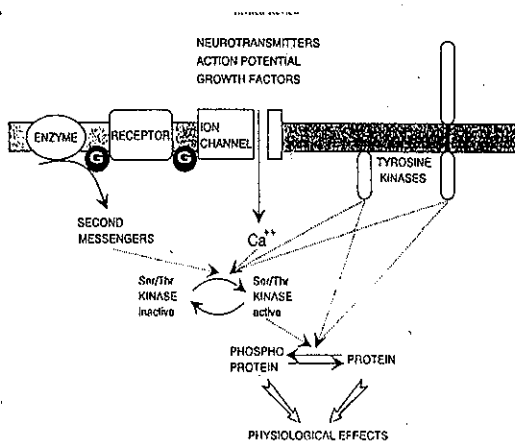


Figura 13. Integración de los diferentes tipos de receptores con enzimas intracelulares. Hunter T, Cell. 80:225-236. 1995

Las últimas estimaciones apuntan que en el humano existen alrededor de 2000 genes de PC y 1000 de PF (Hunter T, 1994). Las PC se dividen en tres grandes familias de acuerdo al aminoácido en que se fosforilan: serina/treonina cinasas, tirosina cinasas y recientemente un nuevo grupo denominado dual ya que se puede fosforilar en ambos aminoácidos (serina, treonina o tirosina) (Girault J-A, 1993).

Receptores con actividad de tirosina cinasa. La fosforilación de proteínas en sitios de serina y treonina fue establecida a mediados de 1960 y consolidada en la década de 1970. Sin embargo, la fosforilación de proteínas en el aminoácido tirosina fue descubierta hasta 1979 mediante estudios con virus tumorales, poliomavirus, virus del sarcoma de Rous y virus de la leucemia de Abelson (Hunter y Sefton 1980). Su presencia ha sido descrita y demostrada en varios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

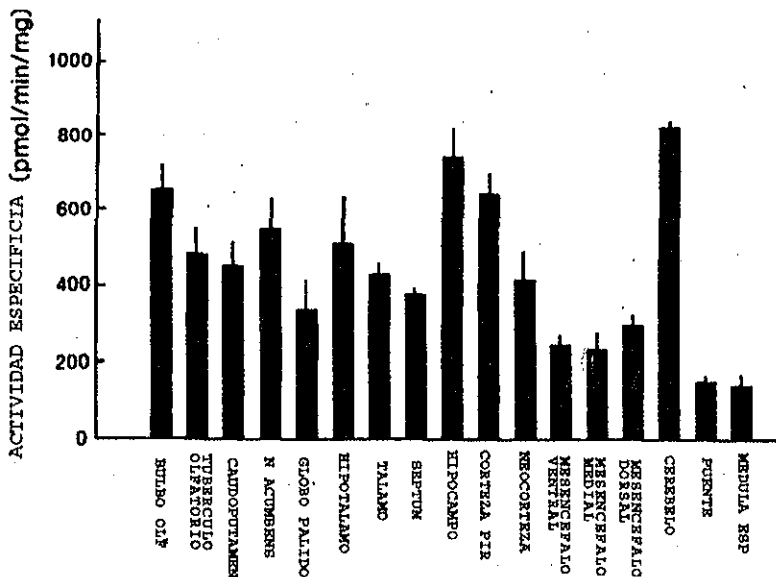


Figura 14. Gráfica que muestra la distribución de receptores con actividad de tirosina cinasa en el cerebro de rata. Girault, J-A., *Neurochem. Int.* 1993; 23:1-25.

tejidos, incluyendo el cerebro (figura 14). La actividad de estas proteínas, así como el tipo de virus que a través de los cuales se encontraron, sugirió casi inmediatamente el postulado de que la fosforilación en tirosina juega un papel importante en el crecimiento, sobrevivencia celular, en el cambio morfológico y cáncer. Esto fue parcialmente confirmado con el descubrimiento de los receptores para factores de crecimiento (Girault, J-A, 1993). Los receptores para factores de crecimiento son receptores que se fosforilan en el aminoácido tirosina y muestran una topología más o menos similar entre ellos. Ésta consiste en que al exterior tienen con una larga cadena de aminoácidos con un sitio de unión glucosilado, una región transmembranal hidrofóbica y una región citoplásmica que contiene cuando menos un dominio con actividad catalítica de tirosina cinasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La unión del factor de crecimiento a la cadena larga exterior, acarrea cambios conformacionales del dominio extracelular e induce la oligomerización del receptor. La oligomerización del receptor permite la transmisión de un cambio conformacional del dominio extracelular hacia el dominio citoplásmico sin requerir alteraciones en la posición de los aminoácidos del dominio transmembranal (figura 15). La oligomerización de los receptores es un fenómeno universal entre los receptores para factores de crecimiento. Posteriormente a la oligomerización se produce la endocitosis del complejo factor de crecimiento-receptor para el reciclamiento del receptor (Hunter T, 1995).

Los receptores a factores de crecimiento se les considera sumamente complejos debido a que pueden llegar a activar hasta 10 tipos diferentes de enzimas intracelulares que normalmente forman parte de su sistema de segundos mensajeros (Hunter T, 1995; Hackel PO, 1999; Heldin CH, 1999). En este sentido, estudios *in vitro* han mostrado algo muy interesante y esto es que dos receptores (factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento derivado de plaquetas) tienen casi las mismas enzimas intracelulares como segundos mensajeros, esto ha motivado el desarrollo de muchos estudios (casi todos *in vitro*) para conocer el papel de cada uno de estos receptores en la fisiología celular (Levitzki A, 1995).

Factor de crecimiento epidérmico (EGF). Fue aislado en 1962 de glándulas submaxilares de ratones como un contaminante del factor de crecimiento nervioso (NGF). El EGF mostró capacidad para inducir apertura precoz de ojos y aparición de incisivos en ratones como resultado de la estimulación del crecimiento epidérmico y de la queratinización (Cohen, 1962). Posteriormente, la denominada urogastrona, que inhibe la secreción de ácidos gástricos en la mucosa intestinal y que fue aislada a partir de orina humana, se identificó como EGF (Gregory H, 1975).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

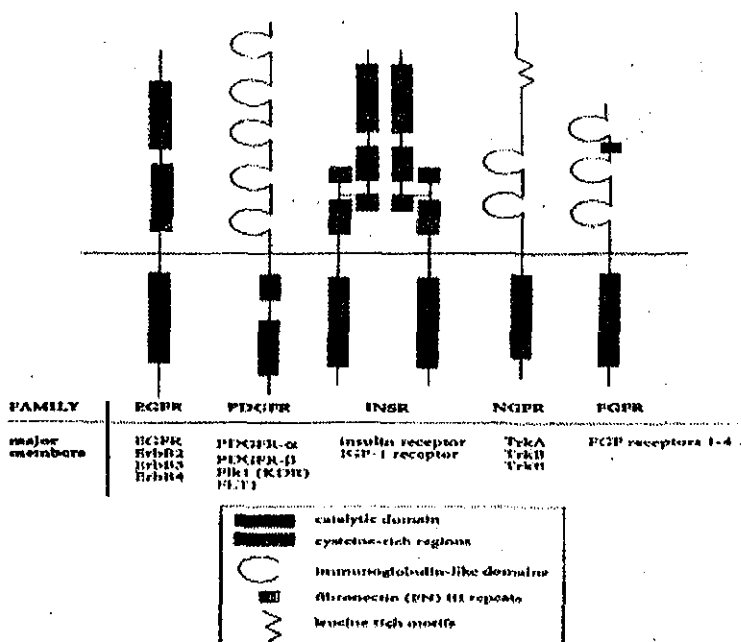


Figura 15. Representación esquemática de algunos miembros de la familia de receptores a factores de crecimiento. EGFR=receptor al factor de crecimiento epidérmico; PDGFR=receptor al factor de crecimiento derivado de plaquetas; INSR=receptor a insulina; NGFR=receptor al factor de crecimiento nervioso; FGFR=receptor al factor de crecimiento a fibroblastos. Schenk PW, Snaar-Jagalska E. *Biochem Biophysica Acta*. 1999; 1449:1-24.

El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos, de los cuales seis son cisteínas que forman tres puentes disulfuro. Estos puentes disulfuro le confieren importantes características para mantener su actividad biológica. Su peso es de 6045 daltones. En ratones, el precursor del EGF es una molécula de 1217 aminoácidos con 66% de homología con el precursor de EGF humano. El EGF

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

El EGF junto a otras moléculas forma una familia de factores de crecimiento debido a la estructura molecular de todos ellos y a que todos aunque con diferente afinidad se unen al receptor para EGF. La familia está compuesta por el factor de crecimiento transformante (TGF) α , la amfiredulina (AR), el factor de crecimiento similar al EGF unido a heparina (HB-EGF), la betacelulina (BTC) y el factor de diferenciación heregulina (NDF/HRG) (Hackel PO, 1999).

Se ha demostrado ampliamente la presencia del ARNm para EGF en varias regiones del cerebro de ratones desde el día 14 embrional. Estas cifras se incrementan paulatinamente hasta llegar a las que tendrán de adultos a los 2 meses en hembras y a los 3 meses en machos. En ratones adultos la concentración de EGF en suero se encuentra en el orden de 350 a 400 pg/ml y en plasma es menor a 5 ng/ml (Perheentupa J, 1985). En humanos la concentración de EGF en suero es de aproximadamente 780 pg/ml en hombres y 604 pg/ml en mujeres. Las cifras plasmáticas oscilan en el rango de 1 a 5 ng/ml (Joh T, 1986). En orina la concentración es de 70 a 80 ng/ml entre los 2 y 20 años de edad; de 30-50 ng/ml entre los 30 y 55 años y menos de 20 ng/ml a los 70 años (Mattila AL, 1986).

El EGF es sintetizado en la glándula submaxilar, riñón, páncreas, intestino delgado, glándula pituitaria y cerebro. También se encuentra en fluidos corporales como saliva, sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, fluidos prostáticos, jugo pancreático y leche (Carpenter G, 1990). En el cerebro se encuentra en el cerebro anterior y medio, así como en áreas pálidas. El EGF fue detectado, por radioinmunoanálisis, en concentraciones que oscilan entre 0.33 a 0.99 ng/g de peso húmedo en cerebro adulto de rata: 0.99 tallo cerebral, 0.56 hipocampo, 0.48 cerebelo, 0.33 diencéfalo y telencefalo (Schaudies RP, 1989).

El EGF, como otros factores de crecimiento, puede actuar de manera autócrina (sobre la misma célula que lo produce), de manera parácrina (sobre las células adyacentes) o endócrina (en tejidos distantes).

EGFR. El EGFR es el receptor para el EGF. Es una proteína transmembranal de 170 kDa, de los cuales 130 kDa corresponden a una cadena polipeptídica y el resto a oligosacáridos. El receptor maduro está compuesto de 1186 aminoácidos y presenta cuatro dominios, un dominio extracelular donde se une el EGF (que es un segmento de 621 aminoácidos), un segmento transmembranal hidrofóbico de 23 aminoácidos, un segmento proximal al citoplasma de 542 aminoácidos donde se une el ATP y un segmento citoplásmico terminal donde ocurre la fosforilación (figura 16 y 19). La unión del EGF al dominio extracelular estimula la actividad de tirosina cinasa provocando la autofosforilación del receptor a nivel intracelular y la activación de diversas vías de segundos mensajeros (figura 16). Similar a otros factores de crecimiento, la unión del EGF a su receptor va seguida de cambios en la morfología de la superficie celular, lo que conlleva la internalización (endocitosis) del complejo EGF-receptor provocando un decremento de la densidad de receptores. La familia de receptores al EGFR está compuesta por los receptores Neu/ErbB-2/HER2, ErbB-3/HER3, y ErbB-4/HER4, que son estructuralmente similares al EGFR. (Hackel PO. 1999). Se ha detectado la presencia de receptores para EGF, desde el día 15 embrionario teniendo un incremento el día 19; estas cifras disminuyen progresivamente hasta el día postnatal 11, para posteriormente incrementar hasta las cifras que mantendrán de adultos (Gómez-Pinilla F, 1988). Estudios de inmunolocalización, autoradiografía e inmunohistoquímica realizados en el cerebro de ratas adultas muestran la presencia de EGFR en neuronas y menos en astrocitos. Principalmente en regiones corticales (capas IV y V), hipocampo (giro dentado y CA), amígdala, sustancia negra, caudoputamen, estriado, zonas ventriculares y subventriculares y cerebro basal anterior (Quirion R, 1988; Wiedermann CJ, 1988; Plata-Salaman CR. 1991).

Efectos en neuronas. En cerebros embrionarios el EGF promueve el crecimiento y actúa como un mitógeno sobre neuronas. Estimula el crecimiento, sobrevivencia, proliferación de neuronas en retina, epitelio olfatorio y en mesencéfalo. En cerebros adultos promueve el crecimiento, maduración y sobrevivencia de neuronas. Se ha sugerido que los efectos observados en neuronas, pueden ser el resultado no únicamente de la acción directa de este factor de crecimiento sobre ellas sino también de un efecto secundario a través de las células gliales, esto

realizado *in vitro*. Las células gliales pueden liberar factores neurotróficos en respuesta a EGF y/o ejercer los efectos a través de una interacción glia-neurona. (Carpenter G, 1990).

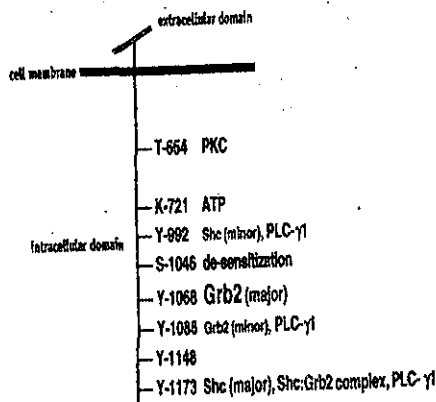


Figura 16. Representación esquemática del receptor a EGF (EGFR) y sus potenciales enzimas intracelulares acopladas a este receptor. Arregui CO. *Neurochem Res.* 2000; 25:95-105.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En comparación con el EGF, del PDGF sabemos poco. Es un polipéptido de 30 kDa que fue identificado en 1974 simultáneamente por N. Kohler y R. Ross en plaquetas humanas como un potente mitógeno para fibroblastos, osteoblastos, células del músculo liso y gliales. (Kohler N, 1974; Ross R, 1974). Existen tres isoformas de PDGF, las homodiméricas (PDGF-AA, BB) y la heterodimérica (PDGF-AB). Las tres son resultado de la unión por medio de puentes disulfuro de dos cadenas polipeptídicas denominadas como A y B (figura 17) (Claesson Welsh

L, 1994). Tanto el PDGF como su receptor (PDGFR) se encuentran en fibroblastos, células de Leydig, células endoteliales, cerebro, útero, mama, ojo y células sanguíneas. En el cerebro, se localiza, principalmente en corteza, estriado, hipocampo, tálamo, sustancia negra, cerebelo, tallo cerebral, hipotálamo, pituitaria y médula espinal. (Yeh HJ, 1991; Sasahara M, 1991). Evidencias *in vitro* sugieren que el PDGF promueve el crecimiento neurítico, la sobrevivencia de neuronas, estimulan la quimiotaxis, el metabolismo y la proliferación celular. (Claesson WL, 1994; Heldin CH, 1999). La eliminación de los genes que producen las cadenas que forman el PDGF o de sus receptores provoca la muerte de ratones durante la etapa embrionaria, en el caso de la cadena B y receptor β ; y la muerte a las tres semanas posteriores al nacimiento en el caso de la cadena A y receptor α . Las alteraciones observadas son en el desarrollo de los riñones, venas y arterias, pulmones y malformaciones cerebrales (Heldin CH, 1999).

PDGFR. Se han descrito dos receptores para el PDGF, denominados como PDGFR- α y PDGFR- β con diferentes afinidades a cada una de las isoformas de PDGF. Al PDGFR- β se le unen el PDGF-BB con una alta afinidad (K_d 0.5 nM) y el PDGF-AB con baja afinidad (K_d 2.5 nM) en tanto que para el PDGF-AA no se ha descrito afinidad. Para el PDGFR- α se le unen las tres isoformas con afinidades similares (K_d 0.1-0.5 nM). Ambos receptores se encuentran en las mismas regiones cerebrales (Oumesmar NB, 1997; Heldin CH, 1999).

El PDGFR- α está formado por 1063 aminoácidos en tanto que el PDGFR- β contiene 1067 aminoácidos. Los precursores de estos receptores provenientes del retículo plasmático pesan 140,000 y 160,000 Daltons y mediante el proceso de maduración o glucosilación llegan a pesar 170,000 y 190,000. El

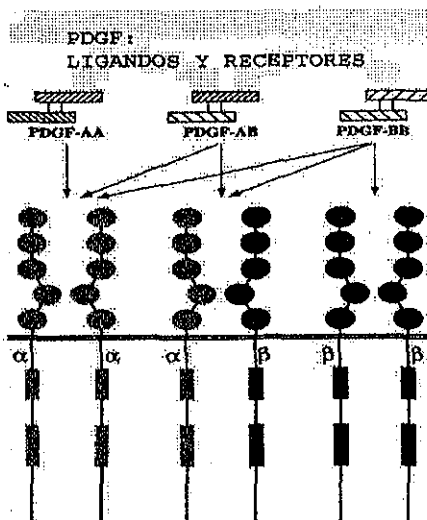


Figura 17. Representación esquemática de los tres tipos de PDGF que se unen a los tres tipos de receptores a PDGF. Arregui CO. *Neurochem Res.* 2000; 25:95-105

dominio extracelular está dividido en cinco subdominios semejantes a inmunoglobulinas, de los cuales tres están unidos por puentes disulfuro, mismos que están involucrados en la capacidad de unión del PDGF. Un rasgo único es que el dominio de cinasa intracelular está separado de la membrana por un segmento de 100 aminoácidos dando lugar, al parecer, a dos dominios de cinasa (figura 15, 18 y 19) (Claesson WL, 1994; Heldin CH, 1999). La unión del PDGF a su receptor induce la dimerización del segundo tanto *in vivo* como *in vitro*. Dependiendo de la isoforma del PDGF se forman los homo o heterodímeros del receptor. Para el PDGF-AA se induce los homodímeros PDGFR- $\alpha\alpha$, en tanto que para el PDGF-AB induce PDGFR- $\alpha\alpha$ y PDGFR- $\alpha\beta$ y por último el PDGF-BB induce los tres tipos de dímeros ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$). La activación de este receptor se realiza por medio de la unión del ligando a su receptor, continua con la dimerización, la activación del dominio de cinasa del receptor, la activación de varias vías de segundos mensajeros (figura 18) y el cambio de conformación finaliza con la internalización del complejo (Claesson WL, 1994; Heldin CH, 1999).

Como se describió previamente, una de las características comunes en estos dos receptores (PDGFR y EGFR) es la utilización de casi las mismas enzimas intracelulares como sus principales vías de segundos mensajeros. Éstas son la PI3K, MAPK, Scr y Jak/Stat, su fosforilación al parecer tiene el objetivo de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

transmitir al núcleo neuronal las señales del exterior (Claesson WL, 1994; Heldin CH, 1999; Soderling TR 2000; Sweatt JD, 2001)

PI3K. Es conocida como fosfatidil inositol 3 cinasa. Esta enzima está compuesta de dos unidades, la catalítica denominada p110 y la subunidad regulatoria p85 (figura 19). Se le ha involucrado en la reorganización de los filamentos de actina, quimiotaxis, crecimiento y antiapoptosis (Schenk PW, 1999; Offen D, 2000).

MAPK-ERK. La activación de esta vía, una de las principales, sino es que la principal (figura 19), se lleva a cabo mediante la proteína Grb2 que se une a la proteína Sos y activa a Ras y posteriormente a Raf, el cual a su vez activa la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK). Esta vía está relacionada con el crecimiento celular, migración y diferenciación (Schenk PW, 1999; Sweatt JD, 2001).

Src. Se caracterizan por la presencia de dominios SH2 y SH3 en el sitio catalítico. Son una familia con muchos miembros, que se puede translocar muy rápidamente hacia el núcleo, después de su activación (figura 19). Estas proteínas han sido involucradas en la reorganización del citoesqueleto, dolor, alcoholismo, inmunidad, memoria (Fyn), crecimiento, movimiento celular y cáncer (Schenk PW, 1999; Soderling TR, 2000).

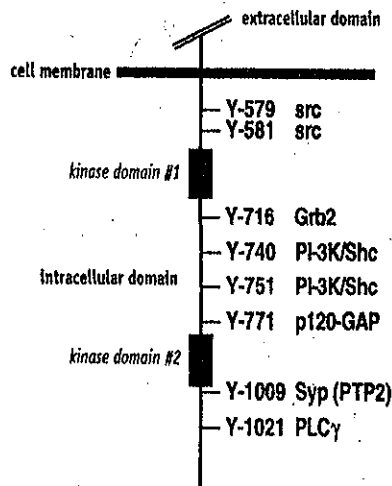


Figura 18. Representación esquemática del receptor a PDGF (PDGFR) y sus potenciales enzimas intracelulares acopladas a este receptor. Arregui CO. *Neurochem Res.* 2000; 25:95-105.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Jak2/Stat. Es una familia compuesta de siete miembros, hasta ahora. Después de la fosforilación del receptor, el complejo Jak/stat se dimeriza y se transloca al núcleo para activar factores de transcripción (figura 19). Se les ha implicado en procesos como cáncer, inflamación, inmunidad, enfermedades neurodegenerativas y obesidad (Schenk PW, 1999; Heldin CH, 1999; Soderling TR, 2000). Hasta la fecha nadie ha reportado efecto alguno sobre el patrón de sueño de cualquiera de estas moléculas o como consecuencia del bloqueo de receptores

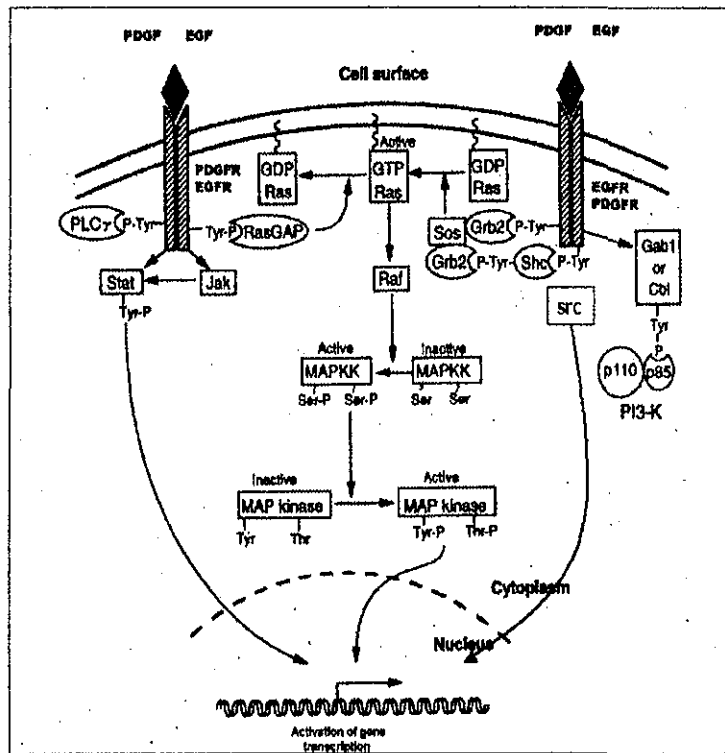


Figura 19. Diagrama general que muestra las enzimas intracelulares o segundos mensajeros acoplados a los receptores a PDGF y EGF. Schenk PW. *Biochem Biophysica Acta*. 1999; 1449:1-24.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SIDA

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una pandemia que se ha extendido rápidamente, constituyéndose una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Fue descrita en 1981 por Michel S. Gottlieb como un padecimiento caracterizado por depresión de la inmunidad mediada por células, seguida de la aparición de infecciones oportunistas por agentes infecciosos poco usuales.

El virus que causa el sida es conocido como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Es un miembro de la familia de los lentivirus, que a su vez han sido ligados a enfermedades inmunológicas y del sistema nervioso central con largos periodos de incubación (Fauci AS, 1993).

El VIH requiere del aparato genético del huésped para replicarse. El virus tiene dos copias de ARN de cadena única y con sentido positivo,

es decir, puede actuar como ARN mensajero. La longitud del ARN es alrededor

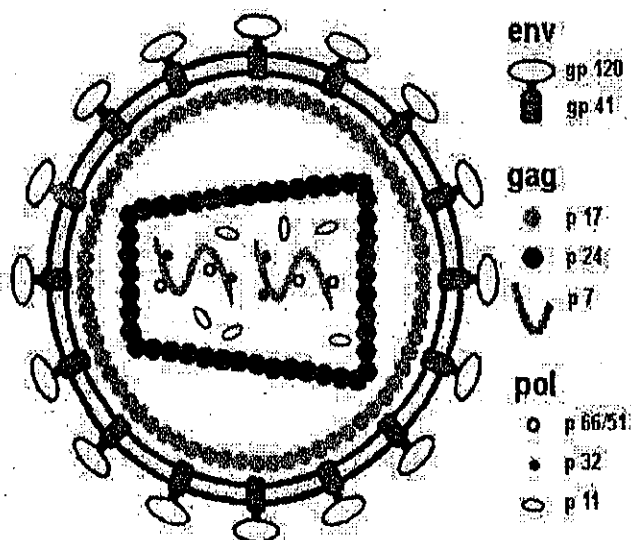


Figura 20. Esquema que muestra al virus del sida y tres de los principales genes: gag, pol y env. Estos genes codifican los principales componentes estructurales y funcionales del virus. Env codifica las proteínas gp120 y gp41. Gag codifica a las proteínas de la nucleocápside p55, p40, p24, p17 y p7. Pol codifica a las proteínas p66 y p51 que forman la transcriptasa reversa, p11 una proteasa y p32 una integrasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de las 10 mil bases. Las proteínas encontradas dentro de la nucleocápside del virus se les denomina p7 (7,000 daltones) y p9 (9,000 daltones) y se encuentran unidas al ARN viral, funcionando como moléculas protectoras contra la acción de la ribonucleasas. Junto a éstas se encuentra la p31 (endonucleasa/integrasa) y la p51/p66 (transcriptasa reversa). Rodeando al ARN está la nucleocápside viral compuesta por la proteína p24, que es la mas abundante; rodeando al núcleo se encuentra otra capa de proteínas o envoltura viral formada por la p17. Por último, se encuentra la cápside viral donde se encuentran dos glucoproteínas (gp) 120 y 41, conocidas como gp120 y gp41, las cuales unidas se les conoce como gp160 (figura 20) (ver Sánchez-Alavez M, 1999).

El proceso viral comienza con la unión del VIH a las células inmunes cooperadoras y a las líneas celulares monocito/macrófago. Esta unión se realiza mediante la gp120 del virus y las moléculas CD4 de las células inmunes además de algunos cofactores (figura 21). Al formarse el complejo gp120-CD4 se realiza la internalización del complejo (virus anticuerpo). Después de esta unión, el núcleo viral entra a la célula donde libera las dos cadenas idénticas de ARN. La información viral contenida en el ARN es transcrita a ADN por medio de la transcriptasa reversa dependiente de la polimerasa. Esta enzima hace una copia de ADN de una sola cadena, después se realiza la destrucción de la cadena de ARN por la ARNasa viral, y la polimerasa usa de nuevo el ADN como plantilla y hace una copia complementaria, formando así un ADN de doble cadena. Este ADN migra al núcleo y es integrado al genoma del huésped a través de una integrasa. (ver Sánchez-Alavez M, 1999).

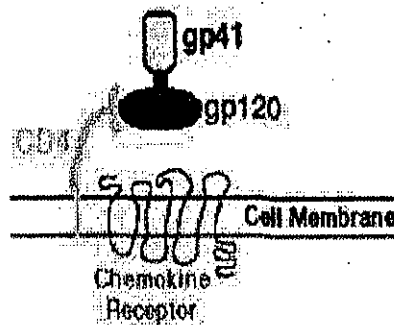


Figura 21. Diagrama que muestra la forma teórica de unión del VIH y elementos correceptores.

Demencia, HIVgp120 y sueño. En 1989, Atkinson describió un complejo demencial asociado al SIDA (DAS) de tipo subcortical en el que interviene un deterioro neuropsicológico demostrable por la lentitud de los movimientos, del control motor, la atención y la resolución de problemas aritméticos y de ejecución visoespacial. La prevalencia de la DAS varía ampliamente, ya que sólo 3% de los pacientes adultos tiene como primera manifestación de la infección alteraciones neuropsicológicas; mientras que en estados avanzados de la enfermedad la cifra oscila entre 20 y 30% de los pacientes adultos y 50% de pediátricos. El tiempo medio de supervivencia es de seis meses (Epstein LG 1988; Portegies P, 1994; McArthur JC, 1999). Además de estos cambios neuropsicológicos, se han descrito en algunos pacientes alteraciones en la arquitectura del sueño desde los primeros estadios de la infección por HIV y en la mayoría en estados avanzados. Por ejemplo, incremento y distribución anormal de sueño lento en la segunda mitad de la noche, decremento y fragmentación en el tiempo total de sueño y somnolencia diurna (Kubicki S, 1988; Norman SE, 1990; Darko DF, 1995, White JL, 1995). Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido demostrar que las neuronas sean infectadas por el VIH, por lo que se cree que los síntomas neurológicos que presentan los pacientes con sida pueden deberse a) algún factor derivado del virus con capacidad de difundir en el entorno neuronal y que actúe en forma indirecta; es decir, que afecta a la microglía y ésta libere moléculas potencialmente tóxicas, como alguna subfamilia de citocinas (factor de necrosis tumoral α o interleucinas) o b) mecanismo directo, donde dicho factor soluble se una a algún receptor (CXCR4, CCR5).

Una proteína que podría actuar por las dos vías propuestas y que está bajo estudio debido a los efectos neurológicos que produce es la glucoproteína 120. Estudios *in vitro* utilizando la glucoproteína gp120 derivada del virus de la inmunodeficiencia humana (HIVgp120) han mostrado su capacidad neurotóxica en cultivos de neuronas de hipocampo y corteza. Mientras que en estudios *in vivo* se ha observado la capacidad de la HIVgp120 de llegar al cerebro después

de ser inyectadas por vía sistémica en ratas, provocar distrofia y modificaciones en la arborización de neuronas piramidales de la corteza, neurotoxicidad en neuronas del hipocampo, retardo en el desarrollo de conductas motoras y alteraciones en tareas de aprendizaje y memoria (Hill JM, 1993; Brennehan DE, 1994).

Investigaciones realizadas y publicadas por nuestro grupo han mostrado que la administración crónica (en el ventrículo lateral) de HIVgp120 y de gp120 derivada del virus de la inmunodeficiencia felina (FIVgp120) producen alteraciones conductuales y electrofisiológicas. Los estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la administración crónica de HIVgp120 y FIVgp120 en ratas incrementa el porcentaje de vigilia y sueño lento 1, mientras que disminuye sueño lento 2 y el sueño MOR (figura 22). Además, ambas proteínas deterioran la ejecución de ratas en el laberinto de Barnes

(Sánchez-Alavez M, 2000). En estudios electrofisiológicos, la HIVgp120 disminuye la inducción y el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP) mientras que la FIVgp120 produce cambios en la latencia de potenciales evocados corticales y visuales. Además, ambas proteínas disminuyen la

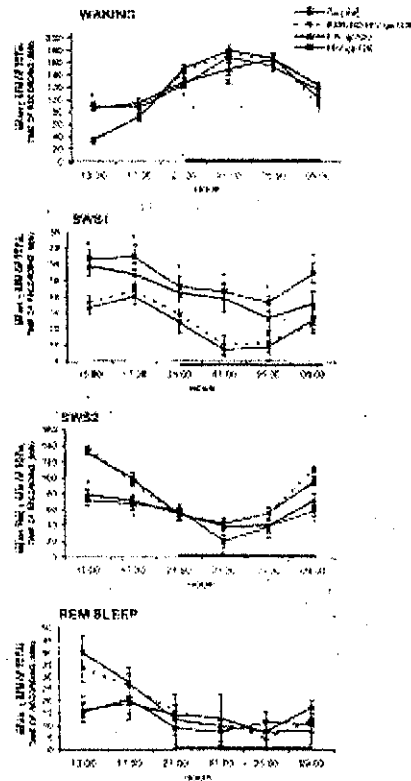


Figura 22. Cambios en el patrón de sueño asociados con la administración crónica de HIVgp120 y FIVgp120 en ratas. Sánchez-Alavez M Neurobiol. Dis. 2000;7:384-394.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

producción de AMPc en hipocampo (Prospero-García O, 1999; Galicia O, 2000; Sánchez-Alavez M, 2000).

Esta gama de alteraciones conductuales, fisiológicas y bioquímicas que produce la administración de HIVgp120 y FIVgp120 en ratas ha sido propuesta como un modelo de las manifestaciones neuropsiquiátricas y neuropatológicas asociadas con el sida (Brenneman, 1994; Sánchez-Alavez M, 2000). Pero los efectos crónicos van precedidos por efectos agudos que pueden ser determinados inmediatamente después de una sola inyección de estas proteínas. En este sentido, se

ha reportado que la administración aguda de 100 ng de FIVgp120 disminuye el sueño lento 2 y el sueño MOR (figura 23) (Prospero-García O, 1994, 1999).

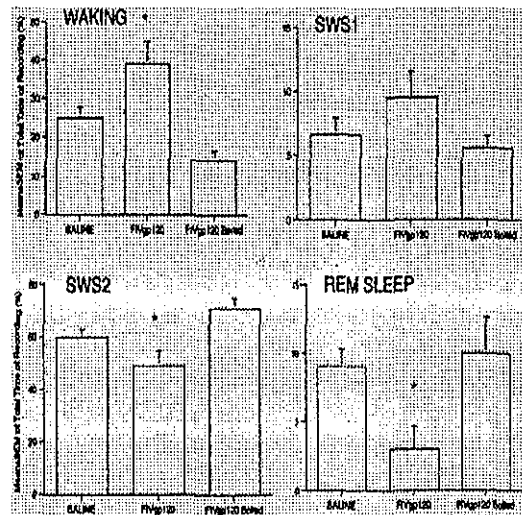


Figura 23. La administración aguda de FIVgp120 disminuye el sueño lento 2 y el sueño MOR en ratas. Prospero-García O. *Brain Res.* 1999; 836:203-209.

Por el contrario, la administración intracerebroventricular de HIVgp120 (100 ng) en ratas incrementa el sueño de ondas de lentas y sueño MOR (Opp MR, 1996). Profundizando en los efectos agudos de estas proteínas encontramos que estudios *in vitro* han mostrado que la administración aguda de HIVgp120 a cultivos neuronales produce alteraciones en enzimas intracelulares. Lannuzel en 1997 y Meoucci en 1998, por separado, reportaron que dosis picomolares de HIVgp120 alteran la fisiología interna de las neuronas mediante la rápida y sostenida activación de una enzima intracelular denominada proteína cinasa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

activadora de mitógenos (MAPK-ERK) (figura 24). (Lannuzel A,1997; Meoucci O,1998)

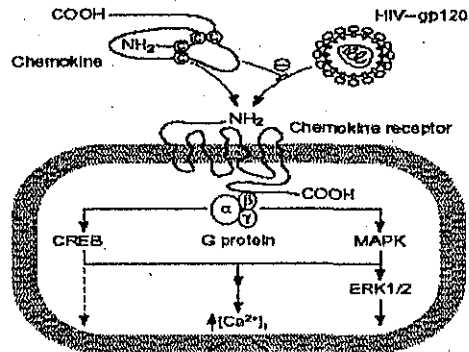


Figura 24. Modelo del posible mecanismo de acción y la posible interacción entre las quimocinas y la HIVgp120. Asencio BC TINS. 1999; 22:504-512.

HIPÓTESIS

- 1) Los factores de crecimiento participan en la generación del sueño.
- 2) La MAPK-ERK media las alteraciones del sueño inducidas por la HIVgp120.

OBJETIVOS

Objetivos que la primera hipótesis persigue:

- a) Bloquear los receptores a factores de crecimiento y evaluar el efecto agudo sobre el sueño.
- b) Evaluar la función de las principales vías de segundos mensajeros acoplados a estos receptores en la generación del sueño. Para esto utilizaremos inhibidores de cada una de las siguientes proteínas cinasas: MAPK-ERK, Src, JAK2/Stat y PI3K.

Objetivos que la segunda hipótesis persigue:

- c) Validar el efecto agudo de la HIVgp120 sobre el sueño en ratas.
- d) Evaluar si el efecto agudo de la HIVgp120 sobre el sueño es inhibido por el bloqueo de la activación de la MAPK-ERK.

HIPÓTESIS

- 1) Los factores de crecimiento participan en la generación del sueño.
- 2) La MAPK-ERK media las alteraciones del sueño inducidas por la HIVgp120.

OBJETIVOS

Objetivos que la primera hipótesis persigue:

- a) Bloquear los receptores a factores de crecimiento y evaluar el efecto agudo sobre el sueño.
- b) Evaluar la función de las principales vías de segundos mensajeros acoplados a estos receptores en la generación del sueño. Para esto utilizaremos inhibidores de cada una de las siguientes proteínas cinasas: MAPK-ERK, Src, JAK2/Stat y PI3K.

Objetivos que la segunda hipótesis persigue:

- c) Validar el efecto agudo de la HIVgp120 sobre el sueño en ratas.
- d) Evaluar si el efecto agudo de la HIVgp120 sobre el sueño es inhibido por el bloqueo de la activación de la MAPK-ERK.

MÉTODOS

Se utilizaron 160 ratas macho de la cepa Wistar con peso entre 250-300 g. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (1 ml/kg) para implantarles, por cirugía estereotáxica, un grupo de microelectrodos para registro convencional de sueño. Uno de los electrodos se ubicó en la región frontal, que fue la tierra. Dos en las regiones parietales que funcionaron como electrodos de registro de la actividad eléctrica cortical y dos electrodos que se insertaron en los músculos de la nuca para obtener el tono muscular. Además de los electrodos, se insertó una cánula de acero inoxidable (G23) dirigida al ventrículo lateral (L:1.0 mm, AP:0.9 mm, P:3.8 mm, referente a bregma) para administración de los fármacos. Los electrodos y la cánula fueron fijados al cráneo de la rata mediante cemento dental. Una vez terminada la cirugía, las ratas permanecieron en cajas individuales de plexiglas (36 x 27 x 19 cm) cuando menos una semana para recuperación. Todas las ratas estuvieron bajo ciclo luz oscuridad 12:12 (luz 8:00 am) y con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Una vez recuperadas de la cirugía, todas las ratas fueron manipuladas gentilmente y se simuló las condiciones de inyección ICV. Se corroboró el libre paso de 5 μ l de solución salina para estar seguros de la posición de la cánula en el ventrículo y solamente las ratas con cánula permeable (libre flujo de la solución) fueron incluidas en la siguiente fase experimental. Las ratas incluidas fueron habituadas a las condiciones de registro de sueño cuando menos durante las 24 horas previas al experimento.

El día del experimento fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos. Para conocer el papel de los receptores a EGF y PDGF así como algunos de sus segundos mensajeros se utilizó: Genisteína (Inhibidor no específico de receptores con actividad de tirosina cinasa) n=11; AG1296 (PDGFR) n=14; AG1478 y Compuesto 56 (EGFR) n=19; Tirfostina A (control negativo para genisteína y compuestos AG) n=5; PD98059 y U0126 (MAPK-ERK) n=15; Herbimicina A (Src no específico) y PP1 (Src específico) n=14, PP3 (control negativo para PP2) n=5; AG490 (Jak2/Stat) n=14; Wortmanina (no

específico PI3K) y LY294002 (específico PI3K) n=15. Para conocer el papel de la MAPK en las alteraciones agudas del sueño producidas por la HIVgp120 se formaron los siguientes grupos: HIVgp120 n=8; HIVgp120 hervida (100 °C durante 30 minutos para inactivar la proteína) n=7; U0126 (inhibidor de la MAPK-ERK) n=5; U0126 + HIVgp120, n=6; SB202190 (p38-MAPK) n=6 y SB202190 + HIVgp120 n=9.

Todos los fármacos fueron diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo, a excepción de la HIVgp120 que fue diluida en solución salina. El volumen inyectado en todos los casos fue de 5µl. El grupo control recibió únicamente 5µl DMSO. Este grupo fue comparado con el clásico grupo control que recibió 5µl de solución salina, o una combinación de ambos (2.5µl solución salina + 2.5µl DMSO) esto con el fin de determinar posibles efectos del DMSO. Además, se realizaron experimentos adicionales para determinar posibles efectos de la estructura química de los compuestos utilizados. Por lo anterior se usaron los compuestos Tirfostina A, que es un control negativo, para los compuestos AG y PP3, un control negativo, para los compuestos PP. Todos los fármacos fueron administrados a través de la cánula al ventrículo lateral utilizando una jeringa Hamilton. El tiempo de inyección fue cuando menos de 5 minutos. Inmediatamente después de inyectado el fármaco se inicio el registro electroencefalográfico con duración de cuatro horas (10:00 a 14:00). Durante este lapso las ratas fueron vigiladas por el experimentador a través de la ventana de cada cámara sonoamortiguada para determinar posibles efectos conductuales de los tratamientos. Los registros obtenidos fueron calificados visualmente en épocas de 15 segundos y tomando en consideración las fases antes descritas (introducción) y denominadas: vigilia (V); sueño de ondas lentas 1 (SOL1); sueño de ondas lentas 2 (SOL2) y sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR).

Los parámetros obtenidos después de la calificación de los registros fueron: tiempo total de cada fase (en minutos y en porcentaje); frecuencias, latencias y

duraciones promedio de cada fase. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando Anova (one-way) seguida de comparaciones múltiples utilizando la prueba de Bonferroni. Únicamente las frecuencias fueron comparadas estadísticamente con la prueba de Kruskal-Wallis seguida por Dunn's. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el software comercial *SigmaStat* versión 1.0 (Jandel Corporation, 1992). Los resultados que mostraron un valor de $p < 0.050$ fueron tomados en consideración. Para mayor facilidad en el análisis de los datos obtenidos se muestran gráficas y tablas. Los datos detallados por tratamiento con referencia a todas las variables determinadas pueden ser consultados en los anexos 1 y 2 al final del texto.

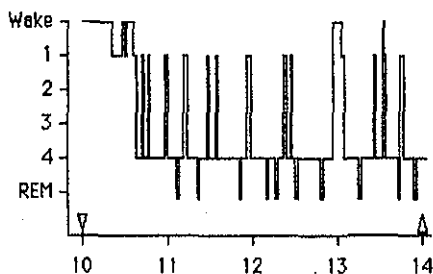
RESULTADOS

Grupos control. Por las características químicas de los compuestos utilizados fue necesario disolverlos en DMSO; sólo la HIVgp120 fue disuelta en solución salina fisiológica. Con el fin de determinar posibles efectos del vehículo, se llevaron a cabo experimentos previos dirigidos a

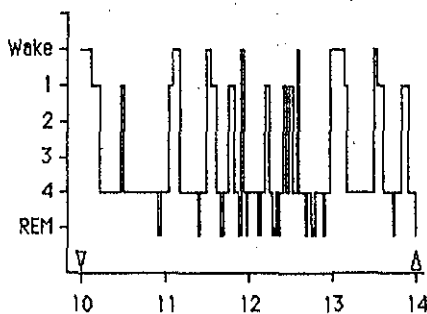
compararlos. Los datos obtenidos (ver tabla 1 y figura 25 y 26) muestran que ninguno de los siguientes tres tratamientos: 1) 5µl de solución salina, 2) 5µl de DMSO, 3) 2.5µl de solución salina más 2.5µl de DMSO alteraron las fases del ciclo sueño-vigilia, vigilia ($F=0.5$, $p=0.5$), SOL1 ($F=0.4$, $p=0.6$), SOL2 ($F=0.5$, $p=0.5$) y SMOR ($F=0.5$, $p=0.9$).

Además de los experimentos realizados para comparar los

diferentes vehículos, también se realizaron otros experimentos para determinar posibles efectos de la estructura química de los inhibidores de proteínas cinasas. Esto se realizó mediante la inyección de compuestos inertes pero con la misma estructura química y aproximado peso molecular (Tirfostina A y PP3). Estos compuestos han sido validados previamente en otros modelos experimentales como controles negativos (Oh U, 1995; Abdul-Ghani MA, 1996;



A



B

Figura 25. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 5µl de solución salina (A) o 5µl de DMSO (B). Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Paillart C, 1997; Portier B, 1999). La comparación de los diferentes grupos mediante anova one way no mostró efecto alguno en las fases determinadas de: vigilia ($F=0.3$, $p=0.8$), SOL1 ($F=0.8$, $p=0.4$), SOL2 ($F=0.6$, $p=0.6$) y SMOR ($F=0.7$, $p=0.9$) (ver tabla 1 y figura 26, A y B). Las demás variables determinadas, como frecuencia, latencia y duración promedio, no fueron alteradas. Para detalles ver anexo 1.

Tabla 1. GRUPOS CONTROL Y FASES DE SUEÑO

EFFECTOS DE LOS DIFERENTES VEHÍCULOS (SOLUCIÓN SALINA Y DMSO) Y DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA GENERAL (TIRFOSTINA A Y PP3) DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS

| | VIGILIA | SOL1 | SOL2 | SMOR |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| SALINA n=11 | 24.40±2.6 | 13.20±1.5 | 53.70±2.6 | 8.80±1.1 |
| SALINA + DMSO n=5 | 22.20±1.5 | 11.60±0.9 | 58.30±1.5 | 8.50±0.3 |
| DMSO n=10 | 20.70±2.8 | 14.10±1.5 | 56.60±3.1 | 8.10±0.8 |
| TIRFOSTINA A n=5 | 20.90±1.6 | 11.48±0.7 | 59.50±1.5 | 8.04±0.3 |
| PP3 n=5 | 22.80±2.5 | 10.40±1.3 | 58.80±2.4 | 7.58±0.3 |

Porcentaje de tiempo total (media ± EEM)

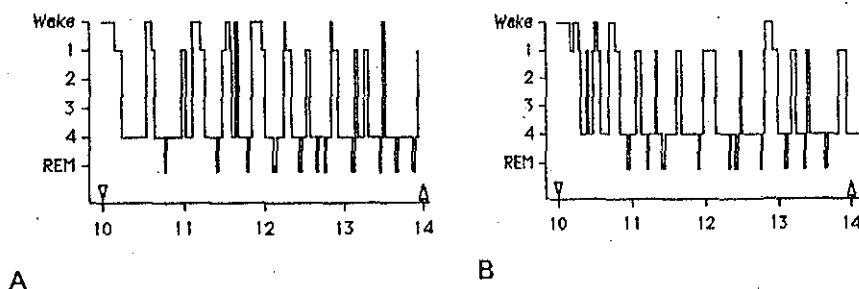
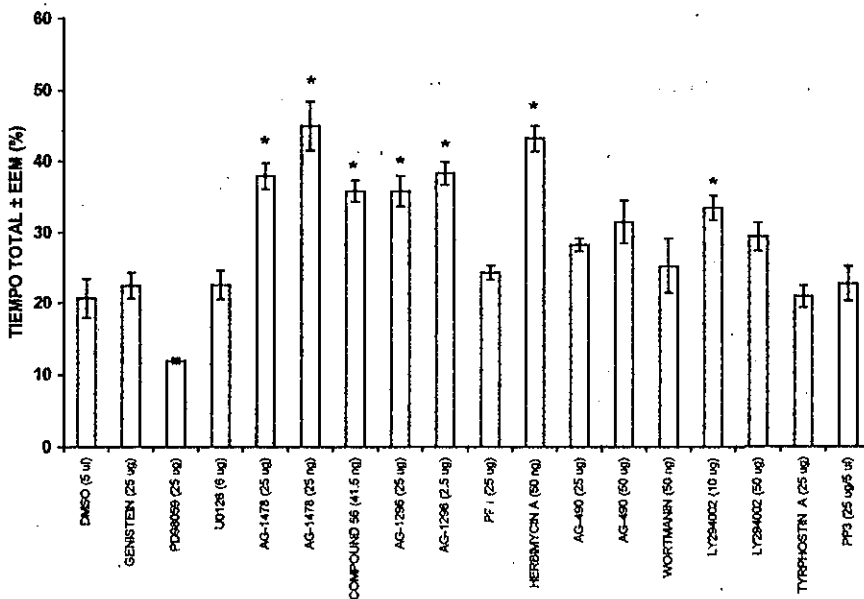


Figura 26. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 25 µg/5 µl de Tyrfoestina A (panel A) o 25 µg/5 µl de PP3 (panel B). Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tirosinas cinasas
Vigilia

PROTEINAS CINASAS y VIGILIA



Gráfica 1. Efectos de los inhibidores de los receptores a EGF y PDGF así como de sus segundos mensajeros sobre el porcentaje de vigilia a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y la dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media de cada grupo y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs DMSO.

Los resultados obtenidos se presentan en porcentaje del tiempo total del registro por fase del ciclo sueño-vigilia para dar mayor claridad a los cambios obtenidos en cada tratamiento. La genisteína, un inhibidor general de proteínas tirosina cinasas no modifico el porcentaje de vigilia (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $22.5 \pm 1.9\%$; $p = \text{NS}$). Al analizar el efecto promedio de la inhibición de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

receptores estudiados (EGFR y PDGFR) utilizando los compuestos AG1478, compuesto 56 y AG1296 responsables los dos primeros de la inhibición del receptor a EGF y el tercero a PDGF, se observa un incremento de 86% de vigilia (promedio de las cinco dosis utilizadas, ver gráfica 1).

Al analizar por separado cada receptor, observamos que la inhibición del receptor a EGF utilizando los compuestos AG1478 y Compuesto 56 (ver gráfica 1), ambos produjeron un incremento promedio, a las tres dosis utilizadas, de 90% de vigilia en comparación al control. El efecto más evidente fue observado con el compuesto AG1478 a la dosis de 25 ng (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $44.9 \pm 3.5\%$, $p < 0.05$), seguido por el mismo compuesto a la dosis de 25 μg (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $37.9 \pm 1.8\%$, $p < 0.05$) y por el compuesto 56 (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $35.8 \pm 1.5\%$ $p < 0.05$). El incremento en el porcentaje de vigilia observado durante las cuatro horas de registro en los tres grupos no se vio reflejado en cambios estadísticamente significativos en la duración promedio de la vigilia o en su frecuencia, ver anexo 1.

En el caso del receptor a PDGF, el incremento promedio con las dos dosis utilizadas fue de 71% en comparación al grupo control. El mayor efecto fue observado a la dosis de 2.5 μg de AG1296 (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $38.3 \pm 1.6\%$, $p < 0.05$) inmediatamente seguido por la dosis de 25 μg (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $35.8 \pm 2.1\%$, $p < 0.05$) (ver gráfica 1). El incremento en el porcentaje de vigilia observado no se vio reflejado estadísticamente en las variables de duración y frecuencia (ver anexo 1).

Analizando los efectos de los inhibidores de los segundos mensajeros asociados con estos receptores, encontramos que de los dos compuestos que inhiben la enzima MAPK-ERK como son U0126 y PD98059, solamente en un caso (PD98059) se observó un efecto que incidió sobre el porcentaje de vigilia durante las cuatro horas de registro (ver gráfica 1). El grupo tratado con PD98059 presentó un menor porcentaje de vigilia en comparación al grupo

control (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $11.9 \pm 0.4\%$, $p=NS$) pero no fue estadísticamente significativo. En tanto que el grupo tratado con U0126 no se vio afectado (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs $22.6 \pm 2.1\%$, $p=NS$).

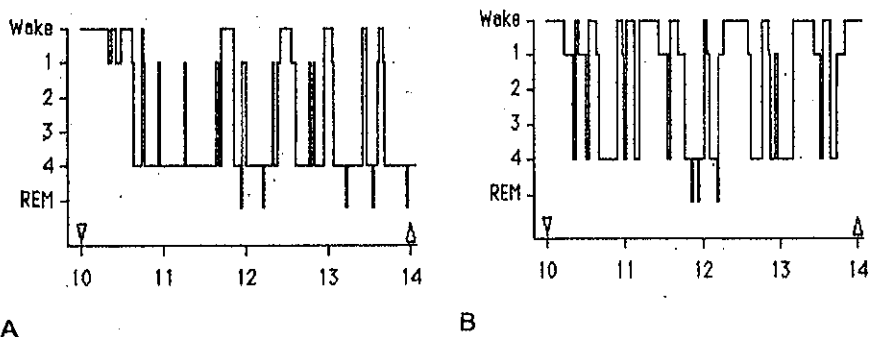


Figura 27. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de PP1 (panel A) o 41.5 $\text{ng}/5 \mu\text{l}$ de Herbimycin A. (panel B). Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

El efecto observado sobre la vigilia con los compuestos PP1 y Herbimycin A, ambos con antecedentes de inhibir la acción de las proteínas Src, es de un comportamiento diferente (ver gráfica 1 y figura 27). En tanto PP1 a dosis de 25 μg no modifica el porcentaje de vigilia (control $22.7 \pm 2.8\%$ vs $24.4 \pm 1.0\%$, $p=NS$) si lo hace Herbimycin A a dosis de 50 ng (control $22.7 \pm 2.8\%$ vs $43.1 \pm 1.8\%$, $p < 0.05$). El incremento observado en el porcentaje de vigilia en este último grupo no se vio reflejado en cambios estadísticamente significativos en la duración promedio de la vigilia y en su frecuencia (ver anexo 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El efecto observado en los grupos que recibieron el inhibidor de la enzima Jak2/Stat, (compuesto AG490) es consistente a las dos dosis utilizadas (ver gráfica 1 y figura 28). El

grupo que recibió la dosis de 25 μg presentó un incremento no significativo en el porcentaje de vigilia (control $20.7 \pm 2.8\%$ 28.3 ± 0.9 , $p=\text{NS}$), al igual que el grupo que recibió la dosis de $50 \mu\text{g}$, en el cual se observó un incremento no significativo del porcentaje de vigilia (control 20.7 ± 2.8 vs $31.5 \pm 3.0\%$, $p=\text{NS}$). Estos leves incrementos no se reflejaron en las variables de frecuencia o duración promedio de la vigilia. Para mayores detalles ver anexo 1.

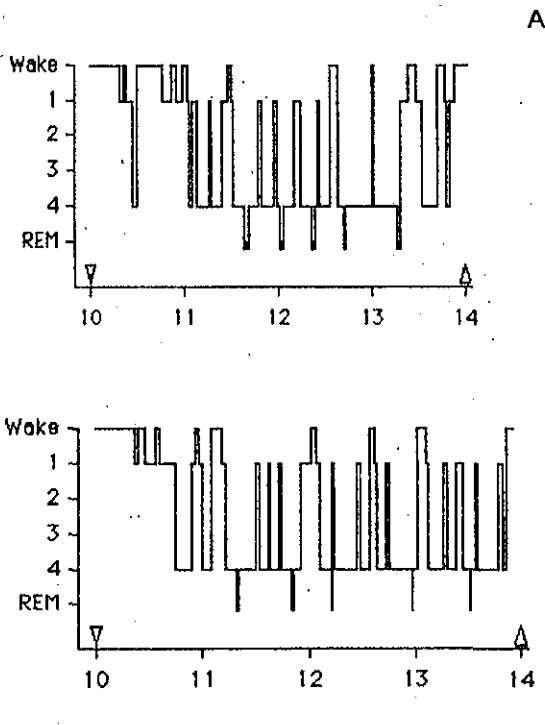


Figura 28. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de AG490 (panel A) o 50 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de AG490 (panel B). Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

Los grupos tratados con los compuestos Wortmanina y LY294002, ambos inhibidores de la enzima PI3K, muestran una tendencia hacia el incremento del porcentaje de vigilia (ver gráfica 1). Este incremento es modesto y no alcanza significancia estadística con los compuestos: Wortmanina a dosis de 50 ng (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs 25.3 ± 3.9 , $p=\text{NS}$) y LY294002 a dosis de 50 μg (control $20.7 \pm 2.8\%$ vs 29.4 ± 2.0 , $p=\text{NS}$). Sin embargo, el grupo tratado con el compuesto LY294002 a dosis de 10 μg presentó significativamente mayor

20.7±2.8% vs 29.4±2.0, p=NS). Sin embargo, el grupo tratado con el compuesto LY294002 a dosis de 10 µg presentó significativamente mayor porcentaje de vigilia (control 20.7±2.8% vs 33.5±1.7, p<0.05). Aunque este incremento no se vio reflejado en alguna de las variables de frecuencia o duración promedio de la vigilia. Ver anexo 1.

Sueño lento 1

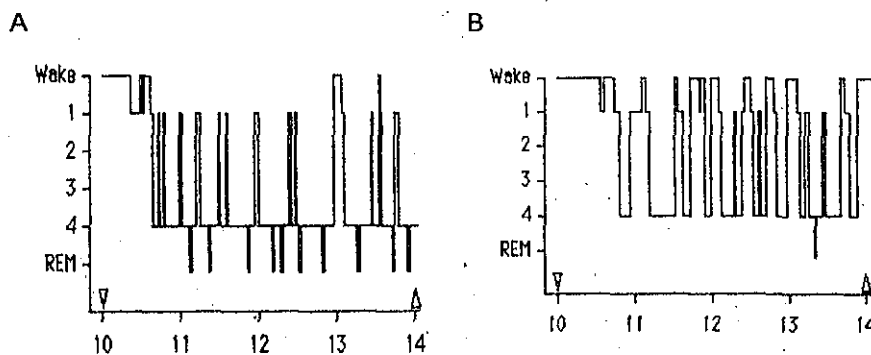
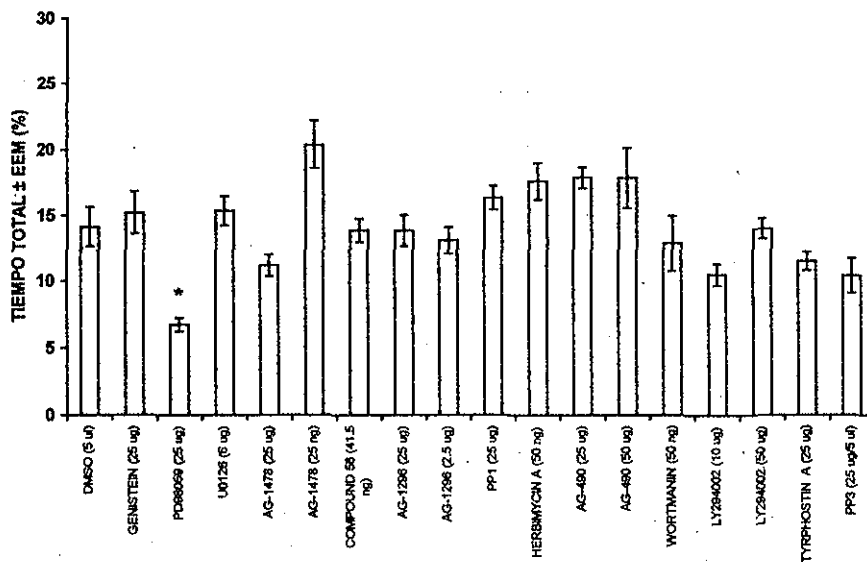


Figura 29. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 25 µg/5 µl de PD98059 (panel A) o 25 ng/5 µl de AG1478 (panel B). Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTEINAS CINASAS y SUEÑO DE ONDAS LENTAS 1



Gráfica 2. Efectos de los inhibidores de los receptores a EGF y PDGF así como de sus segundos mensajeros sobre el porcentaje de sueño de ondas lentas 1, a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y las dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media de cada grupo y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs DMSO.

El grupo que recibió el compuesto que inhibe al receptor a EGF (AG1478) a dosis de 25 ng mostró incremento no significativo en el porcentaje de SOL1 durante las cuatro horas de registro en comparación al grupo control (control $14.1 \pm 1.5\%$ vs $20.3 \pm 1.8\%$ $p = NS$). Por otra parte, el grupo que recibió el compuesto PD98059, que inhibe la MAPK-ERK, mostró una notable disminución del SOL1 en comparación al grupo control (control $14.1 \pm 1.5\%$ vs $6.7 \pm 0.5\%$, $p < 0.05$); ver gráfica 2 y figura 29. La disminución del porcentaje de SOL1 observada en el grupo tratado con PD98059 estuvo acompañada por un

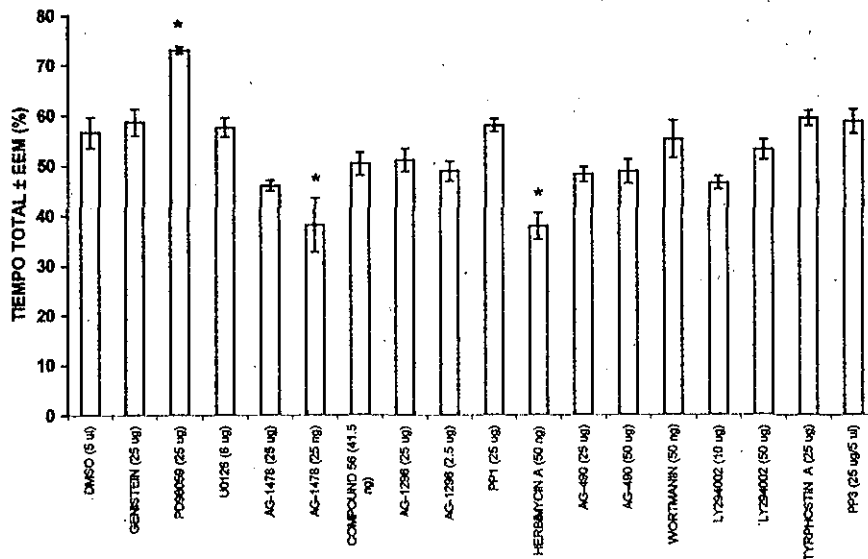
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incremento en la latencia de ingreso a esta fase de sueño (control 5.1 ± 1.4 vs 38.2 ± 10.3 , $p < 0.05$). Para mayores detalles sobre el comportamiento de las variables, ver anexo 1.

Sueño lento 2

El SOL2 se vio afectado en varios grupos (ver gráfica 3). El primero de ellos fue el grupo que recibió el compuesto AG1478 (inhibidor del receptor a EGF) a dosis de 25 ng. Este tratamiento disminuyó considerablemente el porcentaje de SOL2 (control $56.6 \pm 3.1\%$ vs $38.1 \pm 5.4\%$, $p < 0.05$). Sin embargo, este cambio no se vio reflejado en incremento estadísticamente significativo en las variables de latencia, frecuencia y duración, ver anexo 1. Además de lo anterior, el grupo que recibió el compuesto PD98059, inhibidor de la MAPK-ERK, mostró un incremento significativo en el porcentaje de SOL2 en comparación con el grupo control (control $56.6 \pm 3.1\%$ vs 73.0 ± 0.7 , $p < 0.05$). En tanto que el grupo tratado con Herbimicina A a dosis de 50 ng mostró menor porcentaje de SOL2 en comparación con el grupo control (control $56.6 \pm 3.1\%$ vs $37.9 \pm 2.7\%$, $p < 0.05$). Sin embargo, estos cambios no se vieron reflejado en las variables de frecuencia, latencia o duración (ver anexo 1 para más detalles).

PROTEINAS CINASAS y SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

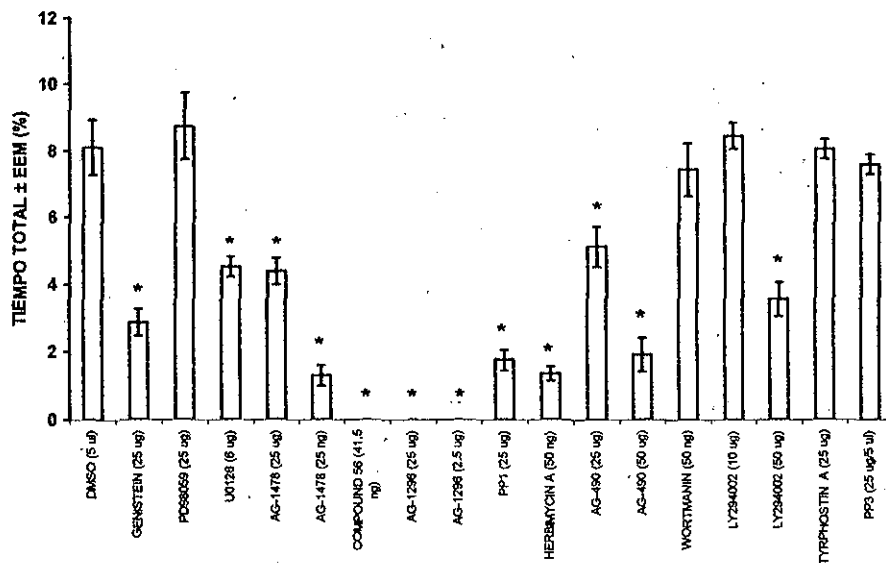


Gráfica 3. Efectos de los inhibidores de los receptores a EGF y PDGF así como de sus segundos mensajeros sobre el porcentaje de sueño de ondas lentas 2, a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y la dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media de cada grupo y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs DMSO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sueño MOR

PROTEINAS CINASAS y SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS



Gráfica 4. Efectos de los inhibidores de los receptores a EGF y PDGF así como de sus segundos mensajeros sobre el porcentaje de sueño de movimientos oculares rápidos, a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y la dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs DMSO.

El grupo que recibió Genisteína, un inhibidor general de receptores con actividad de tirosina cinasa, mostró menor porcentaje de SMOR durante las cuatro horas de registro (control $8.1 \pm 0.8\%$ vs $2.87 \pm 0.4\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 4). Los grupos tratados con los inhibidores a los receptores a EGF y PDGF mostraron un comportamiento consistente al promover, todos, la disminución del porcentaje de sueño MOR (ver gráfica 4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al analizar por separado cada uno de estos tratamientos observamos que el grupo que recibió la mayor dosis (25 μ g) del compuesto AG1478, inhibidor del receptor a EGF, presentó una disminución de Δ MOR en cerca del cincuenta por ciento (control $8.1 \pm 0.8\%$ vs $4.3 \pm 0.4\%$, $p < 0.05$). Sin embargo, este efecto fue más evidente en el grupo que recibió la dosis de AG1478 de 25 ng (control $8.1 \pm 0.8\%$ vs $1.3 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 4 y figura 30). Al utilizar otro compuesto con igual mecanismo de acción, como es el Compuesto 56, observamos ausencia de sueño MOR durante las cuatro horas de registro (control $8.1 \pm 0.8\%$ vs $0.0 \pm 0.0\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 4 y figura 30). La menor cantidad de sueño MOR que se observó a la mayor dosis usada de AG1478 (25 μ g) no se vio reflejada en cambios en la duración de los episodios de sueño MOR (control 1.3 ± 0.0 vs 1.9 ± 0.2 , $p = \text{NS}$). Sin embargo, el efecto observado a la dosis de 25 ng, con este mismo compuesto, si se reflejo en una mayor latencia para ingresar a esta fase de sueño (control 49.6 ± 7.3 vs 127.51 ± 32.0 , $p < 0.05$) y en una menor frecuencia de episodios de sueño MOR (mediana control 13.0 ± 12 vs 3.0 ± 1.0 , $p < 0.05$) a lo largo de las cuatro horas de registro. Ver anexo 1.

En el caso de la inhibición del receptor a PDGF, a las dos dosis utilizadas (25 μ g y 2.5 μ g) utilizando el compuesto AG1296, los grupos no presentaron sueño MOR durante las cuatro horas de registro (control $8.1 \pm 0.8\%$ vs $0.0 \pm 0.0\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 4 y figura 30).

Por otra parte, la inhibición de la enzima MAPK-ERK utilizando el compuesto U0126 produjo una disminución importante del sueño MOR (control $8.1 \pm 0.8\%$ vs $4.5 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 4).

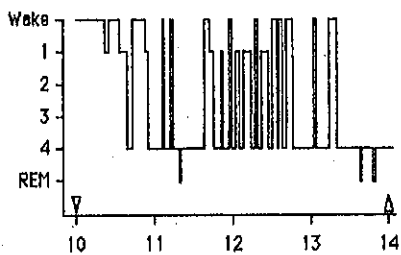
En tanto que los grupos tratados con el objetivo de inhibir las proteínas Src utilizando dos compuestos diferentes pero con el mismo mecanismo de acción mostraron comportamiento consistente (ver gráfica 4). El grupo que recibió el

compuesto PP1 a dosis de 25µg presentó menor porcentaje de sueño MOR (control $8.1\pm 0.8\%$ vs $1.7\pm 0.3\%$, $p<0.05$). Este efecto fue más evidente en el grupo tratado con Herbimicina A a dosis de 50 ng (control $8.1\pm 0.8\%$ vs $1.3\pm 0.3\%$, $p<0.05$). Estos efectos tuvieron repercusión aunque de manera no significativa sobre las variables de latencia, frecuencia y duración. Para mayores detalles ver anexo 1.

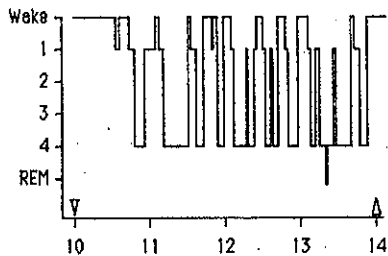
Los dos grupos tratados con el compuesto AG490, inhibidor de la enzima Jak2/stat, mostraron comportamiento similar (ver gráfica 4). El grupo que recibió 25 µg presentó una disminución importante del sueño MOR (control $8.1\pm 0.8\%$ vs $5.1\pm 0.6\%$, $p<0.05$) pero este efecto fue mucho mas evidente en el grupo tratado con 50 µg (control $8.1\pm 0.8\%$ vs 1.9 ± 0.5 , $p<0.05$). Estos cambios, al igual que lo descrito anteriormente, no se reflejaron en alteracions estadísticamente significativas en las otras variables, ver anexo 1.

De los grupos tratados con dos inhibidores de la enzima PI3K, únicamente el grupo que recibió la dosis de 50 µg de LY294002 mostró un menor porcentaje de sueño MOR durante las cuatro horas de registro (control $8.1\pm 0.8\%$ vs $3.56\pm 0.5\%$, $p<0.05$, ver gráfica 4). Aunque esta disminución no tuvo efecto estadísticamente significativo alguno sobre las variables de latencia, frecuencia y duración de esta fase de sueño, ver anexo 1.

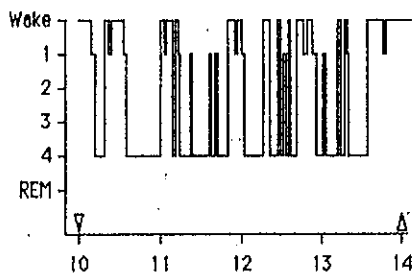
Figura 30. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 25 ug/5 ul (panel A) o 2.5 ug/5ul (panel B) de AG1478. Panel C, representa una rata que fue tratada con 41.5 ng/5 ul de compound 56. Panel D y E, representan una rata que fue tratada con 25 ug/5ul o 2.5 ug/5ul de AG1296, respectivamente. Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño. (siguiente página)



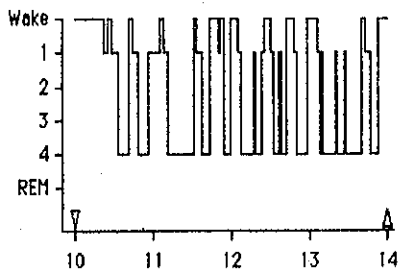
A



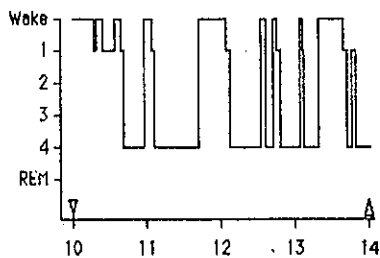
B



C



D



E

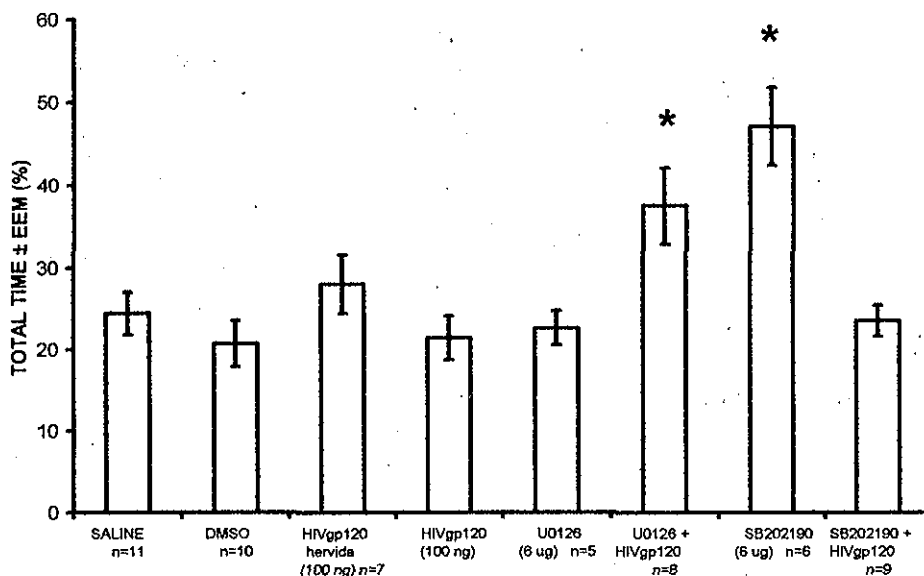
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIVgp120

Vigilia

La administración de 5 μ l de solución salina fisiológica o de 5 μ l de DMSO vía intracerebroventricular, no alteró ninguna de las fases del ciclo sueño-vigilia durante cuatro horas de registro (ver cuadro 1), para mayores detalles sobre cada una de las variables ver anexo 2.

HIVgp120 y MAPK VIGILIA



Gráfica 5. Efectos de dos inhibidores de enzimas MAPK y de la HIVgp120 sobre el patrón de vigilia a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y la dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media de cada grupo y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Salina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La administración de HIVgp120 hervida por 30 minutos, con el fin de desnaturalizarla o ser una proteína-inactiva, no modifica el porcentaje de vigilia en comparación con el grupo control (control $24.4 \pm 2.6\%$ vs $28.0 \pm 2.6\%$, $p = \text{NS}$, ver gráfica 5 y figura 31). Esta ausencia de efecto también se observó después de administrar 100 ng de la proteína activa HIVgp120 (control $24.4 \pm 2.6\%$ vs $22.6 \pm 2.1\%$, $p = \text{NS}$, ver gráfica 5).

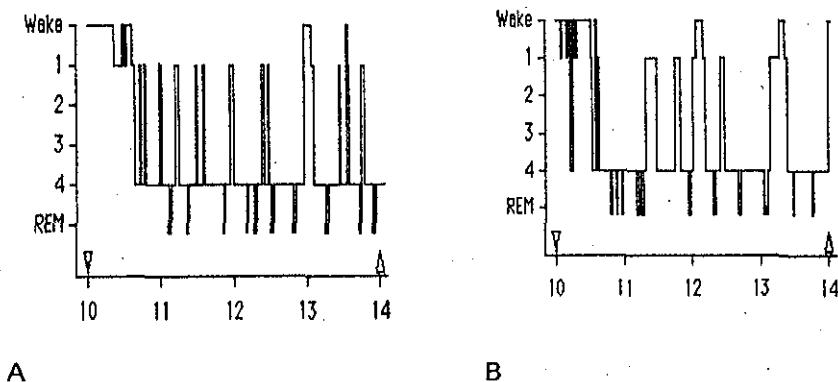


Figura 31. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 5 μl (panel A) de solución salina fisiológica o 100 ng/5 μl (panel B) de HIVgp120 hervida. Eje x, es tiempo en horas; inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

Por otra parte, la inhibición de la enzima MAPK-ERK utilizando el compuesto U0126 no alteró el porcentaje de vigilia durante las cuatro horas de registro (control $24.4 \pm 2.6\%$ vs $22.6 \pm 2.1\%$, $p = \text{NS}$, ver gráfica 5). Sin embargo, la administración del inhibidor de la enzima p38-MAPK, el SB202190, incrementó considerablemente el porcentaje de vigilia (control $24.4 \pm 2.6\%$ vs $47.1 \pm 4.7\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 5). Este incremento en el porcentaje de vigilia, estuvo acompañado por una mayor frecuencia de los episodios de ésta (mediana control 14.0 ± 7.5 vs 18.5 ± 17.2 , $p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El grupo tratado simultáneamente con el inhibidor de la MAPK-ERK y la HIVgp120 mostró un incremento en el porcentaje de vigilia (control $24.4 \pm 2.6\%$ vs 37.5 ± 4.6 , $p < 0.05$, ver gráfica 5). Este incremento se vio reflejado en una mayor frecuencia de episodios de vigilia (control 14.0 ± 7.5 vs 19 ± 16 , $p < 0.05$). El grupo tratado simultáneamente con el inhibidor de la enzima p38-MAPK y HIVgp120 no presentó cambios en el porcentaje de vigilia durante las cuatro horas de registro (control $24.4 \pm 2.6\%$ vs $23.5 \pm 1.9\%$, $p < NS$, ver gráfica 5).

Sueño Lento 1

El único tratamiento que produjo cambios significativos en el porcentaje de sueño lento 1 durante las cuatro horas de registro fue el inhibidor de la enzima p38-MAPK, SB202190 (ver gráfica 6 y figura 32).

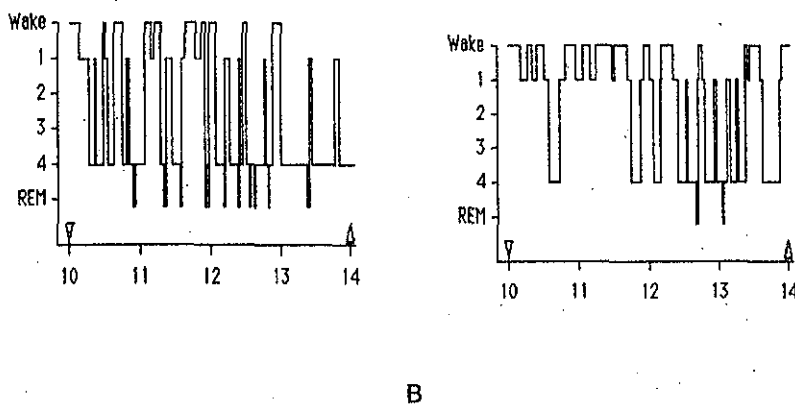
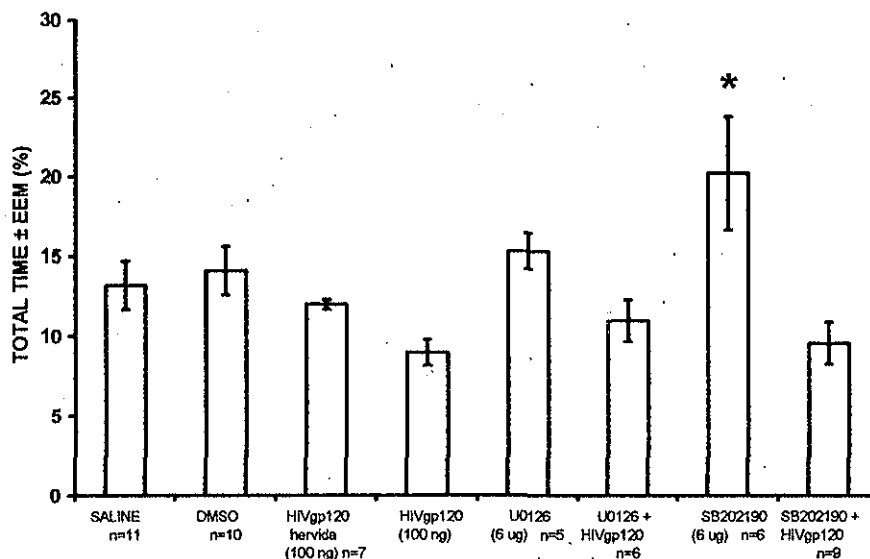


Figura 32. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con $6\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ (panel A) de U0126 o $6\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ (panel B) de SB202190. Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIVgp120 y MAPK SUEÑO DE ONDAS LENTAS 1



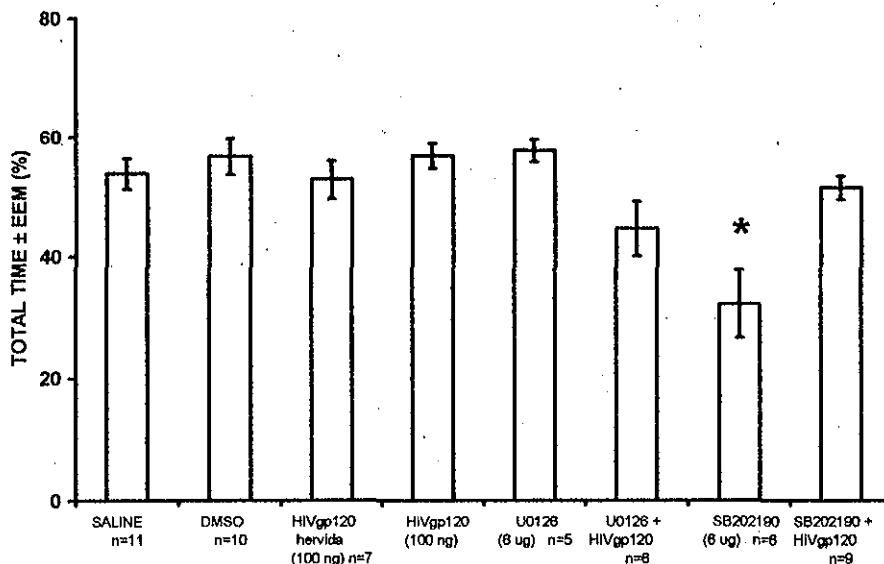
Gráfica 6. Efectos de dos inhibidores de enzimas MAPK y de la HIVgp120 sobre el patrón de sueño de ondas lentas 1 a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y la dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media de cada grupo y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Salina.

Este tratamiento incrementó el porcentaje de SOL1 (control $13.2 \pm 1.5\%$ vs $20.2 \pm 3.6\%$, $p < 0.05$). Este incremento se vio acompañado por una mayor frecuencia de esta fase de sueño (mediana control 16.0 ± 13.2 vs 18 ± 12.5 , $p < 0.05$). Asimismo, se observó menor frecuencia de SOL1 en el grupo tratado simultáneamente con SB202190 y HIVgp120 (mediana control 16.0 ± 12.5 vs 15 ± 13.0 , $p < 0.05$) sin que afectara el porcentaje total, ver anexo 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sueño Lento 2

HIVgp120 y MAPK SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2



Gráfica 7. Efectos de dos inhibidores de enzimas MAPK y de la HIVgp120 sobre el patrón de sueño de ondas lentas 2 a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y la dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media de cada grupo y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Salina.

El sueño lento 2 fue modificado sustancialmente en el grupo que recibió el inhibidor de la enzima p38-MAPK, SB202190; este compuesto disminuyó el porcentaje de SOL2 durante las cuatro horas de registro (control $53.7 \pm 2.6\%$ vs $32.2 \pm 5.6\%$; $p < 0.05$, ver gráfica 7 y figura 32). Esta disminución no afectó significativamente las variables de latencia, frecuencia y duración de esta fase de sueño, ver anexo 2. Además, el grupo tratado simultáneamente con el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inhibidor para la MAPK-ERK, U0126 más HIVgp120, mostró una mayor latencia para ingresar a SOL2 (control 15.5 ± 2.7 vs 53.1 ± 7.7 , $p < 0.05$). Este incremento en la latencia no afectó significativamente el porcentaje de SOL2 durante las cuatro horas de registro (control $53.7 \pm 2.6\%$ vs $44.6 \pm 4.5\%$, $p < NS$, ver gráfica 7).

Sueño MOR

La administración de 100 ng de HIVgp120 incrementó el porcentaje de sueño MOR en comparación con el grupo control (control $8.3 \pm 1.1\%$ vs $14.1 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 8 y figura 33). Este incremento en el porcentaje se vio reflejado en una mayor duración de los episodios de sueño MOR (control 1.3 ± 0.0 vs 2.5 ± 0.1 , $p < 0.05$).

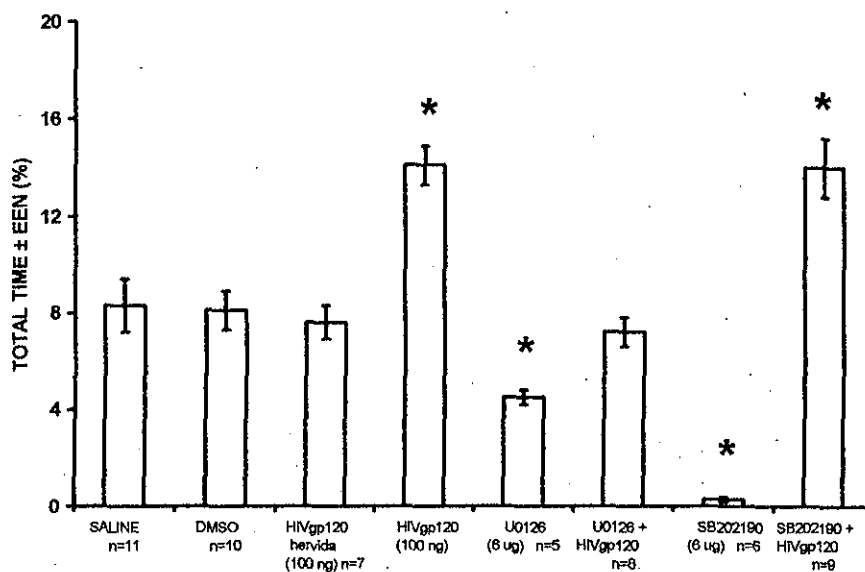
El compuesto U0126, un inhibidor de la enzima MAPK-ERK, redujo el porcentaje de sueño MOR durante las cuatro horas de registro (control $8.3 \pm 1.1\%$ vs $4.5 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 8 y figura 32); esto se reflejó en una menor frecuencia de esta fase de sueño en relación al grupo control (mediana control 12.0 ± 8.0 vs 7.0 ± 6.0 , $p < 0.05$). Un efecto similar fue observado después de administrar el inhibidor de la enzima p38-MAPK (control $8.3 \pm 1.1\%$ vs $0.3 \pm 0.1\%$, $p < 0.05$, ver gráfica 8); esta disminución en el porcentaje de sueño MOR se vio acompañada por una mayor latencia para ingresar a esta fase de sueño (control 46.2 ± 6.2 vs 147.9 ± 32.3 , $p < 0.05$), por una menor frecuencia de episodios de sueño MOR (mediana control 12.0 ± 8.0 vs 1.0 ± 0.2 , $p < 0.05$) y por una menor duración de los episodios de sueño MOR (control 1.3 ± 0.0 vs 0.6 ± 0.2 , $p < 0.05$) para mayores detalles ver anexo 2.

La administración simultánea de U0126, inhibidor de la MAPK-ERK, y HIVgp120 no altera el porcentaje de sueño MOR en comparación con el grupo control (control $8.3 \pm 1.1\%$ vs $7.2 \pm 0.6\%$, $p = NS$, ver gráfica 8 y figura 33). Sin embargo, la administración simultánea de SB202190, inhibidor de la p38-MAPK

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y HIVgp120 presenta un incremento sustancial de sueño MOR (control $8.3 \pm 1.1\%$ vs 14.0 ± 1.2 , $p < 0.05$, ver gráfica 8 y figura 33); este incremento en el porcentaje de sueño MOR se vio acompañada por una mayor duración de los episodios de esta fase de sueño (control 1.3 ± 0.0 vs 2.6 ± 0.1 , $p < 0.05$). Para mayores detalles, ver anexo 2.

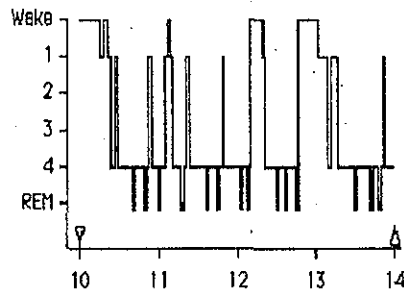
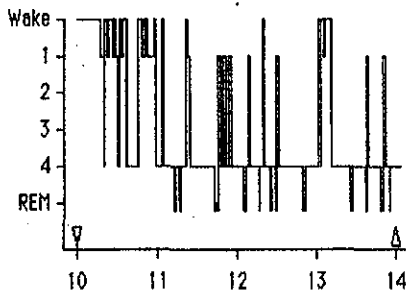
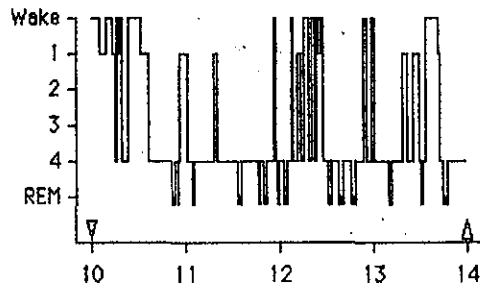
HIVgp120 y MAPK SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS



Gráfica 8. Efectos de dos inhibidores de enzimas MAPK y de la HIVgp120 sobre el patrón de sueño de movimientos oculares rápidos a lo largo de cuatro horas de registro. Eje X, representa los tratamientos y la dosis utilizadas. Eje Y, representa el tiempo total de registro en porcentaje. Las barras representan la media de cada grupo y el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Salina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



B

C

Figura 33. Hipnogramas representativos de una rata que fue tratada con 100 ng/5 μ l (panel A) de HIVgp120 o 6 μ g/5 μ l de U0126 + 100 ng/5 μ l de HIVgp120 (panel B) o 6 μ g/5 μ l de SB202190 + 100 ng/5 μ l de HIVgp120 (panel C). Eje x, es tiempo en horas, inicio a las 10.00 am. Eje y, representa las fases de sueño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Tirosinas cinasas. El papel de los neurotransmisores clásicos —acetilcolina, noradrenalina, serotonina y dopamina— en la regulación del sueño ha sido ampliamente documentado y estudiado (Chokroverty S, 1999; Borbely A, 2000). Sin embargo, en años recientes se ha visto que otras moléculas, como los factores de crecimiento, están ligados al fenómeno del sueño.

Los factores de crecimiento, al igual que las interleucinas, son subfamilias de moléculas que se agrupan en la superfamilia de las citocinas. Estas moléculas se unen y activan receptores que se fosforilan en el aminoácido tirosina del dominio intracelular, por lo cual se les conoce como receptores con actividad de tirosina cinasa. Estudios realizados a la fecha en el área de sueño han brindado pruebas sobre el papel de algunas interleucinas y menos reportes se han tenido sobre el papel específico de los factores de crecimiento (para revisión ver Krueger 1993, 1999, 2000). Los factores de crecimiento, al ser una gran subfamilia de moléculas, y complejos los receptores que activan, los resultados que se han obtenido en estudios del sueño varían con relación al factor de crecimiento utilizado. Las investigaciones que se han realizado hasta la fecha se han enfocado, principalmente, a los efectos agudos de la administración ICV de factores de crecimiento sobre el patrón del sueño-vigilia. A pesar de estos esfuerzos, no se conoce nada acerca de cómo los factores de crecimiento generan sus efectos sobre el sueño (Grazia de Simoni M, 1996).

En una breve recopilación de los efectos reportados tenemos que cuando se han inyectado interleucinas o fragmentos de receptores, el principal efecto observado es incremento o disminución en el sueño lento y en algunos casos variaciones en la temperatura cerebral. Por ejemplo, la administración ICV de IL-1 aumenta el sueño lento (Krueger JM, 1999) mientras que la administración ICV de anticuerpos contra la IL1 β a conejos produce reducción del sueño lento sin afectar el sueño MOR o la temperatura cerebral (Opp MR, 1994). Las cifras

de ARNm de IL1 β se incrementan después de una hora de privación de sueño, principalmente en hipotálamo, hipocampo, corteza y puente (Taishi P, 1998). La privación total de sueño provoca incremento de 200% en las cifras de ARNm para IL-1 β en hipotálamo y tallo cerebral. (Mackiewicz M, 1996) y estas cifras de IL-1 son sustancialmente disminuidas después de tres horas de rebote de sueño. En tanto, se ha reportado que las cifras de IL-2 se incrementan durante la segunda mitad de sueño (Uthgenannt D, 1995). La administración ICV de IL-4 a conejos durante el periodo de luz produce inhibición del sueño lento mientras que no se encontró efecto alguno cuando esta IL-4 se inyectó durante el periodo de oscuridad (Kushikata T, 1998). Ensayos preclínicos con IL-6 en humanos muestran que es capaz de inducir fatiga, inactividad y disminuir la capacidad de concentración. El efecto observado sobre el patrón de sueño es una disminución de sueño lento durante la primera mitad de la noche e incremento durante la segunda mitad (Spath-Schwalbe E, 1998). Además, pacientes con somnolencia diurna patológica y fatiga muestran cifras circulantes elevadas de IL-6 (Vgontzas AN, 1999). La administración ICV de IL-10 a ratas produjo reducción de sueño lento (Opp MR, 1995) mientras que en conejos y durante el periodo de luz produce además de disminución del sueño lento, incremento de sueño MOR; pero cuando esta IL-10 es administrada durante el periodo de oscuridad no se reportó efecto (Kushikata T, 1999). La administración intracerebral de IL-13 a ratas, inhibe el sueño MOR cuando se inyecta durante el periodo de luz, e inhibe el sueño lento cuando es administrada durante el periodo de oscuridad. (Kubota T, 2000). La administración, a ratas, del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) incrementa el sueño lento, disminuye el sueño MOR y causa fiebre y anorexia (Terao A, 1998).

En lo que respecta a los estudios con factores de crecimiento, observamos que la administración ICV del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) a ratas, inhibe el sueño MOR (Kubota T, 2000). En tanto que la administración ICV a conejos del factor de crecimiento de fibroblastos en sus formas ácida y

básica provocó incremento de sueño lento y fiebre en el primer caso, mientras que con el factor básico no se observó incremento de temperatura (Knefati M, 1995). La administración ICV de 25 ug de EGF en conejos, incrementó la temperatura cerebral, el sueño lento y disminuyó el sueño MOR, en tanto que a dosis de 5 ug solo incrementa el sueño lento (Kushikata T, 1998). El factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) administrado ICV a conejos, disminuye el sueño lento y el sueño MOR durante la primera hora de registro (Obal F, 1999). La administración ICV del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en ratas y conejos incrementa el sueño lento en ambas especies pero solamente se observa incremento de sueño MOR en conejos (Kushikata T, 1999). La administración ICV de NGF incrementa el sueño lento y el sueño MOR en conejos sin alterar la temperatura cerebral (Takahashi S, 1999). En tanto que la administración de NGF en el tegmento pontino rostral de gatos induce largos episodios de sueño MOR (Yamuy J, 1995, 2000). Por ultimo, la administración del factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF) en ratas y conejos incrementa el sueño lento y disminuye el sueño MOR (Kushikata T, 2001).

Como se puede observar, casi todos los estudios anteriores se han enfocado a la administración de diversos factores de crecimiento al ventrículo lateral de ratas y conejos. Sin embargo, los receptores que son activados por estos factores de crecimiento son complejos, por lo cual en el presente estudio utilizamos otra aproximación la cual es mediante la inhibición de la activación de estos receptores. Por contraste, con los reportes publicados por otros grupos, la inhibición farmacológica de los receptores con actividad de tirosina cinasa, en particular para EGF y PDGF, muestran una conducta consistente. El efecto agudo observado después de la administración de un antagonista no específico de los receptores con actividad de tirosina cinasa como es la genisteína, produce durante las cuatro horas de registro una disminución exclusiva del porcentaje de sueño MOR sin modificar alguna otra fase de sueño. El sueño MOR ha sido vinculado a procesos de consolidación de

memoria (Smith C, 1995; Siegel JM, 2001; Maquet P, 2001) y se ha visto que los receptores con actividad de tirosina cinasa son importante en la generación de LTP en el hipocampo en estudios *in vitro* (O'Dell TJ, 1991) así como en los procesos de aprendizaje y memoria en estudios *in vivo* (Soderling TR, 2000). Además, la teoría neurotrófica del sueño sugiere que la generación del sueño es un proceso que tiene lugar por grupos neuronales, esta idea podría ser apoyada por la amplia distribución de los receptores con actividad de tirosina cinasa y sus ligandos en el cerebro (Wagner KR, 1991; Arregui CO, 2000).

Se han reportado otros estudios que muestran el papel de los receptores y los factores de crecimiento en sueño. Por ejemplo, la administración de BDNF a conejos y ratas incrementa el sueño lento (Kushikata T, 1999). Además, el receptor para este factor de crecimiento presenta variaciones ultradianas y sus cifras se incrementan después de la privación total de sueño (Kushikata T, 1999). Cuando se priva de sueño MOR durante seis horas a ratas se observa una mayor inmunoreactividad para BDNF en diversas áreas cerebrales (Sei H, 2000), principalmente en cerebelo y tallo cerebral. En este mismo estudio, después de 6 horas de privación de sueño MOR se reporta cifras de NGF menores solamente en hipocampo. Esto contrasta con lo reportado previamente por Yamuy y Kushikata quienes muestra que la administración de NGF en ventrículo lateral así como a zonas específicas del cerebro de ratas y gatos facilita el sueño MOR (Yamuy J, 1995, Kushikata, 1999). Esto podría sugerir distintas funciones de los receptores dependiendo de su ubicación o de su tipo ya que recientemente se ha demostrado la presencia de los receptores (p75 y Trk-c) para NGF en los núcleos tegmental pedúnculo pontino, latero dorsal, núcleo peribraquial, la formación reticular pontina lateral y medial, el núcleo del rafe y el *locus coeruleus* (Yamuy J, 2000), todas ellas son áreas de han sido involucradas en la generación del sueño. Otros estudios que amplían nuestro conocimiento sobre los factores de crecimiento son los que muestran que la administración ICV del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1) a ratas y conejos produce disminución de sueño lento y sueño MOR

(Obal F, 1999). En tanto que otros investigadores han reportado que las cifras plasmáticas de IGF en hombres sanos de tercera edad co-varía de forma inversa con la cantidad de sueño lento y el poder en la banda delta (Prinz PN, 1995). Todos estos datos sugieren la importancia de los factores de crecimiento y al parecer apoyan la hipótesis neurotrófica que postula que durante el sueño, los factores de crecimiento son utilizados, por ejemplo, en el mantenimiento de sinápsis no utilizadas durante la vigilia, en la estabilización de circuitos sinápticos y en la plasticidad cerebral (Krueger JM, 1993, 1999, 2000).

Los factores de crecimiento antes mencionados y otros más incluyendo al PDGF y al EGF han sido previamente involucrados en el sueño. En 1997, Tafti utilizando la aproximación de *quantitative trait loci* sugirió la importancia de algunas regiones genómicas en el sueño MOR. Dentro de estas regiones genómicas propuestas se encuentran los genes que codifican para diversos receptores para factores de crecimiento y para factores de crecimiento, entre ellos el PDGF y el EGF (Tafti M, 1997). Asimismo, Tononi reportó que varios factores de crecimiento forman parte de la tercera familia de genes que se expresan durante la privación de sueño (Tononi G, 2000). Estos datos comienzan a dibujar el papel de los factores de crecimiento en el sueño y podrían contribuir a apoyar y ampliar los alcances de la teoría neurotrófica del sueño.

PDGFR y EGF. La amplia distribución cerebral de los receptores para PDGF y EGF (Schaudies RP, 1989; Yeh HJ, 1991; Sasahara M, 1991) sugiere su importancia en los procesos fisiológicos cerebrales. Estos factores de crecimiento, sus receptores y vías de transducción de señales han sido involucrados en la aparición de gliomas, tumores cerebrales, en los procesos de mielinización, en los cambios gliales observados en la enfermedad de Alzheimer (Masliah E, 1995; Smits A, 1998; Cannella B, 1999) y ahora en el sueño.

La administración del inhibidor al receptor a PDGF, el AG1296, indujo la desaparición del sueño MOR durante las cuatro horas de registro a ambas dosis utilizadas. Ésta es la primera evidencia fisiológica que muestra que este receptor tiene una función en la generación del sueño MOR. Aunque previamente Tafti y Tononi habían sugerido su implicación, de forma general, por ser parte de los factores de crecimiento que al parecer se expresarían durante el sueño MOR (Tafti M, 1997; Tononi G, 2000). El efecto observado al inhibir la activación del receptor a PDGF se ve reflejada en una disminución del sueño MOR y en un aumento de la vigilia, sin afectar al sueño lento. Sin embargo, es necesario aclarar que estamos observando un efecto agudo y en el estudio que realizamos únicamente registramos el sueño durante cuatro horas, al inicio del periodo de luz, por lo anterior no sabemos si esta supresión de sueño MOR durante las primeras cuatro horas de registro pudo ser compensada o tener algún efecto de rebote durante las siguientes horas del ciclo ya que es sabida la preponderancia del sueño MOR en la rata durante el último tercio del periodo de luz. Una posible explicación o interpretación a los efectos agudos observados sobre el sueño es que el compuesto AG1296 fue capaz de inhibir la activación de los receptores a PDGF, aunque no se podría confirmar si estos efectos fueron debidos a la inhibición general de la mayoría de receptores independientemente de su localización o a la inhibición primordial en algunas áreas donde convergen la localización de los receptores a PDGF y anatomía de estructuras previamente descritas como muy importantes en el sueño como el tallo cerebral, tálamo y corteza (Sasahara M, 1991; Yeh HJ, 1991; 1993). Independientemente de lo anterior, los resultados apoyan la teoría neurotrófica del sueño. Además, de la presencia de este receptor en las áreas antes mencionadas se ha visto que su concentración es dependiente de la edad de las ratas. Se ha reportado que en ratas de 24 meses la concentración de receptores a PDGF es menor en comparación a ratas jóvenes (Hu Y, 1998) esto podría sugerir su implicación en los cambios en el patrón de sueño MOR que se observan durante la vejez (Spiegel R, 1982). Sin embargo, hasta la

fecha nadie ha reportado una posible relación entre este factor de crecimiento (PDGF) durante la vejez y el sueño.

En el caso del receptor a EGF, los efectos observados debidos a la administración de los inhibidores AG1478 y compuesto 56 fueron consistentes, ambos compuestos disminuyeron el porcentaje de sueño MOR y aumentaron el porcentaje de vigilia durante las cuatro horas de registro, igual a lo observado en el caso de la inhibición del receptor a PDGF. En el primer caso, el AG1478, mostró comportamiento dosis dependiente. En tanto que en el segundo caso, el compuesto 56, sólo se utilizó una dosis y los efectos fueron evidentes. Los resultados obtenidos con estos inhibidores sugieren que este receptor y sus segundos mensajeros, al igual que el PDGFR, están involucrados en el sueño MOR. Sin embargo, la diferencia en el porcentaje de sueño MOR que fue inhibido puede deberse a la diferente IC_{50} entre ambos compuestos ya que para el caso del compuesto 56 es menor la IC_{50} requerida ($IC_{50}=6$ pM) en comparación al AG1478 ($IC_{50}=3$ nM) para ejercer su acción. En todo caso se puede descartar una acción cruzada (inhibición de otros receptores) ya que la IC_{50} para observar este efecto es de 100 μ M (Han Y, 1996; Bridges AJ 1996; Levitzki A, 1995). Al observar un efecto más conspicuo en la inhibición del sueño MOR al usar un compuesto con una IC_{50} menor (6 pM) nos podría sugerir que el compuesto 56 es sumamente efectivo a bajas dosis o que el mecanismo de este receptor para facilitar esta fase de sueño puede ser sumamente fino ya que requiere un inhibidor mucho más específico (compuesto 56 vs AG1478). Por otro lado, estos resultados contrastan con los hallazgos reportados recientemente por Kushikata. Este autor muestra que la administración ICV de EGF a conejos produce incremento de sueño lento y disminución de sueño MOR a dosis de 25 μ g (Kushikata T, 1998). En nuestro estudio, al utilizar antagonistas, solamente observamos disminución de sueño lento a dosis de 25 ng en tanto que a todas las dosis y con ambos compuestos (AG1478 y compuesto 56) se presenta menor cantidad de sueño MOR e incremento de vigilia. Posibles explicaciones, el estudio realizado por Kushikata

fue en conejos en comparación a ratas que se utilizaron en este estudio; el receptor a EGF tiene alrededor de ocho ligandos, entre ellos el EGF, (Zwick E, 1999) por lo cual los efectos observados por Kushikata pueden ser debidos al EGF y a alguna de sus enzimas. Puede ser que el efecto sea dependiente del ligando y de su concentración. En resumen, los efectos sobre el sueño observados después de la administración aguda de inhibidores de los receptores a PDGF y a EGF produce efectos consistentes que se ven reflejados en la disminución del sueño MOR y en incremento de vigilia durante las cuatro horas de registro. Esto no descarta que el efecto agudo observado pueda tener repercusiones sobre el sueño más allá de las cuatro horas de registro. Debido a que ambos receptores tienen y al parecer utilizan casi las mismas enzimas como mecanismos de transducción de señales, alguna de ellas o más de una puede ser la encargada de llevar a cabo este efecto observado en el sueño MOR.

MAPK-ERK. Las vías de transducción de señales de receptores a factores de crecimiento son varias y muchas de ellas todavía están bajo estudio, sin embargo, se conocen algunas de las principales. Tal es el caso de la vía de la MAPK-ERK. La MAPK es una familia de enzimas con seis miembros, de los cuales cuatro se han encontrado en neuronas de mamíferos (Chang L, 2001). La vía acoplada a los receptores a EGF y PDGF es la MAPK-ERK (Chelsson-Wels, 1994). Los resultados obtenidos en la arquitectura del sueño durante cuatro horas de registro y después de la administración de dos inhibidores (PD98059 y U0126) que tienen el mismo sitio de acción (delta N3-S218E/S222D MEK) muestran características diferentes. En tanto el PD98059 disminuye el SOL1; incrementa

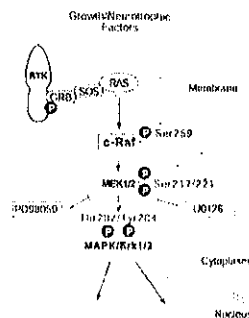


Figura 34. Diagrama que muestra el sitio de acción de los compuestos PD98059 y U0126.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el SOL2 y no tiene efecto alguno sobre el sueño MOR; no sucede lo mismo con el U0126 que tiene efecto específico sobre el sueño MOR. Esta diferencia puede ser atribuida a la sensibilidad del compuesto U0126 para inhibir a la enzima. Ensayos de cinética enzimática muestran que el U0126 ($IC_{50}=0.07 \mu M$) tiene 100 veces más afinidad por el sitio delta N3-S218E/S222D MEK en comparación con el PD98059. (Favata MF, 1998). Los resultados obtenidos con la inhibición aguda de la MAPK-ERK son las primeras evidencias fisiológicas que muestran que una enzima tan importante e involucrada en diversos procesos fisiológicos estudiados *in vitro* como LTP, integración de señalización intracelular (Grewal SS, 1999) y en estudios conductuales en ratas (Sweatt JD, 2001), al parecer también está involucrada en el sueño (cambios agudos) y quizás en una fase específica del sueño (MOR). Tomando todo lo anterior, es decir, los reportes previos sobre la importancia de la MAPK-ERK en el fenómeno de LTP y en estudios conductuales en ratas, los efectos que se observan durante la inhibición de esta enzima en el sueño y la relación existente entre la memoria y el sueño (Smith C, 1995; Siegel JM, 2001, Maquet P, 2001) podría sugerir la relación de la MAPK-ERK en el fenómeno sueño-memoria. Recientemente, se ha reportado que la privación total de sueño por seis horas incrementa las cifras de MAPK-ERK fosforilada en hipocampo (Fang J, 2000). Sin embargo, la técnica de privación de sueño fue realizada por adición de objetos nuevos al ambiente de las ratas por lo cual el efecto observado puede ser una mezcla de privación de sueño y actividad hipocampal; ya que la adición de nuevos objetos incrementa las cifras de MAPK-ERK en hipocampo de ratas (Izquierdo LA, 2001). Además se ha reportado que, al parecer, las cifras de MAPK-ERK en cerebro se mantienen constantes a lo largo de la vida de la rata (Hu Y, 1998). Esta vía ha sido de las más estudiadas y es considerada como una de las principales vías de transducción de señales en los receptores para EGF y PDGF (Claesson-Welsh L, 1994; Levitzki A, 1995; Grewal SS, 1999). En adición a lo anterior, se ha reportado que varios factores tróficos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-

CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), utilizan principalmente la MAPK-ERK en su transducción de señales (Bridges AJ, 1995; Grewal SS, 1999; Schenk PW, 1999). En este sentido se ha reportado que la inyección de NGF en el tegmento pontino de gatos (Yamuy J, 1995) facilita la aparición de sueño MOR aunque si se inyecta en el ventrículo de conejos (Takahashi S, 1999) solamente incrementa el sueño lento. La administración intracerebral a ratas del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) incrementa el sueño MOR sin generar fiebre. (Kimura M, 2000). En ensayos preclínicos, la administración de GM-CSF a humanos reduce la cantidad de sueño lento e incrementa de manera no significativa el sueño MOR (Schuld A, 1999). Estos resultados comienzan a sugerir la relación de la MAPK-ERK en el sueño, aunque los efectos, al parecer, pueden variar dependiendo del sujeto experimental y de la ruta de administración.

Src. Las proteínas Src son una gran familia cuya función, poco conocida, se ha involucrado más en procesos de neurogénesis, cáncer, crecimiento neuronal, alcoholismo y en memoria, aunque se les conoce más como proteínas que unen otras proteínas (Soderling TR, 2000). Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de las proteínas Src mediante el compuesto Herbimycina A produjo incremento en el porcentaje de vigilia, disminución en SOL2 y sueño MOR. Al utilizar otro compuesto más específico y con el mismo mecanismo de acción, como es el PP1, observamos incremento en el porcentaje de vigilia y disminución de SMOR. El comportamiento de ambos compuestos es básicamente similar aunque con diferente potencia, con excepción de la disminución del SOL2 generado por la Herbimycina A. Estas diferencias, pueden deberse a que la herbimycina A se une solamente a una de estas proteínas Src, la denominada P60^{Src}, con una IC₅₀=900 µM y la unión de este inhibidor a los grupos thiol de la cinasa es irreversible (Fukazawa H, 1991). En tanto el compuesto PP1 se une a las proteínas P^{60Src}, P^{56lck}, P^{59lyn} y Hck con una IC₅₀=5 nM y de manera reversible (Hanké JH, 1996). Hasta la fecha este sería el primer reporte de la posible relación de esta proteína en el sueño,

aunque previamente se ha mostrado que la mutación en las proteínas *fyn* y *src* en ratones altera el fenómeno de LTP y disminuye la eficiencia de ratas en la prueba de aprendizaje espacial de Morris (Grant SG, 1993). Recientemente, se ha confirmado que estas proteínas se encuentran en todo el cerebro, pero principalmente en neuronas de hipocampo (Zhao W, 2000). Las cifras de estas proteínas se incrementan después de entrenamiento espacial en el laberinto de Morris, al igual que otras proteínas de citoesqueleto, lo que sugiere su papel en la plasticidad neuronal y en los procesos de memoria (Zhao W, 2000). Lo que coincidiría con lo reportado de la relación sueño memoria (Smith C, 1995). Debido a lo poco que sabemos de estas proteínas, es prematuro darles alguna función concreta, sobre todo en el sueño.

Jak2/Stat. La inhibición de esta cascada de segundos mensajeros mediante el compuesto AG490, también conocido como B42, produjo a ambas dosis utilizadas (25 y 50 μg) el mismo efecto y este fue específico sobre una disminución del sueño MOR. El mayor efecto lo obtuvimos con la dosis de 50 μg . Sin embargo, a esta dosis es posible que tengamos un efecto mezclado al inhibir no sólo a la enzima Jak2 sino también en menor medida al receptor a EGF. Este efecto cruzado ha sido reportado previamente (Meydan N, 1996). Algo interesante es si observamos y comparamos el efecto obtenido después de la administración de 25 μg de AG1478 con los resultados obtenidos con el compuesto AG490 a dosis de 50 μg y con Herbymicina A se encuentran cifras similares, lo cual sugiere que a esta dosis el compuesto AG1478 podría estar inhibiendo o actuando en estas dos cascadas de segundos mensajeros, aunque esto deberá ser corroborado por estudios *in vitro*. La enzima Jak2 es intracelular y se localiza principalmente en corteza, hipocampo, cerebro basal y estriado (De Fraja C, 1998) y recientemente se ha descubierto que, al parecer, es la principal cascada de activación y modulación del receptor a hormona del crecimiento en el cerebro (Carter-Su C, 2000). Esta es la primera evidencia fisiológica del involucramiento de esta enzima en el sueño y su posible función estará por ser determinada.

PI3K. Para inhibir esta cascada de segundos mensajeros utilizamos wortmanina, un compuesto no selectivo y LY294002 un compuesto con $IC_{50}=0.43 \mu M$ (Vlahos CJ, 1994). Los resultados muestran que wortmanina no afecta al patrón de sueño en forma significativa. En tanto el LY294002 lo hace únicamente a dosis de 50 μg . El efecto observado es específico sobre el porcentaje de sueño MOR. La posible interpretación que nos sugiere es que esta vía de segundos mensajeros no es de las principales en la cascada de señalización para el fenómeno del sueño o que los compuestos utilizados no son lo suficientemente sensibles para mostrar el papel de estas vías. Esta vía de segundos mensajeros ha sido involucrada en procesos supervivencia neuronal y en la regulación del crecimiento axonal. Sin embargo, estas acciones no lo hace exclusivamente esta enzima sino que lo hace en conjunción con la MAPK-ERK y la PLC, actuando las tres de manera sinérgica (Yang F, 2001)

Controles negativos. El uso de los compuestos tirfostina A y PP3 como controles negativos obedece a la necesidad de determinar posibles efectos de la estructura química de los compuestos aquí utilizados. La tirfostina A ha sido usada comúnmente como control negativo para compuestos AG (AG1276, AG1478, AG490) y el compuesto PP3 ha sido usado como control del compuesto PP1 (Oh U, 1995; Abdul-Ghani MA, 1996; Paillart C, 1997; Portier B, 1999). Los resultados obtenidos después de cuatro horas de registro con ambas moléculas muestran que no existe efecto alguno sobre el patrón de sueño (ver cuadro 1), tampoco en alguno de los parámetros obtenidos a partir de estas fases, como frecuencia, duración y latencia (ver anexo 1). Lo que sugiere que tanto el vehículo como las moléculas inactivas no tuvieron efecto alguno sobre los cambios observados en el patrón de sueño con los inhibidores utilizados a lo largo de las cuatro horas de registro.

HIVgp120 y sueño

Estimaciones epidemiológicas sugieren que entre 20 y 30% de adultos y 50% de niños con sida desarrollan demencia (Epstein LG, 1988; Brew BJ, 1999). Este síndrome está caracterizado por déficit en atención y memoria, así como alteraciones motoras (Jassen RS, 1989; Brew BJ, 1999). El VIH entra al cerebro relativamente pronto después de la infección (Perry SW, 1990). Como resultado de su ingreso varias proteínas constituyentes del virus pueden, en consecuencia, también entrar. entre ellas la gp120. Se ha reportado que algunas alteraciones en el patrón de sueño se pueden observar en los primeros estados de la infección (Darko DF, 1992). La glucoproteína 120, mejor conocida como HIVgp120 que proviene del humano, tiene su origen en el gen *env* que codifica para una proteína precursora de 160 kDal que al ser proteolíticamente desensamblada da origen a la HIVgp120 y a la HIVgp41. La administración aguda de HIVgp160 y HIVgp41 a ratas altera el patrón de sueño al producir incremento de sueño lento, fragmentación de este e inducción de respuesta febril cerebral (Gemma C, 1999). Mark Opp en 1996 reportó que la administración de una sola dosis de 100 ng de HIVgp120, a ratas al inicio del periodo de oscuridad, produce incremento de sueño lento y sueño MOR durante las dos primeras horas de registro además de que el incremento de sueño lento se correlacionó con el incremento en las cifras de interleucina 1 (Opp MR, 1996).

Al comparar los resultados obtenidos por la administración aguda de HIVgp120 al ventrículo lateral de ratas realizado por el grupo de Opp con los descritos en esta tesis se puede considerar que fueron replicados parcialmente. Lo anterior es debido a que 100 ng de HIVgp120 administrados en el ventrículo lateral de ratas durante el periodo de luz produjo incremento de sueño MOR durante las cuatro horas de registro (al igual que lo reportado por Opp) pero no de sueño lento. La ausencia de incremento en el sueño lento observada en esta investigación puede ser explicada por tres vías. Este estudio fue realizado durante el periodo de luz, en contraposición con lo realizado por Opp que fue

realizado durante el periodo de oscuridad; la cepa usada de ratas es diferente, Wistar vs Sprague-Dawley y el incremento de sueño lento puede tener alguna relación con la interleucina 1. En este sentido se ha descrito que cuando se administra HIVgp120 en ventrículo lateral de ratas es casi indetectable observar incremento de IL-1 β , pero si esta proteína, HIVgp120, es inyectada fuera del tejido ventricular las cifras de IL-1 β se incrementan rápidamente debido a mayor expresión (Sundar SK, 1991). Uno de los efectos de la interleucina 1 β sobre el sueño es el incremento de sueño lento (Shoham S, 1987). Por último, a la pregunta de si los cambios agudos observados después de la administración de HIVgp120 o alguno de los tratamientos, aquí descritos, tiene efectos a largo plazo (más de las cuatro horas aquí mostradas) no se pueden responder con estos experimentos.

El incremento agudo de sueño MOR observado en este trabajo después de la administración de HIVgp120 es consistente con lo reportado por Opp (Opp MR, 1996). Cuando realizamos el tratamiento conjunto inhibiendo la enzima MAPK-ERK y adicionamos HIVgp120, el incremento agudo de sueño MOR observado solamente por HIVgp120 no aparece. Por el contrario, cuando se administra el inhibidor para la p38-MAPK y la HIVgp120 no se logra detener el incremento agudo de sueño MOR. Por lo anterior, el efecto observado sobre el sueño MOR, al parecer puede ser atribuido a la activación de la MAPK-ERK pero no a la p38MAPK. Estos resultados parecen coincidir con lo reportado por Lannuzel y posteriormente Meucci, quienes mostraron que la administración de concentraciones picomolares de HIVgp120 a cultivos de neuronas activa rápidamente y de forma sostenida la enzima MAPK-ERK pero no la p38MAPK (Lannuzel A, 1997; Meoucci, 1998).

Debido a que las neuronas no son infectadas por el HIV, los efectos observados tanto agudos como crónicos pueden deberse a un mecanismo indirecto. La HIVgp120 ha mostreado producir efectos a corto y largo plazo en ratas. (ver Sánchez-Alavez M, 1999; 2000). Se ha reportado incremento de

glutamato producido por HIVgp120, este incremento de glutamato produce incremento de calcio intracelular el cual es necesario para la activación de la MAPK-ERK. Para que se realice la activación de esta enzima se necesita de la activación previa de la proteína RAS (Ras/Raf/MAPK-ERK). La proteína Ras tiene un dominio de plesktrina. Este dominio de plesktrina es dependiente de calcio. Se ha reportado que al generarse incremento de calcio intracelular se produce activación de la MAPK-ERK por activación previa de Ras. El dominio de plesktrina no es exclusivo de RAS ya que se ha descrito también en otras proteínas como pp125FAK y PYK2 (Lev S, 1995; Siciliano J, 1996). Además de que el calcio puede activar la MAPK-ERK también puede activar otra cinasa conocida como la cinasa dependiente de calcio calmodulina o CAMKII. En este caso, evidencias recientes muestran que cuando esta enzima es activada por calcio puede, a su vez, activar a la MAPK-ERK (Muthalif MM, 1996; Vanhoutte P, 1999).

En los pocos estudios publicados a la fecha sobre el efecto agudo de la proteína gp120 sobre el sueño en ratas se observan cambios, los cuales al parecer dependen de la procedencia de la proteína y ahora, al parecer, del ciclo de luz. Por ejemplo, se ha reportado que la administración aguda de 100 ng de gp120 de origen felino (FIVgp120) durante el periodo de luz disminuye el sueño lento 2 y el sueño MOR (Prospero-García O, 1994, 1999). Por el contrario, la administración durante el periodo de oscuridad de 100 ng de gp120 de origen humano (HIVgp120) incrementa el sueño lento y el sueño MOR (Opp MR, 1996) en tanto que si estos 100 ng de HIVgp120 se inyectan durante el periodo de luz se observa únicamente incremento de sueño MOR.

Por otro lado, los resultados obtenidos con la administración aguda del inhibidor de la enzima p38-MAPK (SB202190) sugieren que esta enzima tiene un papel en el sueño, ya que altera todos los estados, siendo el sueño MOR el más afectado durante las cuatro horas de registro. Ésta es la primera evidencia fisiológica que muestra que esta enzima está involucrada en el fenómeno del

sueño, aunque al parecer no está involucrada en el incremento agudo de sueño MOR generado por la administración única de 100 ng de HIVgp120. Se ha reportado que esta vía de transducción de señales este relacionada con estados crónicos de infección aunque nadie ha reportado relación directa entre HIVgp120 y esta enzima. Esta enzima ha sido ligada a los procesos de inflamación, crecimiento celular, diferenciación, y apoptosis (Ono K, 2000). Lo anterior sugiere que podría estar implicada a largo plazo ya que el tratamiento crónico con HIVgp120 produce cambios en la memoria, LTP, sueño y apoptosis en neuronas (Bageeta L, 1997; Lipton SA, 1998; Sanchez-Alavez M, 2000). Los resultados presentados anteriormente sugieren la importancia de la vía de transducción de señales medida por la MAPK-ERK en las modificaciones agudas del patrón de sueño producidas por la HIVgp120. Estos cambios son agudos, sin embargo, algo interesante es que actualmente se encuentra en fase II de estudios clínicos el compuesto GPI-1189, una molécula con propiedades similares al U0126, para tratar las alteraciones neurológicas producidas en la demencia asociada la SIDA (McGuire D, 2000; Pulliam L, 2001).

CONCLUSIONES

Factores de crecimiento y sueño. Los receptores para factores de crecimiento se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro. Estos receptores son complejos ya que tienen varios ligandos y varias enzimas acopladas como mecanismos de segundos mensajeros. La unión de alguno de sus ligandos puede dar lugar a la activación total o diferencial de las enzimas intracelulares. Sin embargo, la inhibición del receptor puede ayudar a determinar su posible función en el sueño. La administración ICV aguda de inhibidores de los receptores a factores de crecimiento y a sus segundos mensajero afectó al sueño durante las cuatro horas de registro. Los cambios agudos observados se enfocan principalmente a la disminución del sueño MOR y al incremento de vigilia. El sueño MOR ha sido ligado a los procesos de memoria y aprendizaje

sueño, aunque al parecer no está involucrada en el incremento agudo de sueño MOR generado por la administración única de 100 ng de HIVgp120. Se ha reportado que esta vía de transducción de señales este relacionada con estados crónicos de infección aunque nadie ha reportado relación directa entre HIVgp120 y esta enzima. Esta enzima ha sido ligada a los procesos de inflamación, crecimiento celular, diferenciación, y apoptosis (Ono K, 2000). Lo anterior sugiere que podría estar implicada a largo plazo ya que el tratamiento crónico con HIVgp120 produce cambios en la memoria, LTP, sueño y apoptosis en neuronas (Bagetta L, 1997; Lipton SA, 1998; Sanchez-Alavez M, 2000). Los resultados presentados anteriormente sugieren la importancia de la vía de transducción de señales medida por la MAPK-ERK en las modificaciones agudas del patrón de sueño producidas por la HIVgp120. Estos cambios son agudos, sin embargo, algo interesante es que actualmente se encuentra en fase II de estudios clínicos el compuesto GPI-1189, una molécula con propiedades similares al U0126, para tratar las alteraciones neurológicas producidas en la demencia asociada la SIDA (McGuire D, 2000; Pulliam L, 2001).

CONCLUSIONES

Factores de crecimiento y sueño. Los receptores para factores de crecimiento se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro. Estos receptores son complejos ya que tienen varios ligandos y varias enzimas acopladas como mecanismos de segundos mensajeros. La unión de alguno de sus ligandos puede dar lugar a la activación total o diferencial de las enzimas intracelulares. Sin embargo, la inhibición del receptor puede ayudar a determinar su posible función en el sueño. La administración ICV aguda de inhibidores de los receptores a factores de crecimiento y a sus segundos mensajero afectó al sueño durante las cuatro horas de registro. Los cambios agudos observados se enfocan principalmente a la disminución del sueño MOR y al incremento de vigilia. El sueño MOR ha sido ligado a los procesos de memoria y aprendizaje

donde los receptores a factores de crecimiento y algunas de sus segundos mensajeros han mostrado su importancia tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Las enzimas intracelulares, al parecer, juegan un papel complementario entre ellas y ninguna tiene a su cargo la función exclusiva de los cambios observados. Debido a que únicamente registramos el sueño durante cuatro horas, no sabemos si los cambios observados durante este lapso pudieran tener efectos de rebote durante las siguientes horas del ciclo sueño vigilia de la rata.

SIDA y sueño. La administración aguda de HIVgp120 inactivada por calor no produce alteraciones en el patrón de sueño y se comporta similar al control. Sin embargo, la administración de HIVgp120 incrementa el sueño MOR durante las cuatro horas de registro. Al administrar un inhibidor de la enzima MAPK-ERK previamente a la administración de HIVgp120 se observa que, al parecer, este inhibidor es capaz de impedir el incremento de sueño MOR observado después de la sola administración de HIVgp120. La inhibición de la enzima p38-MAPK no modifica el incremento de sueño MOR producido por HIVgp120. Estos datos sugieren que al vía MAPK-ERK es, al parecer, una de las vías a través de las cuales la HIVgp120 produce el incremento de sueño MOR observado después de la administración aguda de HIVgp120.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

- Abdul-Ghani MA, Valiante TA, Carlen PL, Pennefather PS. Tyrosine kinase inhibitors enhance a Ca²⁺-activated K⁺ current (IAHP) and reduce IAHP suppression by a metabotropic glutamate receptor agonist in rat dentate granule neurones. *J Physiol*. 1996; 496:139-144.
- Arregui CO, Balsamo J, Lillien J. Regulation of signaling by protein-tyrosine phosphatases: potential roles in the nervous system. *Neurochem Res*. 2000; 25:95-105.
- Asensio VC, Campbell IL. Chemokines in the CNS: prurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci*. 1999; 22:504-512.
- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science*. 1953; 118:273-274.
- Atkinson JH, Grant Y, Kennedy CJ, Richman DD, Spector SA, McCutchan JA. Prevalence of psychiatric disorders among men infected with human immunodeficiency virus. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry*. 1998; 45:859-864.
- Berger H. Über das elektroencephalogramm des menschen. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1929; 87:527-570.
- Berger H. Das electroencephalogramm des menschen. *Nova Acta Leopoldina*. 1938; 6:173-309.
- Berger RJ. Tonus of extrinsic laryngeal muscles during sleep and dreaming. *Science* 1961; 134:840.
- Bremer F. L'activité cérébrale au cours du sommeil et de la narcose. Contribution à l'étude du mécanisme du sommeil. *Bull. Acad. R. Med. Belg*. 1937; 4:68-86.
- Bremer F. Historical development on ideas of sleep. In: Petre-quadens O, Schlag JD, Editors. Basic sleep mechanisms. New York, Academic Press. 1974. p 3-12.
- Brew BJ. Aids dementia complex. *Neurologic Clinics*. Central nervous system infections. Christina M Marra, Editor. WB Saunders Company. 1999, p. 861-881.
- Borberly AA. An introduction. In The regulation of sleep. Eds. AA Borbely, O Hayaishi, TJ Sejnowski, JS Altman. HFSP. Strasbourg. 2000.

Bridges AJ, Fry DW. Inhibitors of protein tyrosine kinases. *Curr Opin Biotechnol.* 1995; 6:662-667.

Cannella B, Pitt D, Marchionni M, Raine CS. Neuregulin and erbB receptor expression in normal and diseased human white matter. *J Neuroimmunol.* 1999; 100:233-242.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol. Chem.* 1990; 265:7709-7712.

Carskadon M.A., Dement W.C. Normal Human Sleep: An overview. En: Principles and practice of sleep medicine. Kryger M.H., Roth T., Dement W.C. (Eds) third edition. W.B. Saunders Company Philadelphia, PA E.U. 2000.

Carter-Su C, Rui L, Stofega MR. SH2-B and SIRP: JAK2 binding proteins that modulate the actions of the growth hormone. *Recent Prog Horm Res.* 2000; 55:293-311.

Caton R. The electrical currents of the brain. *Br Med J.* 1875; 278.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature.* 2001; 410:37-40.

Chokroverty S. An overview of sleep. In Sleep disorders medicine: basic science, technical considerations and clinical aspects. Butterworth Heinemann Ed. Boston USA. 1999. p. 7-20

Claesson Welsh L. Platelet-derive growth factor, receptor signals. *J Biol Chem.* 1994; 269:32023-32026.

Cohen S, Isolation of a mouse submaxillary gland protein acceleratin incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal *J Biol Chem.* 237:1555-1562, 1962.

Dahlstrom A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamines containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiolog Scan.* 1964; 232:62.

Darko DF, McCutchan JA, Kripke DF, Gillin JC, Golshan S. Fatigue, sleep disturbances, disability and indices of progression of HIV infection. *Am J Psychiatry.* 1992; 149:514-520.

Darko DF, Mitler MM, Henriksen SJ, Lentiviral infection, immune peptides and sleep. *Adv Neuroimmunol.* 1995; 5:57-77.

De Fraja C, Conti L, Magrass L, Goroni S, Cattaneo E. Members of the Jak/stat proteins are expressed and regulated during development and adulthood in the mammalian forebrain. *J Neurosci Res.* 1998; 54:320-330.

Dement W, Kleitman N. Cyclical variations in EEG sleep and their relation to eye movements, body motility and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1957; 9:673-690.

Dement W. The occurrence of low voltage fast electroencephalogram patterns during behavioral sleep in cat. *Electroenceph Clin Neurophysiol*. 1958; 10:291-296.

Diccionario Mitológico. www.geocities.com/~stilicho/mythology/
www.loggia.com/myth/

Drucker-Colín R. y Prospéro-García O. Neurophysiology of sleep. In Handbook of sleep disorders. Michael J. Thorpy Ed. Marcel Dekker Inc. 1990. p.33-53.

Edelman GM. Neural Darwinism: selection and reentrant signaling in higher brain function. *Neuron*. 1987; 10:115-125.

Edelson E. Sleep. New York, Chelsea House, 1992. p 14, 48-51, 63.

Enciclopedia Británica en Internet. www.britannica.com 12/08/00

Ebadi M., Bashir R. M., Heidrick M. L., Hamada R. M., El Refaey H., Hamed A., Helal G., Baxi M. D., Cerutis D. R., and Lassi N. K., Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int*. 30:347-374, 1997.

Epstein LG, Sharer LR, Goudsmit J. Neurological and neuropathological features of human immunodeficiency virus infection in children. *Ann Neurol*. 1988; 23:519-523.

Evarts EV. Activity of neurons in visual cortex of the cat during sleep with low voltage fast EEG activity. *J Neurol*. 1962; 25:812-815.

Falck B, Hillarp M, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem*. 1962; 10:348-364.

Fang J, Krueger JM. Sleep deprivation enhances phosphorylation of CREB and ERK. *Abstract Soc Neurosci*. 2000, p. 1266.

Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science*, 1993; 262:1011-1018.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein

kinase kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273:18623-18632.

Fischgold H. Le sommeil du nuit, normal et pathologique. En Masson and Cie Editors. Paris 1965. p 2.

Fluclaire P. La révolution du reve, Editions Dangles. Paris, 1994, pp.384

Fukazawa H, Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A in vitro. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42:1661-1671.

Galicía O, Sánchez-Alavez M, Díaz-Ruiz O, Narváez F, Elder JH, Navarro L, Próspero-García O, HIV-derived protein gp120 suppresses P3 potential in rats: potential implications in HIV-associated dementia. *Neuroreport* 2000; 11:1351-1355.

Gemma C, Opp MR. Human immunodeficiency virus glycoproteins 160 and 41 alter sleep and brain temperature of rats. *J Neuroimmunol.* 1999; 97:94-101.

Girault, J-A., Protein phosphorylation and dephosphorylation in mammalian central nervous system. *Neurochem. Int.* 1993; 23:1-25.

Gomez-Pinilla F, Knauer DJ, Nieto-Sampedro H. Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in rat brain. Development and cellular localization. *Brain Res.* 1988; 438:385-390.

Gottesmann C. Detection of seven sleep-waking stages in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992; 16:31-38.

Grahnstedt S, Ursin R. Awakening thresholds for electrical brain stimulation in five sleep-waking stages in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1980; 48:222-229.

Grant SG, O'Dell TJ, Kari KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER. Impaired long-term potentiation, spatial learning and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* 1992; 258:1903-1910.

Grazia de simony M, Imeri L, de Matteo W, Perego C, Simard S, Terrazzino S. Sep regulation: interactions among cytokines and classical neurotransmitters. *Adv Neuroimmunol.* 1995; 5:189-200.

Gray A, Dull TJ, Ullrich A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000 molecular weight protein precursor. *Nature* 1983; 303:722-725.

Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 1975; 257:325-327.

Grewal SS, York RD, Stork PJS. Extracellular-signal-regulated kinase signaling in neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; 4:544-553.

Griesinger W. Berliner medicinisch-psychologische gesellschaft. *Arch Psychiatr. Nervenkr.* 1868; 1:200-204.

Han Y, Caday CG, Nanda A, Vavenee WK, Huang HJ. Tyrphostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.* 1996; 56:3859-3861.

Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: a critical mediator of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:184-189.

Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck-and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem.* 1996; 271:695-701.

Hernández-Peón R, Chavez-Ibarra G. Sep induced by electrical or chemical stimulation of the forebrain. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1963; 24:188-198.

Hess WR. Das schlafsyndrom als folge diencephaler reizung. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 1944; 2:305-344.

Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors:critical mediator of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:184-189.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999; 79:1283-1316.

Hunter, T., Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 1995; 80:225-236.

Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77:1311-5.

Izquierdo LA, Barros VH, Alonso M, Vianna MR, Furman M, Levi de Stein M, Szapiro G, Rodrigues C, Choi H, Medina JH, Izquierdo L. Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2001; 13:1464-1467.

Jassen RS, Cornblat DR, Epstein IG, Human immunodeficiency virus (HIV) infection and the nervous system: report from the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology* 1989; 39:119-122.

Joh T, Itoh M, Katsumi K, Yokoyama Y, Takeuchi T, Kato T, Wada Y, Tanaka R. Physiological concentrations of human epidermal growth factor in biological fluids. Use of a sensitive enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta*. 1986; 158:81-90.

Jouvet M. Telencephalic and rhombencephalic sleep in the cat. In *The nature of sleep*. GEW Wolstenholme y M O'Connor editores. London Churchill. 1961.

Jouvet M y Michael F. Correlations electromyographiques du sommeil chez le chat decortique et mesencephalique. *C R Soc Biol. (Paris)* 1959; 153:422-425.

Kimura M, Kodama T, Aguila MC, Zhang SQ, Inoue S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates rapid eye movement (REM) sleep and non-REM sleep in rats. *J Neurosci*. 2000; 20:5544-5551.

Kleitman N. *Sleep and wakefulness*. Chicago: University of Chicago press. 1939.

Knefati M, Somogyi C, Kapas L, Bourcier T, Krueger JM. Acidic fibroblast growth factor (FGF) but not basic FGF induces sleep and fever in rabbits. *Am J Physiol* 1995; 269:R87-91.

Kohler N and Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res*. 1974; 87:297-301.

Krueger JM, y Obal F. Jr. A neuronal group theory of sleep function. *J Sleep Res*. 1993, 2:63-69.

Krueger JM, Obal Jr F, Kapas L, Fang J. Brain organization and sleep function. *Behav Brain Res*. 1995; 69:177-185.

Krueger JM, Obal F, Fang J. Humoral regulation of physiological sleep: cytokines and GHRH. *J Sleep Res*. 1999; 1:53-58.

Krueger JM. Cytokines and growth factors in sleep regulation. In *The regulation of sleep*. Eds. AA Borbely, O Hayaishi, TJ Sejnowski, JS Altman. HFSP. Strasbourg. 2000.

Kubicki S, Henkes H, Terstegge K, Ruf B. AIDS related sleep disturbances-A preliminary repor in: *HIV and Nervous system* (Kubicki S. Ed) pp 97-105. New York.

Kubota T, Fang J, Kushikata T, Krueger JM. Interleukin-13 and transforming growth factor-beta1 inhibit spontaneous sleep in rabbits. *Am J Physiol*. 2000; 279:R786-792.

- Kushikata T, Fang J, Chen Z, Wang Y, Krueger JM. Epidermal growth factor enhances spontaneous sleep in rabbits. *Am J Physiol.* 1998; 275:R509-514.
- Kushikata T, Fang J, Wang Y, Krueger JM. Interleukin-4 inhibits spontaneous sleep in rabbits. *Am J Physiol.* 1998; 275:R1185-1191.
- Kushikata T, Fang J, Krueger JM. Interleukin-10 inhibits spontaneous sleep in rabbits. *J Interferon Cytokine Res.* 1999; 9:1025-1030.
- Kushikata T, Fang J, Krueger JM. Brain-derived neurotrophic factor enhances spontaneous sleep in rats and rabbits. *Am J Physiol.* 1999; 276:R1334-1338.
- Kushikata T, Kubota T, Fang J, Krueger JM. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sleep in rats and rabbits. *Am J Physiol.* 2001; 280:1001-1006.
- Lannuzel A, Barnier JV, Hery C, Huynh VT, Guibert B, Gray F, Vincent JD, Tardieu M. Human immunodeficiency virus type 1 and its coat protein gp120 induce apoptosis and activate JNK and ERK mitogen-activated protein kinases in human neurons. *Ann Neurol.* 1997; 6:847-856.
- Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musachio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in calcium induced regulation of ion channel and MAPK functions. *Nature* 1995; 376:737-745.
- Levitzki A and Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 1995; 267:1782-1788.
- Loomis A, Harvey E, Hobart G. Cerebral states during sleep as studied by human brain potentials. *J Exp Psychol.* 1937; 21:127-144.
- Maas JB, Power sleep: the revolutionary program that prepares your mind for peak performance. New York: Villard, 1998. p.23.
- McArthur JC, Sacktor N, Selnes O. Human immunodeficiency virus-associated dementia. *Semin Neurol.* 1999; 19:129-150.
- MacWilliam JA. Some applications of physiology to medicine, blood pleasure and heart action in sleep and dreams. *Br Med J.* 1923; 11:1196-1200.
- Mattila AL. Human urinary epidermal growth factor. Effects of age, sex and female endocrine status. *Life Sci.* 1986; 39:1879-1884.
- Mackiewicz M, Sollars PJ, Ogilvie MD, Pack AI. Modulation of IL-1 beta gene expression in the rat CNS during sleep deprivation. *Neuroreport* 1996; 7:529-533.

Maquet P. The role of sleep in learning and memory. *Science* 2001; 294; 1048-1052.

Masliah E, Mallory M, Alford M, Deteresa R, Saitoh T. PDGF is associated with neuronal and glial alterations of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1995; 16:549-556.

McGuire D, Marder K. Pharmacological frontiers in the treatment of AIDS dementia. *J Psychopharmacol*. 2000; 14:251-257.

Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Bushell TJ, Gray PW, Miller RJ. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:14500-14555.

Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 1996; 379:645.

Monier M, Kalbere M, Krupp P. Functional antagonism between diffuse reticular and intralaminary recruitin projections in the medial thalamus. *Exp Neurol*. 1960; 2:271-289.

Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroenceph Clin Neurophysiol*. 1949; 1:455-473.

Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Malik KU. CAMKII mediates activation of MAPK and cytosolic phospholipase A2 in norepinephrine induces arachidonic acid release in rabbit. *J Biol Chem*. 1996; 271:30149-30157.

Nauta WJH. Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J Neurophysiol*. 1946; 9:285-316.

Nicolau MC, Akaarir M, Gamundi A, Gonzalez J, Rial RV. Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep. *Prog Neurobiol*. 2000; 62:379-406.

Norman SE, Chediak AD, Kiel M, Cohn MA. Sleep disturbances in HIV-infected homosexual men. *AIDS* 1990; 4:775-781.

Obal F, Kapas L, Gardi J, Taishi P, Bodosi B, Krueger JM. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced inhibition of growth hormone secretion is associated with sleep suppression. *Brain Res*. 1999; 818:267-274.

O'Dell TJ, Kandel ER, Grant SG. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 1991, 353; 558-560.

- Offen D, Elkon H, Melamed E. Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Suppl.* 2000; 58:153-166.
- Oh U, Ho YK, Kim D. Modulation of the serotonin-activated K⁺ channel by G protein subunits and nucleotides in rat hippocampal neurons. *J Membr Biol.* 1995; 147:241-253.
- Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cell Signal* 2000; 12:1-13.
- Opp MR, Krueger JM. Interleukin-1 is involved in responses to sleep deprivation in the rabbit. *Brain Res.* 1994; 639:57-65.
- Opp MR, Smith EM, Hughes TK. IL-10 acts in the central nervous system of rats to reduce sleep. *J Neuroimmunol.* 1995; 60:165-168.
- Opp MR, Rady PL, Hughes TK, Cadet P, Tyring SK, Smith EM. Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120 alters sleep and induces cytokine mRNA expression in rats. *Am J Physiol.* 1996; R963-R970.
- Oumesmar BN, Vignais L, Baron Van Evercooren A. Developmental expression of platelet derived growth factor receptor in neurons and glial cells of the mouse CNS. *J Neurosci.* 1997; 17:125-139.
- Paillart C, Carlier E, Guedin D, Dargent B, Couraud F. Direct block of voltage-sensitive sodium channels by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 280:521-526.
- Perheentupa J, Lakshmanan J, Hoath SB, Beri U, Kim H, Macaso T, Fisher DA. Epidermal growth factor measurements in mouse plasma: method, ontogeny and sex differences. *Am J Physiol.* 1985; 248:E391-E396.
- Perry SW. Organic mental disorders caused by HIV: update on early diagnosis and treatment. *Am J Psychiatry.* 1990; 696-710.
- Piéron H. Le problème physiologique du sommeil. Paris, Masson. 1913.
- Plata-Salaman CR. Epidermal growth factor and the nervous system. *Peptides* 1991; 12:653-663.
- Portegies P. AIDS dementia complex: a review. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994; 7:S38-S49.
- Potier B, Rovira C. Protein tyrosine kinase inhibitors reduce high-voltage activating calcium currents in CA1 pyramidal neurones from rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1999; 816:587-597.

Prospero-García O, Huitron-Resendiz S, Casalman SC, Sánchez-Alavez M, Diaz-Ruiz O, Navarro L, Lerner DL, Phillips TR, Elder JH, Henriksen SJ. Feline immunodeficiency virus envelope protein (FIVgp120) causes electrophysiological alterations in rats. *Brain Res.* 1999; 836:203-209.

Price RW, Brew B, Sidtis J, Rosenblum M, Scheck AC, Cleary P. The brain and AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 1988; 239:589-592.

Prinz PN, Moe KE, Dulberg EM, Larsen LH, Vitiello MV; Toivola B, Merriam GR. Higher plasma IGF-1 levels are associated with increased delta sleep in healthy older men. *J Gerontol.* 1995; 50:M222-226.

Pulliam L, Irwin LL, Kusdia L, Rempel T, Flitter WD, Garland WA. CPI-1189 attenuates effects of suspected neurotoxins associated with AIDS dementia: a possible role for ERK activation. *Brain Res.* 2001; 893:95-103.

Quirion R, Araujo D, Nair NPV, Chabot JG. Visualization of growth factor receptor sites in rat forebrain. *Synapse* 1988; 2:212-218.

Ranson SW. Somnolence caused by hypothalamus lesion in the monkey. *Arch Neurol Psychiatry.* 1939; 41:1-23.

Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. NIH rep. No. 204. Bethesda, MD. 1968.

Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:1207-1210.

Sánchez-Alavez M, Navarro L, Diaz-Ruiz O, Galicia-Castillo O, Sánchez-Narvaez F, Murillo-Rodríguez E, Gómez-Chavarrin M, Palomero-Rivero M, Prospero-García O. Aspectos moleculares de la demencia asociada al SIDA. *Salud Mental* 1999; 22:49-65.

Sasahara M, Fries JW, Raines EW, Gown AM, Westrum LE, Frosh MP, Bonthron DT, Ross R, Collins T. PDGF in neurons of the central nervous system, posterior pituitary and in a transgenic model. *Cell* 1991; 64:217-227.

Schaudies RP, Christian EL, Savage CR. Epidermal growth factor immunoreactive material in the rat brain. Localization and identification of multiple species. *J Biol Chem.* 1989; 264:10447-10450.

Schenk PW, Snaar-Jagalska E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochem Biophys Acta.* 1999; 1449:1-24.

Schuld A, Mullington J, Hermann D, Hinze-Selch D, Fenzel T, Holsboer F, Pollmacher T. Effects of granulocyte colony-stimulating factor on night sleep in humans. *Am J Physiol*. 1999; 276:R1149-1155.

Sei H, Saitoh D, Yamamoto K, Morita K, Morita Y. Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. *Brain Res*. 2000; 877:387-390.

Sei Y, Whitesell L, Kustova Y, Paul IA, Morse HC, Skolnick P, Basile AS. Altered brain fyn kinase in a murine acquired immunodeficiency syndrome. *FASEB J* 1996; 10:339-344.

Shoham S, Davenne D, Cady AB, Dinarello CA, Krueger JM. Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *Am J Physiol*. 253:R142-R149.

Siciliano J, Toutant M, Derkinderen P, Sasaki T, Girault JA. Differential regulation of proline rich tyrosine kinase 2 cell adhesion kinase b (PYK2/CAKb) and pp125FAK by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *J Biol Chem*. 1996; 271:28942-28946.

Siegel JM. The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science* 2001; 294:1058-1063.

Smits A, Funa K. Platelet-derived growth factor (PDGF) in primary brain tumours of neuroglial origin. *Histol Histopathol*. 1998; 13:511-520.

Smith C. Sleep states and memory processes. *Behav Brain Res*. 1995; 69:137-145.

Soderling TR, Derkach VA. Postsynaptic protein phosphorylation in LTP. *Trends Neurosci*. 2000; 23:75-80.

Spath-Schwalbe E, Hansen K, Schmidt F, Schrezenmeier H, Marshall L, Burger K, Fehm HL, Born J. Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83; 1573-1579.

Spiegel R. Aspects of sleep, daytime vigilance, mental performance and psychotropic drug treatment in the elderly. *Gerontology* 1982; 28:68-82.

Sterman MB, Clemente CD. Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. *Exp Neurol*. 1962; 6:91-102.

Sundar SK, Cierpial MA, Kamaraju LS, Long S, Hsieh S, Lorenz C, Aaron M, Rithchie JC, Weiss JA. Human immunodeficiency virus glycoprotein (gp120)

infused into rat brain induces interleukin to elevate pituitary-adrenal activity and decrease peripheral cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:11246-11250.

Sweatt JD. The neuronal MAPK kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*. 2001; 76:1-10.

Tafti M, Franken P, Kitahama K, Malafosse A, Jouvet M, Valatx JL. Localization of candidate genomic regions influencing paradoxical sleep in mice. *Neuroreport* 1997; 8:3755-3758.

Taishi P, Chen Z, Obal F, Hansen MK, Zhang J, Fang J, Krueger JM. Sleep-associated changes in interleukin-1beta mRNA in the brain. *J Interferon Cytokine Res*. 1998; 18:793-398.

Takahashi S, Krueger JM. Nerve growth factor enhances sleep in rabbits. *Neurosci Lett*. 1999; 264:149-152.

Terao A, Matsumura H, Yoneda H, Saito M. Enhancement of slow-wave sep by tumor necrosis factor-alpha is mediated by cyclooxygenase-2 in rats. *Neuroreport* 1998; 19:3791-3796.

Timo-laria C, Negrao N, Schmidek WR, Hocino K, Lobato CE, Da Rocha TL. Phases and stages of sleep in the rat. *Physiol Behav*. 1970; 5:1057-1062.

Tobler I. Is sleep fundamentally different between mammalian species? *Behav Brain Res*. 1995; 69:35-42.

Tononi G, Cirelli C, Shaw PJ. Molecular correlates of sleep, the awake state and sleep deprivation. In *The regulation of sleep*. Eds. AA Borbely, O Hayaishi, TJ Sejnowski, JS Altman. HFSP. Strasbourg. 2000.

Ursin R., Sterman M.A. A manual for standard scoring of sleep and waking states in the adult cat. UCLA press 1981, Los Angeles CA E.U.

Uthgenannt D, Schoolmann D, Pietrowsky R, Fehm HL, Born J. Effects of sleep on the production of cytokines in humans. *Psychosom Med*. 1995; 57:97-104.

Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J. Glutamate induces phosphorylation of Elk1 and CREB along with c-fos activation, via an extracellular signal regulated kinase dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:136-146.

Verges B, Chavanet P, Desgres J, Vaillant G, Waldner A, Brun JM, Putelat R. *Acta Endocrinol*. 1989; 121:633-637.

Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Lotsikas A, Zachman K, Kales A, Prolo P, Wong ML, Licinio J, Gold PW, Hermida RC, Mastorakos G, Chrousos GP. Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:2603-2607.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase, LY294002. *J Biol Chem.* 1994; 269:5241-5248.

Von Economo C. Sleep as a problem of localization. *J Nerv Ment. Dis.* 1930; 7:249-259.

Wagner KR, Mei L, Haganir RL. Protein tyrosine kinases and phosphatases in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1991; 1:65-73.

White JL, Darko DF, Brown SJ, Miller JC, Hayduk R, Kelly T, Mittler MM. Early central nervous system response to HIV infection: sleep distortion and cognitive motor decrements. *AIDS* 1995; 9:1043-1050.

Wiedermann CJ, Jeleosof NJ, Pert CB, Hill JM, Braunsteiner H. Neuromodulation by polypeptide growth factors. Preliminary results on the distribution of epidermal growth factor receptors in adult brain. *Wiener Klin Wochem.* 1988; 100:760-763.

Yamada M, Ikeuchi T, Hatanak H. The neurotrophic action and signaling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol.* 1997; 51:19-37.

Yamuy J, Morales FR, Chase MH. Induction of rapid eye movement sleep by the microinjection of nerve growth factor into the pontine reticular formation of the cat. *Neuroscience* 1995; 66:9-13.

Yamuy J, Sampgna S, Chase MH. Neurotrophin-receptor immunoreactive neurons in mesopontine regions involved in the control of behavioral states. *Brain Res.* 2000; 866:1-14.

Yang F, He XP, Fen L, Mizano K, Liu XW, Russel J, Xiong WC, Lu B. PI3K and IP3 are both necessary and sufficient to mediate NT3 induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci.* 2001; 4:19-28.

Yeh HJ, Ruit KG, Wang YX, Parks WC, Snider WD, Deuel TF. PDGF gene is extreseed by mammalian neurons during development and in maturity. *Cell* 1991; 84:209-216.

Yeh HJ, Silos-Santiago I, Xian Y, George RJ, Snider WD, Deuel TF. Developmental expression of the platelet-derived growth factor receptor gene in mammalian nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1952-1956.

Zhao W, Cavallaro S, Gusev P, Alkon D. Nonreceptor tyrosine protein kinase pp60c-src in spatial learning: synapse-specific changes in its gene expression, tyrosine phosphorylation, and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8098-8103.

Zwick E, Hackel PO, Norbert P, Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signaling systems. *Trends Neurosci.* 1999; 20:408-412.

| | %V | | | %SOL1 | | | %SOL2 | | |
|------------------------|-------|-----|------------|-------|-----|------------|-------|-----|------------|
| | MEDIA | EEM | VS CONTROL | MEDIA | EEM | VS CONTROL | MEDIA | EEM | VS CONTROL |
| DMSO (5 ul) | 20.7 | 2.8 | | 14.1 | 1.5 | | 56.6 | 3.1 | |
| GENISTEINA (25 ug) | 22.5 | 1.9 | | 15.2 | 1.6 | | 58.6 | 2.7 | |
| PD098059 (25 ug) | 11.9 | 0.4 | | 6.7 | 0.5 | ↓ | 73 | 0.7 | ↑ |
| U0126 (6 ug) | 22.6 | 2.1 | | 15.3 | 1.1 | | 57.6 | 1.9 | |
| AG1478 (25 ug) | 37.9 | 1.8 | ↑ | 11.1 | 0.8 | | 46 | 1.1 | |
| AG1478 (25 ng) | 44.9 | 3.5 | ↑ | 20.3 | 1.8 | | 38.1 | 5.4 | ↓ |
| COMPUESTO 56 (41.5 ng) | 35.8 | 1.5 | ↑ | 13.8 | 0.9 | | 50.3 | 2.3 | |
| AG1296 (25 ug) | 35.8 | 2.1 | ↑ | 13.8 | 1.2 | | 51.1 | 2.3 | |
| AG1296 (2.5 ug) | 38.3 | 1.6 | ↑ | 13 | 1 | | 48.9 | 2 | |
| PP1 (25 ug) | 24.4 | 1 | | 16.3 | 0.9 | | 58 | 1.3 | |
| HERBIMYCINA A (50 ng) | 43.1 | 1.8 | ↑ | 17.5 | 1.4 | | 37.9 | 2.7 | ↓ |
| AG490 (25 ug) | 28.3 | 0.9 | | 17.8 | 0.8 | | 48.2 | 1.5 | |
| AG490 (50 ug) | 31.5 | 3 | | 17.8 | 2.3 | | 18.8 | 2.4 | |
| WORTMANNINA (50 ng) | 25.3 | 3.9 | | 12.8 | 2.1 | | 55.2 | 3.7 | |
| LY294002 (10 ug) | 33.5 | 1.7 | ↑ | 10.4 | 0.8 | | 46.5 | 1.3 | |
| LY294002 (50 ug) | 29.4 | 2 | | 14 | 0.8 | | 53.1 | 2 | |
| TYRPHOSTINA A (25 ug) | 20.9 | 1.6 | | 11.4 | 0.7 | | 59.5 | 1.5 | |
| PP3 (25 ug) | 22.8 | 2.5 | | 10.4 | 1.3 | | 58.8 | 2.4 | |

| | %MOR | | FV | | FSOL1 | |
|------------------------|-------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|
| | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIANA | 25% /S CONTROL | MEDIANA | 25% VS CONTROL |
| DMSO (5 ui) | 8.1 | 0.8 | 17 | 13 | 14 | 10 |
| GENISTEINA (25 ug) | 2.8 | 0.4 | ↓ | 14 | 22 | 16.2 |
| PD098059 (25 ug) | 8.7 | 1 | ↓ | 14 | 12 | 10 |
| U0126 (6 ug) | 4.5 | 0.3 | ↓ | 10 | 13 | 11.5 |
| AG1478 (25 ug) | 4.3 | 0.4 | ↓ | 14 | 11 | 9.5 |
| AG1478 (25 ng) | 1.3 | 0.3 | ↓ | 19 | 17 | 16.7 |
| COMPUESTO 56 (41.5 ng) | 0 | 0 | ↓ | 14 | 13 | 11.7 |
| AG1296 (25 ug) | 0 | 0 | ↓ | 17 | 13 | 11.2 |
| AG1296 (2.5 ug) | 0 | 0 | ↓ | 22 | 13 | 13 |
| PP1 (25 ug) | 1.7 | 0.3 | ↓ | 12 | 14 | 12.2 |
| HERBIMYCINA A (50 ng) | 1.3 | 0.2 | ↓ | 19 | 14 | 13 |
| AG490 (25 ug) | 5.1 | 0.6 | ↓ | 15 | 14 | 13 |
| AG490 (50 ug) | 1.9 | 0.5 | ↓ | 13 | 9 | 8.5 |
| WORTMANNINA (50 ng) | 7.4 | 0.8 | | 12 | 11 | 10.7 |
| LY294002 (10 ug) | 8.4 | 0.4 | | 12 | 14 | 12.2 |
| LY294002 (50 ug) | 3.5 | 0.5 | ↓ | 12 | 12 | 10.7 |
| TYRPHOSTINA A (25 ug) | 8 | 0.3 | | 13 | 14 | 13 |
| PP3 (25 ug) | 7.5 | 0.3 | | 11 | 10 | 9.5 |

FSOL2

FMOR

DV

| | 26.5 | 19 | 13 | 12 | 3.6 | 0.7 |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| MEDIANA 25% VS CONTROL | MEDIANA 25% VS CONTROL | MEDIANA 25% VS CONTROL | MEDIANA 25% VS CONTROL | MEDIANA 25% VS CONTROL | MEDIANA 25% VS CONTROL | MEDIANA 25% VS CONTROL |
| DMSO (5 ul) | | | | | | |
| GENISTEINA (25 ug) | 31 | 23.5 | 5 | 4 | 2.9 | 0.3 |
| PD098059 (25 ug) | 29 | 21 | 14 | 9 | 2.3 | 0.3 |
| U0126 (6 ug) | 20 | 18.8 | 7 | 6 | 4.9 | 0.2 |
| AG1478 (25 ug) | 16 | 12.8 | 6 | 4 | 6.5 | 0.6 |
| AG1478 (25 ng) | 19 | 15.5 | 3 | 1 | 5.9 | 0.3 |
| COMPUESTO 56 (41.5 ng) | 13 | 11.8 | 0 | 0 | 6.2 | 0.4 |
| AG1296 (25 ug) | 16 | 13 | 0 | 0 | 6.4 | 1.1 |
| AG1296 (2.5 ug) | 19 | 18 | 0 | 0 | 4.1 | 0.4 |
| PP1 (25 ug) | 15 | 14 | 2 | 2 | 5.8 | 0.6 |
| HERBIMYCINA A (50 ng) | 15 | 12 | 2 | 1.7 | 6.6 | 1 |
| AG490 (25 ug) | 22 | 17 | 8 | 5.7 | 4.8 | 0.4 |
| AG490 (50 ug) | 15 | 14.8 | 3 | 2 | 5.8 | 0.3 |
| WORTMANNINA (50 ng) | 18 | 15.8 | 6 | 6 | 5.4 | 0.3 |
| LY294002 (10 ug) | 18 | 17 | 11 | 9.2 | 6.1 | 0.7 |
| LY294002 (50 ug) | 16 | 14 | 5 | 4.7 | 5.8 | 0.4 |
| TYRPHOSTINA A (25 ug) | 26 | 21.8 | 12 | 11 | 3.8 | 0.3 |
| PP3 (25 ug) | 20 | 15 | 11 | 9 | 5.1 | 0.6 |

| | DSOL1 | | | DSOL2 | | | DMOR | | | |
|------------------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|
| | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIA | EEM VS CONTROL |
| DMSO (5 ul) | 1.8 | 0.2 | | | 5.7 | 0.8 | | | 1.3 | 0.09 |
| GENISTEINA (25 ug) | 1.3 | 0.09 | | | 5 | 0.6 | | | 1.2 | 0.1 |
| PD098059 (25 ug) | 1.2 | 0.08 | | | 7.2 | 0.6 | | | 1.4 | 0.1 |
| U0126 (6 ug) | 2.7 | 0.1 | | | 6.9 | 0.4 | | | 1.3 | 0.1 |
| AG1478 (25 ug) | 2.4 | 0.2 | | | 7.2 | 0.7 | | | 1.9 | 0.2 |
| AG1478 (25 ng) | 2.6 | 0.1 | | | 5.6 | 0.7 | | | 0.9 | 0.2 |
| COMPUESTO 56 (41.5 ng) | 2.5 | 0.1 | | ↑ | 9.3 | 0.5 | | | 0 | 0 |
| AG1296 (25 ug) | 2.5 | 0.2 | | | 9 | 1.6 | | | 0 | 0 |
| AG1296 (2.5 ug) | 1.9 | 0.1 | | | 6 | 0.6 | | | 0 | 0 |
| PP1 (25 ug) | 2.6 | 0.1 | | | 7.6 | 0.7 | | | 1.2 | 0.1 |
| HERBIMYCINA A (50 ng) | 2.9 | 0.3 | | ↑ | 6.2 | 0.6 | | | 1.3 | 0.1 |
| AG490 (25 ug) | 2.4 | 0.1 | | | 6.1 | 0.8 | | | 1.4 | 0.1 |
| AG490 (50 ug) | 4 | 0.5 | | ↑ | 7.3 | 0.5 | | | 1.1 | 0.1 |
| WORTMANNINA (50 ng) | 2.1 | 0.3 | | | 7.2 | 0.2 | | | 1.7 | 0.1 |
| LY294002 (10 ug) | 1.6 | 0.2 | | | 5.3 | 0.3 | | | 1.6 | 0.1 |
| LY294002 (50 ug) | 2.7 | 0.3 | | | 7.8 | 0.7 | | | 1.5 | 0.08 |
| TYRPHOSTINA A (25 ug) | 2 | 0.1 | | | 5.8 | 0.3 | | | 1.5 | 0.02 |
| PP3 (25 ug) | 2.6 | 0.4 | | | 8.4 | 1.1 | | | 1.7 | 0.07 |

| | LSOL1 | | | LSOL2 | | | LMOR | | |
|------------------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|--|
| | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIA | EEM VS CONTROL | MEDIA | EEM VS CONTROL | |
| DMSO (5 ul) | 5.2 | 1.4 | 11.7 | 2.6 | 49.6 | 7.3 | | | |
| GENISTEINA (25 ug) | 9.2 | 2 | 19 | 3.6 | 77.2 | 14.4 | | | |
| PD096059 (25 ug) | 38.29 | 10.3 | 32.3 | 6.7 | 60.3 | 5.1 | | | |
| U0126 (6 ug) | 8.3 | 0.7 | 17 | 3.7 | 51.2 | 10.6 | | | |
| AG1478 (25 ug) | 14.6 | 2.6 | 31 | 6.7 | 89.2 | 13.9 | | | |
| AG1478 (25 ng) | 27.3 | 7.8 | 38.8 | 6 | 127.5 | 32 | ↑ | ↑ | |
| COMPUESTO 56 (41.5 ng) | 8.8 | 2.6 | 12.4 | 1.5 | 0 | 0 | ↑ | ↑ | |
| AG1296 (25 ug) | 20 | 4.4 | 32.1 | 7.5 | 0 | 0 | ↑ | ↑ | |
| AG1296 (2.5 ug) | 20 | 2.1 | 40.2 | 7 | 0 | 0 | ↑ | ↑ | |
| PP1 (25 ug) | 14 | 1.7 | 26.9 | 3.9 | 103.6 | 14.2 | | | |
| HERBIMYCINA A (50 ng) | 13.3 | 2.8 | 28 | 5.3 | 98.4 | 19.6 | | | |
| AG490 (25 ug) | 19.3 | 3.7 | 15.9 | 1.1 | 85.5 | 14.6 | | | |
| AG490 (50 ug) | 21.8 | 4.2 | 41.4 | 5.9 | 86.4 | 9.4 | ↑ | | |
| WORTMANNINA (50 ng) | 13.2 | 2.8 | 21.6 | 3.1 | 52.2 | 8.1 | | | |
| LY294002 (10 ug) | 10.4 | 2.3 | 31.8 | 4.4 | 91.5 | 4.7 | | | |
| LY294002 (50 ug) | 10.2 | 1.5 | 23.5 | 5.9 | 79.3 | 9.5 | | | |
| TYRPHOSTINA A (25 ug) | 9.7 | 1.3 | 16.1 | 1.6 | 37.8 | 2.9 | | | |
| PP3 (25 ug) | 12.5 | 3.4 | 23.7 | 4.8 | 56.9 | 5.3 | | | |

| | %MOR | | FV | | FSOL1 | | | | |
|---------------------------|-------|-----|------------|---------|-------|------------|---------|------|------------|
| | MEDIA | EEM | VS CONTROL | MEDIANA | 25% | VS CONTROL | MEDIANA | 25% | VS CONTROL |
| SALINE (5 ul) n=11 | 8.3 | 1.1 | | 14 | 7.5 | | 16 | 12.5 | |
| DMSO (5 ul) n=10 | 8.1 | 0.8 | | 17 | 13 | | 14 | 10 | |
| GP120 BOILED (100 ng) n=7 | 7.6 | 0.7 | | 10 | 7.5 | | 9 | 9 | |
| GP120 (100 ng) n=8 | 14.1 | 0.8 | ↑ | 9.5 | 9 | | 11.5 | 9.7 | |
| U0126 (6 ug) n=5 | 4.5 | 0.3 | ↓ | 10 | 9 | | 13 | 11.5 | |
| GP120 + U0126 n=6 | 7.2 | 0.6 | | 19 | 16 | ↑ | 11.5 | 7.5 | |
| SB202190 (6 ug) n=6 | 0.3 | 0.1 | ↓ | 18.5 | 17.2 | ↑ | 16 | 13.2 | ↑ |
| GP120 + SB202190 n=9 | 14 | 1.2 | ↑ | 12 | 10 | | 17 | 13 | ↑ |

%V: PORCENTAJE DE VIGILIA

FV: FRECUENCIA DE VIGILIA

%SOL1: PORCENTAJE DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 1

FSOL1: FRECUENCIA DE SUEÑO LENTO 1

%SOL2: PORCENTAJE DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

FSOL2: FRECUENCIA DE SUEÑO LENTO 2

%MOR: PORCENTAJE DE SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS

FMOR: FRECUENCIA DE SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS

| | FSOL2 | | | FMOR | | | DV | | |
|---------------------------|---------|------|------------|---------|------|------------|-------|-----|------------|
| | MEDIANA | 25% | VS CONTROL | MEDIANA | 25% | VS CONTROL | MEDIA | EEM | VS CONTROL |
| SALINE (5 ul) n=11 | 26 | 24.5 | | 12 | 8 | | 4.6 | 0.7 | |
| DMSO (5 ul) n=10 | 26.5 | 19 | | 13 | 12 | | 3.6 | 0.7 | |
| GP120 BOILED (100 ng) n=7 | 17 | 14.5 | | 10 | 10 | | 6.9 | 0.9 | |
| GP120 (100 ng) n=8 | 19 | 16.5 | | 13 | 12 | | 5.2 | 0.8 | |
| U0126 (6 ug) n=5 | 20 | 18.8 | | 7 | 6 | ⇩ | 4.9 | 0.2 | |
| GP120 + U0126 n=6 | 19 | 17.5 | | 9.5 | 8 | | 4.9 | 0.4 | |
| SB202190 (6 ug) n=6 | 16.5 | 12.5 | | 1 | 0.25 | ⇩ | 6.2 | 0.9 | |
| GP120 + SB202190 n=9 | 19 | 17 | | 13 | 13 | | 4.6 | 0.4 | |

FV: FRECUENCIA DE VIGILIA

FSOL1: FRECUENCIA DE SUEÑO LENTO 1

FSOL2: FRECUENCIA DE SUEÑO LENTO 2

FMOR: FRECUENCIA DE SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS

DV: DURACION DE LA VIGILIA

DSOL1: DURACIÓN DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

DSOL2: DURACIÓN DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

DMOR: DURACIÓN DE SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS

| | DSOL1 | | | DSOL2 | | | DMOR | | |
|---------------------------|-------|-----|-------------------|-------|-----|-------------------|-------|------|-------------------|
| | MEDIA | EEM | <u>VS CONTROL</u> | MEDIA | EEM | <u>VS CONTROL</u> | MEDIA | EEM | <u>VS CONTROL</u> |
| SALINE (5 ul) n=11 | 1.9 | 0.1 | | 4.7 | 0.3 | | 1.3 | 0.04 | |
| DMSO (5 ul) n=10 | 1.8 | 0.2 | | 4.7 | 0.4 | | 1.4 | 0.09 | |
| GP120 BOILED (100 ng) n=7 | 2.9 | 0.1 | | 7.7 | 1 | | 1.7 | 0.08 | |
| GP120 (100 ng) n=8 | 2.2 | 0.3 | | 7.5 | 0.4 | | 2.5 | 0.1 | ↑ |
| U0126 (6 ug) n=5 | 2.7 | 0.1 | | 6.9 | 0.4 | | 1.3 | 0.1 | |
| GP120 + U0126 n=6 | 2.4 | 0.3 | | 5.8 | 0.7 | | 1.6 | 0.08 | |
| SB202190 (6 ug) n=6 | 2.8 | 0.3 | | 4.6 | 0.4 | | 0.6 | 0.2 | ↓ |
| GP120 + SB202190 n=9 | 1.4 | 0.1 | ↓ | 6.5 | 0.5 | | 2.6 | 0.1 | ↑ |

DV: DURACIÓN DE LA VIGILIA

DSOL1: DURACIÓN DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

DSOL2: DURACIÓN DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

DMOR: DURACIÓN DE SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS

LMOR

LSOL2

LSOL1

| | LSOL1 | | | LSOL2 | | | LMOR | | |
|---------------------------|-------|-----|------------|-------|-----|------------|-------|------|------------|
| | MEDIA | EEM | VS CONTROL | MEDIA | EEM | VS CONTROL | MEDIA | EEM | VS CONTROL |
| SALINE (5 ul) n=11 | 11 | 2.1 | | 15.5 | 2.7 | | 46.2 | 6.2 | |
| DMSO (5 ul) n=10 | 6.1 | 1.4 | | 10.6 | 2.6 | | 49.6 | 7.3 | |
| GP120 BOILED (100 ng) n=7 | 17 | 2.7 | | 30.4 | 5.1 | | 63.9 | 13.9 | |
| GP120 (100 ng) n=8 | 15.3 | 3.1 | | 25 | 4.5 | | 49.3 | 6.5 | |
| U0126 (6 ug) n=5 | 8.3 | 0.7 | | 17 | 3.7 | | 51.2 | 10.6 | |
| GP120 + U0126 n=6 | 31.4 | 7.9 | | 53.1 | 7.7 | ↑ | 88.4 | 8.9 | |
| SB202190 (6 ug) n=6 | 17.2 | 2.4 | | 33.6 | 7.3 | | 147.9 | 32.3 | ↑ |
| GP120 + SB202190 n=9 | 12.5 | 1.4 | | 18 | 2.5 | | 41.3 | 5.4 | |

LSOL1: LATENCIA DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 1

LSOL2: LATENCIA DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

LMOR: LATENCIA DE SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS

Short communication

Inhibition of the ERK pathway prevents HIVgp120-induced REM sleep increase

Oscar Díaz-Ruiz^a, Luz Navarro^a, Mónica Méndez-Díaz^a, Oscar Galicia^{a,b}, John H. Elder^c, Pietro Paolo Sanna^d, Rene Drucker-Colín^b, Oscar Prospéro-García^{a,*}

^aGrupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-250, 04510 México D.F., Mexico

^bInstituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-250, 04510 México D.F., Mexico

^cDepartment of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

^dDepartment of Neuropharmacology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

Accepted 5 June 2001

Abstract

Approximately 35% of HIV-infected subjects, both children and adults, exhibit alterations in the sleep–waking cycle. HIV surface glycoprotein gp120 has been postulated to contribute to this abnormality. For example, it has been reported that HIVgp120 modifies sleep in freely-moving rats and that it also activates the ERK pathway in brain slices. The goal of this work was to determine if sleep changes induced by HIVgp120 in normal rats are mediated by the MAPK pathway. Our results show that a single intraventricular administration of HIVgp120 selectively increases REMS and that such an increase can be prevented by U0126, an inhibitor of ERK activating enzyme, MEK. In contrast, SB202190, a MAPK-p38 inhibitor, had no effect on HIVgp120-induced increase in REMS. These results suggest that HIVgp120 increases REMS in the rat by specifically affecting the ERK signal transduction pathway. © 2001 Published by Elsevier Science B.V.

Theme: Disorders of the nervous system

Topic: Infectious diseases

Keywords: Sleep–waking cycle; Neurotoxicity; Glutamate; Chemokines; MAPK; MEK; ERK

Individuals infected with the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) exhibit several neuropsychiatric manifestations [9], which include a prominent disorganization of the sleep–waking cycle. These abnormalities have been observed both in children [7] and adults [5]. These changes are an increase in delta sleep during the second part of the night in HIV-infected subjects or a decrease in the total time spent in rapid-eye-movement sleep (REMS) in AIDS patients [5,7]. These alterations are unrelated to opportunistic infections or brain neoplasm, and appear to be a result of HIV-1 infection itself [9,14]. However, since direct HIV-1 infection of neurons has not been docu-

mented, the mechanisms by which HIV-1 causes these alterations are unknown.

One potential explanation supported by mounting experimental evidence is that proteins derived from the virus may be neurotoxic. In particular, HIV-derived glycoprotein-120 (HIVgp120) produces neurotoxicity in both rodent and human neuronal cell types, including hippocampal, retinal ganglion, cortical and cerebellar granule neurons [3,4,8,10]. The mechanism of action of HIVgp120 seems to be via an abnormal facilitation of Ca^{2+} conductance [4,11,12]. Recently, it was also reported that in primary central nervous system (CNS) cells, HIVgp120 activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal transduction pathway [10], whose activation can be associated with Ca^{2+} elevations [18].

The serine/threonine kinases known as ERK-1 and

*Corresponding author. Tel.: +52-5-623-2509; fax: +52-5-623-2241.
E-mail address: opg@servidor.unam.mx (O. Prospéro-García).

ERK-2 or Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)-1 and -2 are part of a signal transduction pathway which can be activated by diverse stimuli including neurotransmitters, growth factors and cytokines. They may act as a major link between events at the level of the plasma membrane and cytoplasmic and nuclear effectors (for review, see Ref. [20]).

Since HIVgp120 increases REMS and slow-wave sleep (SWS) in freely-moving rats [13] and activates the ERK signal transduction pathway in cultured cells [10], we decided to investigate if HIVgp120-induced sleep alterations could be prevented by inhibiting the ERK pathway.

U0126 and SB202190 were purchased from Calbiochem, San Diego CA, USA. HIVgp120 is the natural product obtained from the SF2 isolate of HIV, with purity greater than 95% as determined by gel electrophoresis. This gp120 is from a lymphotropic virus, which seems to be less neurotoxic *in vitro*, since it does not induce cellular death, but it definitively induces behavioral, electrophysiological and biochemical changes [17].

Sixty-two male Wistar rats (280–300 g) were housed in a 12-h light, 12-h dark cycle (lights on at 08:00 h) at constant room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). They were implanted with a stainless steel screw into their parietal bones and a third one into the frontal bone for electroencephalographic recording. Two wire electrodes were inserted into the muscles of the neck for electromyographic recording. Also, a cannula aimed to the right lateral ventricle (AP:0.8, L:1.5, D:3.6) was stereotaxically implanted for the administration of the drugs. After surgery, all rats were housed individually for at least a week for recovery. Food and water were available *ad libitum*.

After the recovery period, rats were acclimatized to the recording chamber for 24 h before beginning the experiment. On the experimental day, they were randomly assigned to eight different groups to receive one of the following treatments: saline ($n=10$, 5 μl); DMSO ($n=11$, 5 μl); denatured (boiled) HIVgp120 ($n=7$, 100 ng); U0126, an ERK inhibitor ($n=5$, 6 μg in 5 μl DMSO); SB202190, a p38 inhibitor ($n=6$, 6 μg in 5 μl DMSO); HIVgp120 ($n=8$, 100 ng); U0126+HIVgp120 ($n=6$, doses as above) and SB202190+HIVgp120 ($n=9$, doses as above). All drugs were *i.c.v.* administered with the aid of a Hamilton syringe. Immediately after treatment, sleep was recorded for 4 h (10:00–14:00 h) in a sound-attenuated chamber with food and water *ad libitum*.

Sleep recordings were scored by visual inspection considering 15-s epochs. The total time of Wakefulness (W), SWS1, SWS2 and REMS was determined. Likewise, latency to SWS1, SWS2 and REM sleep onset, frequency, and mean duration of all the stages were evaluated. These results were analyzed by a one-way ANOVA test followed by a post-hoc Bonferroni test.

Sleep architecture was unaltered in animals treated with vehicle (DMSO) or denatured HIVgp120 when compared to the saline-injected group (Fig. 1), consistent with past

observations [17]. In contrast, HIVgp120 decreased SWS1, although not significantly, and increased REMS (Fig. 1b,d). The latter was mainly due to an increase in REMS mean duration (Table 1).

When administered alone, U0126 decreased REMS (Fig. 1d) by decreasing its frequency (Table 1). In addition, it increased SWS1 (Fig. 1b), but not significantly. SB202190 also altered the sleep pattern by increasing total time in W and SWS1 (Fig. 1a,b) as a result of higher frequencies of both W and SWS1 episodes (Table 1). Consistently, SWS2 and REMS showed a significant decrement in their total time (Fig. 1c,d). The decrease in SWS2 was distributed among all stages, while REMS decrement was due to a frequency decrease (Table 1).

When U0126 and HIVgp120 were administered simultaneously, REMS increments induced by HIVgp120 were prevented (Fig. 1d). In contrast, administration of SB202190 was ineffective in blocking HIVgp120-induced REMS increases (Fig. 1d).

In the present study, a single dose of HIVgp120 (100 ng *i.c.v.*) was able to increase REMS in rats as previously reported by Opp et al. [13]. These authors also reported an increase in SWS2 which we were unable to replicate. This could be due to the use of a different rat strain in that study (Sprague-Dawley vs. Wistar in our study) and/or because they carried out their recordings at a different time of day (16:00–20:00 vs. 10:00–14:00 h in our study).

We also observed that U0126, a selective inhibitor of the ERK pathway [6], was able to prevent the HIVgp120 REMS-increasing effect. This suggests that HIVgp120 acts, at least in part, through the recruitment of this pathway, in agreement with *in vitro* studies [10]. The lack of effect of the p38 inhibitor, SB202190, on the increase in REMS caused by HIVgp120, suggests that the HIVgp120 action on this sleep stage does not involve this pathway and supports the specificity of the effects caused by U0126. Clearly, this is not the only intracellular pathway affected by HIVgp120; however, it seems to play an important role in the generation of the effects on sleep.

The proposed physiological function of ERK on the intracellular mediation of glutamate transmission, *i.e.* induction of immediate early gene (IEG) transcription [18,20] lends support to the hypothesis suggesting that HIVgp120 increases Ca^{2+} conductance by facilitating the activity of glutamate receptors, *i.e.* NMDA or chemokine receptors [4,11,12]. This Ca^{2+} could trigger the activation of ERK1/ERK2 pathway, which in turn activates IEG transcription. The proteins encoded by these genes have been reported to be involved in sleep generation [1].

Glutamate transmission has also been implicated in REMS generation [2,15,19]. However, there is a lack of evidence indicating if the ERK1/ERK2 pathway is involved in this effect. HIVgp120 effect on REMS provides an opportunity to clarify whether or not ERK1/ERK2 pathway is involved in REMS regulation and in the mediation of HIVgp120 toxic effects that influence REMS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

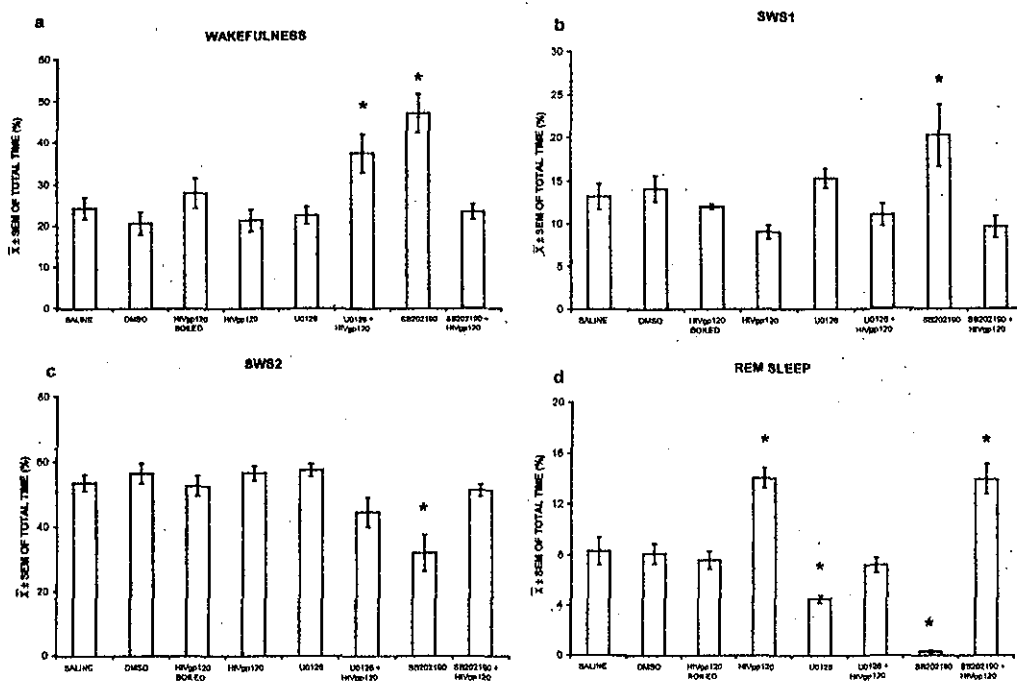


Fig. 1. The effect caused by HIVgp120 on REMS and its prevention by the ERK1/ERK2 inhibitor; U0126 can be seen in (d). All comparisons versus saline and DMSO, $P < 0.05$.

expression. Alternatively, it has been demonstrated that hippocampal neurons express several types of chemokine receptors [12] which besides being used by HIV-1 to infect susceptible cells, can facilitate the activation of the ERK1/ERK2 pathway. However, interaction with these receptors does not activate MAPK-p38 [10,12].

These acute changes, resulting mainly from a massive increase in Ca^{2+} conductance, may progress into a more severe sleep abnormality expressed as a dramatic reduction in REM sleep occurrence, due to a chronic Ca^{2+} dysregula-

tion that may cause neuronal damage and death. For example, patients in advanced stages of AIDS [5], cats infected with the feline immunodeficiency virus for more than a year [16] and rats chronically treated with HIVgp120 [17] show a marked reduction in total REMS.

HIV-1-infected subjects suffer from alterations of their night-time sleep patterns, in association with excessive and debilitating daytime sleepiness and fatigue [5], greatly affecting their quality of life. The present results further our understanding of the pathophysiological mechanisms

Table 1
HIVgp120 sleep and MAPK pathways

| | n | Frequency (\pm S.E.M.) | | | | Density (\pm S.E.M.) | | | | Latency (\pm S.E.M.) | | |
|----------------------|----|---------------------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------------|----------------|---------------|----------------|-------------------------|-----------------|-------------------|
| | | W | SWS1 | SWS2 | REM | W | SWS1 | SWS2 | REM | SWS1 | SWS2 | REM |
| Saline (5 μ l) | 11 | 14.6 \pm 2.6 | 16.1 \pm 2.1 | 27.0 \pm 1.3 | 12.5 \pm 1.6 | 4.6 \pm 0.7 | 1.9 \pm 0.1 | 4.7 \pm 0.3 | 1.3 \pm 0.1 | 11.0 \pm 2.1 | 15.3 \pm 2.7 | 46.2 \pm 6.2 |
| DMSO (5 μ l) | 10 | 17.1 \pm 1.6 | 21.0 \pm 3.3 | 27.5 \pm 3.3 | 13.5 \pm 1.3 | 3.6 \pm 0.7 | 1.8 \pm 0.2 | 4.7 \pm 0.4 | 1.4 \pm 0.1 | 6.1 \pm 1.4 | 10.6 \pm 2.6 | 49.6 \pm 7.3 |
| (HIV)20 (100 ng) | 7 | 10.7 \pm 1.7 | 9.5 \pm 0.2 | 17.1 \pm 1.7 | 10.1 \pm 0.7 | 6.9 \pm 0.9 | 2.9 \pm 0.1 | 7.7 \pm 1.6 | 1.7 \pm 0.1 | 17.0 \pm 2.7 | 10.4 \pm 3.1 | 63.9 \pm 13.9 |
| GPI20 (100 ng) | 8 | 9.7 \pm 0.5 | 10.3 \pm 1.0 | 18.5 \pm 1.0 | 12.3 \pm 0.3 | 5.2 \pm 0.8 | 2.2 \pm 0.3 | 7.5 \pm 0.4 | 2.5 \pm 0.1* | 15.3 \pm 3.1 | 25 \pm 4.5 | 49.3 \pm 6.5 |
| U0126 (6 μ g) | 5 | 11.0 \pm 1.3 | 13.6 \pm 1.2 | 20.0 \pm 0.7 | 8.0 \pm 0.8* | 4.9 \pm 0.2 | 2.7 \pm 0.1 | 6.9 \pm 0.4 | 1.3 \pm 0.1 | 8.3 \pm 0.7 | 17 \pm 3.7 | 51.2 \pm 10.6 |
| GPI20+U0126 | 6 | 17.0 \pm 1.2* | 11.0 \pm 1.5 | 18.8 \pm 1.7 | 9.8 \pm 1.0 | 4.9 \pm 0.4 | 2.4 \pm 0.3 | 5.8 \pm 0.7 | 1.6 \pm 0.1 | 31.4 \pm 7.9 | 53.1 \pm 7.7* | 88.4 \pm 8.9 |
| SB202190 (6 μ g) | 6 | 18.6 \pm 1.3* | 16.8 \pm 1.9* | 16.5 \pm 1.9 | 0.8 \pm 0.3* | 6.2 \pm 0.9 | 2.8 \pm 0.3 | 4.6 \pm 0.4 | 0.6 \pm 0.2* | 17.2 \pm 2.4 | 33.6 \pm 7.3 | 147.9 \pm 32.3* |
| GPI20+SB202190 | 9 | 12.3 \pm 0.9 | 15.5 \pm 1.1* | 19.9 \pm 1.3 | 13.6 \pm 0.6 | 4.6 \pm 0.4 | 1.4 \pm 0.1* | 6.5 \pm 0.5 | 2.6 \pm 0.1* | 12.5 \pm 1.4 | 18.0 \pm 2.5 | 41.3 \pm 5.4 |

* $P < 0.05$. One-way ANOVA and Bonferroni test versus control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

by which HIV infection brings about such changes and thus points to novel targets for developing new therapeutic approaches.

Acknowledgements

This research was supported by Grant IN207799 from DGAPA-UNAM. The authors wish to thank Dr Nancy Haigwood for the donation of HIVgp120. We also thank Manuel Zarate for the care of the animals.

References

- [1] R. Bashcoer, J.E. Sherin, C.B. Saper, J.I. Morgan, R.W. McCarley, P.J. Shiromani, Effects of sleep on wake-induced c-fos expression, *J. Neurosci.* 17 (1997) 9746–9750.
- [2] L. Bettendorff, M. Sallanon-Moulin, M. Touret, P. Wins, I. Margineanu, E. Schoffeniels, Paradoxical sleep deprivation increases the content of glutamate and glutamine in rat cerebral cortex, *Sleep* 19 (1996) 65–71.
- [3] D.E. Bronneman, G.L. Westbrook, S.P. Fitzgerald, D.L. Earnist, K.L. Elkins, M.R. Ruff, C.H. Pert, Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide, *Nature* 335 (1988) 639–642.
- [4] D.E. Brennenman, J. Houser, C.Y. Spong, T.M. Phillips, C.B. Pert, M. Ruff, VIP and D-ala-peptide T-amide release chemokines which prevent HIV-1 gp120-induced neuronal death, *Brain Res.* 838 (1999) 27–36.
- [5] D.F. Darko, M.M. Miller, J.C. Miller, Growth hormone, fatigue, poor sleep, and disability in HIV infection, *Neuroendocrinology* 67 (1998) 317–324.
- [6] M.F. Favata, K.Y. Horiuchi, E.J. Manon, A.J. Dnuterio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, R.A. Scherle, J.M. Trzaskos, Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18623–18632.
- [7] L.S. Franck, L.M. Johnson, K. Lee, C. Hopner, L. Lambert, M. Passeri, E. Manio, A. Dorenbaum, D. Warn, Sleep disturbances in children with human immunodeficiency virus infection, *Pediatrics* 104 (1999) e62.
- [8] C. Gemma, M.R. Opp, Human immunodeficiency virus glycoproteins 160 and 41 alter sleep and brain temperature in rats, *J. Neuroimmunol.* 97 (1999) 94–101.
- [9] J.D. Glass, R.T. Johnson, Human immunodeficiency virus and the brain, *Annu. Rev. Neurosci.* 19 (1996) 1–26.
- [10] A. Lannuzel, J.V. Barnier, C. Hery, V.T. Huynh, B. Guibert, F. Gray, J.D. Vincent, M. Tardieu, Human immunodeficiency virus type 1 and its coat protein gp120 induce apoptosis and activate JNK and ERK mitogen-activated protein kinases in human neurons, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 847–856.
- [11] S.A. Lipton, N.J. Sucher, P.K. Kaiser, E.B. Dreyer, Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity, *Neuron* 7 (1991) 111–118.
- [12] O. Meucci, A. Fatatis, A.A. Sironen, T.J. Bushnell, P.W. Gray, R.J. Miller, Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 14500–14505.
- [13] M.R. Opp, P.L. Rady, T.K. Hughes Jr, P. Cédet, S.K. Tyring, E.M. Smith, Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120 alters sleep and induces cytokine mRNA expression in rats, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) R963–R970.
- [14] R.W. Price, B. Brew, J. Sidits, M. Rosenblum, A.C. Scheck, P. Cleary, The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex, *Science* 239 (1988) 586–592.
- [15] O. Prospéro-García, J.R. Criado, S.J. Henriksen, Pharmacology of ethanol and glutamate antagonists on rodent sleep: a comparative study, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49 (1994) 413–416.
- [16] O. Prospéro-García, N. Herold, T. Phillips, J.H. Elder, F.E. Bloom, S.J. Henriksen, Sleep architecture disturbances in cats infected with feline immunodeficiency virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 12947–12951.
- [17] M. Sánchez-Alavez, J. Crindo, M. Gómez-Chavarín, A. Jiménez-Anguliano, L. Navarro, O. Díaz-Ruiz, O. Galicia, F. Sánchez-Narváez, E. Murillo-Rodríguez, S.J. Henriksen, J.H. Elder, O. Prospéro-García, HIV- and FIV-derived gp120 alter spatial memory, LTP, and sleep in rats, *Neurobiol. Dis.* 7 (2000) 384–394.
- [18] R. Seger, F.G. Krebs, The MAPK signaling cascade, *FASEB J.* 9 (1995) 726–735.
- [19] W.S. Stone, D.L. Walker, P.E. Gold, Sleep deficits in rats after NMDA receptor blockade, *Physiol. Behav.* 52 (1992) 609–612.
- [20] Z. Xia, H. Dudek, C.K. Miranti, M.E. Greenberg, Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism, *J. Neurosci.* 16 (1996) 5425–5436.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN