

01921
164

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGIA



LA VIGILIA PROLONGADA REDUCE LA APOPTOSIS
INDUCIDA POR TNE- α Y VIHgp120, EN RATAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGIA
P R E S E N T A :
CORINNE JENNIFER MONTES RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR PROSPERO GARCIA
REVISORA DE TESIS: MTRA. IRMA YOLANDA DEL RIO PORTILLA

MEXICO, D. F.

MAYO 2003

A





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.

A la Universidad Nacional Autónoma de México le agradezco todas las oportunidades académicas que me ha brindado.

A mis padres Simón y Ofelia, quiero darles las gracias por su incondicional apoyo en cada paso de mi vida. Sin ustedes no sería lo que soy.

A mi hermano, Emmanuel gracias por tu presencia y tus enseñanzas.

Agradezco el apoyo de mi familia, especialmente de mis 4 abuelas.

Emiliano, no existen palabras para agradecerte cada momento que hemos compartido. Sabes bien que ésta tesis no sería lo que es sin las deliciosas discusiones que tuvimos y tus valiosas críticas, pero sobretodo, gracias por nuestra lealtad .

Agradezco al Dr. Oscar Prospéro García por sus insuperables enseñanzas académicas, pero también por las de la vida. Gracias por ser un excelente tutor y una persona admirable..... por amar la ciencia.

Agradezco especialmente al Dr. Silvestre Alavez por sus enseñanzas y su gran empeño en mi formación académica. Esta tesis no se hubiera realizado sin su ayuda.

Al grupo de Neurociencias les agradezco los espacios académicos y sus críticas; Oscar, Pavel, Edy, Alejandro, Luz, Mónica, Khalil, Marcela, Cynthia, Rubén, Marina M., Marina C., Aida, Víctor, Sinuhe. A los externos: Galicia y Alejandra.

Agradezco su apoyo al grupo de muerte neuronal, en el Instituto de Fisiología Celular a cargo del Dr. Julio Morán Andrade.

A los revisores de este trabajo les agradezco sus críticas y correcciones: Dr. Oscar Prospéro García, Mitra. Irma Yolanda del Río, Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Fructuoso Ayala y Dra. Matilde Valencia.

A mi familia universitaria: Emiliano, Paty, Luisa, Sandra, Gonzalo, Rómulo; gracias.

A mis amigos y amigas, Pavel, Liliana, Británico, Aurora, Ángel, Aura, Pol, Hilda y Alma; gracias.

A todos aquellos que me he encontrado en el camino de la vida, Jorge, Pino, Pandal, Cony, Carlos..... y me han permitido aprender sobre otras realidades.

B

RESUMEN

El ciclo sueño-vigilia es un proceso fisiológico regulado por diversas moléculas, entre ellas, algunos factores de crecimiento como: hormona de crecimiento, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). El NGF y el BDNF pertenecen a la familia de las neurotrofinas o factores neurotróficos (FNT's), los cuales promueven la *sobrevivencia neuronal* (Zigmond, *et al.*, 1999). Se ha observado que la vigilia prolongada incrementa los niveles de expresión de el NGF y el BDNF (Cirelli & Tononi, 2002; Brand *et al.*, 2001). Por otro lado, la muerte celular o apoptosis puede inhibirse por acción de los factores neurotróficos (Yuan, 2000). El objetivo de este trabajo fue mostrar que la vigilia prolongada tiene un efecto protector sobre la muerte neuronal inducida por TNF- α y VIHgp120, ambas moléculas relacionadas con procesos neurodegenerativos y apoptóticos. Se utilizaron 46 ratas macho de la cepa Wistar (250-350gr), bajo un ciclo normal de luz oscuridad 12:12, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Las ratas fueron implantadas estereotáxicamente con una cánula en el ventrículo lateral derecho (P:0.8, L:1.5, V:3.8; referente a Bregma). Después de 10 días de recuperación de la cirugía, las ratas fueron administradas con los siguientes fármacos: GRUPO 1, solución salina; GRUPO 2, TNF- α y GRUPO 3, VIHgp120. La velocidad de administración fue de 5 μ l/5min. Inmediatamente después de la administración la mitad de ratas de cada grupo fue privado de sueño total (PST) por 24 horas con la técnica de manipulación gentil, al término de la PST las ratas fueron profundidas. Las ratas restantes fueron colocadas en cajas individuales donde podían dormir libremente; 24 horas después fueron perfundidas. Los cerebros de todas las ratas fueron cortados en frío a 30 μ m. Se utilizaron 2 técnicas para detectar la muerte neuronal: Hoechst, la cual mide condensación del núcleo y TUNEL que detecta la fragmentación del núcleo; se contaron como células apoptóticas las condensadas para Hoechst y se confirmo con células positivas a TUNEL. El conteo de células fue en 3 áreas: CA3, Giro Dentado y Corteza Cerebral. Los resultados muestran que en corteza cerebral la muerte neuronal inducida por TNF- α es mayor que el grupo de salina sin PST, esta muerte neuronal es reducida por la PST. La muerte neuronal inducida por VIHgp120 es igualmente reducida por la PST en la corteza cerebral. Estos datos sugieren que la vigilia prolongada protege a la corteza cerebral de la muerte neuronal inducida por un insulto farmacológico, probablemente por acción de los factores neurotróficos, que son liberados durante la vigilia prolongada.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. EL SUEÑO

1.1 Los descubrimientos más importantes en la investigación del sueño.....	1
1.2 ¿Qué es el sueño?.....	3
1.2.1 Fases del ciclo sueño-vigilia.....	4
1.3 Sueño como cambio conductual.....	6
1.4 Sueño como cambio en la actividad cerebral.....	7
1.4.1 Sueño y estructuras.....	7
1.4.2 Sueño químico y celular.....	8
1.5 Factores Inductores de Sueño.....	11
1.6 Resumen del capítulo.....	13

CAPÍTULO 2. BUSCANDO LAS FUNCIONES DEL SUEÑO

2.1 Privación de sueño.....	14
2.1.1 Privación de sueño en animales.....	15
2.1.2 Privación de sueño en humanos.....	17
2.2 Resumen del capítulo.....	18

CAPÍTULO 3. FACTORES NEUROTRÓFICOS Y SUEÑO

3.1 Factores Neurotróficos.....	20
3.1.1 Factores Neurotróficos y sus funciones.....	21
3.1.2 Receptores con actividad de tirosina cinasa.....	22

3.2 Sueño y factores neurotróficos.....	24
3.3 Resumen del capítulo.....	27

CAPITULO 4. APOPTOSIS Y SUEÑO

4.1 Apoptosis.....	28
4.2 Mecanismos intracelulares de la apoptosis.....	29
4.2.1 TNF- α (factor de necrosis tumoral-alfa).....	30
4.2.2 VIHgp120 (glucoproteína 120, derivada del VIH).....	31
4.3 Apoptosis y sueño.....	33
4.3 Resumen del capítulo.....	34

CAPÍTULO 5. PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DEL PROBLEMA

5.1 Hipótesis y objetivos.....	36
5.2 Método.....	37

CAPITULO 6. RESULTADOS

6.1 Curva Dosis-Respuesta de TNF- α	44
6.1.1 Análisis grueso de la morfología celular.....	44
6.1.2 Análisis con la tinción de Hoechst.....	46
6.2 Privación de Sueño	49
6.2.1 Apoptosis espontánea en el cerebro de la rata.....	49
6.2.2 Privación de sueño y apoptosis inducida por TNF- α y VIHgp120.....	50

E

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

7.1 Curva Dosis-Respuesta de TNF- α	55
7.2 Apoptosis espontánea en el cerebro de la rata.....	55
7.3 Privación de sueño y apoptosis inducida por TNF- α y VIHgp120.....	57
7.4 Acerca de la función del sueño.....	58

CAPITULO 8. CONCLUSIÓN

8.1 Curva Dosis-Respuesta de TNF- α	64
8.2 Apoptosis espontánea en el cerebro de la rata.....	64
8.3 Privación de sueño y apoptosis inducida por TNF- α y VIHgp120.....	64
8.4 Propuesta teórica.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66

F

CAPÍTULO 1. EL SUEÑO

1.1 Los descubrimientos más importantes en la investigación del sueño.

El estudio sistemático del sueño inicia en 1900 con la publicación del libro "La interpretación de los sueños" de Sigmund Freud, iniciando una corriente de pensamiento dentro de la Psicología, la cual dice que las ensoñaciones son la manifestación del Inconsciente humano (deseos reprimidos durante la vigilia) y su interpretación nos permitiría entender su contenido. Sin embargo, la investigación de Freud se basa en estudios clínicos y un gran trabajo interpretativo. Su gran aporte al estudio del sueño fue centrar la atención científica en este fenómeno y enfatizar su utilidad clínica (Hothersall, D., 1997).

Por otro lado, el primero en determinar algunas de las estructuras cerebrales que regulan el sueño, fue el neurólogo Vienés Baron Constantino Von Economo. Este médico observó durante la Primera Guerra Mundial que sujetos con encefalitis letárgica que tenían lesiones en el hipotálamo anterior, área preóptica y cerebro basal anterior presentaban un prolongado estado de insomnio; mientras que los pacientes con lesiones en el hipotálamo posterior presentaban hipersomnia. Von Economo concluyó que la región del hipotálamo cercana al quiasma óptico contiene neuronas que promueven el sueño y el hipotálamo posterior contiene neuronas promotoras de la vigilia (Saper, B. C., Chou, T. C. & Scamell, E. T., 2001).

Asimismo, Bremer en la década de los 30's suponía que el sueño era un proceso pasivo que resultaba de la ausencia de estímulos medioambientales, apoyándose en la teoría pasiva del sueño, la cual establecía que la ausencia de estimulación sensorial provoca el estado de sueño y la presencia de tal estimulación el estado

de vigilia (situando al organismo en un papel pasivo, recipiente de estimulación ambiental). Para demostrarlo desarrolló dos preparaciones en el gato: el cerebro aislado y el encéfalo aislado. En la primer preparación realizó un corte a nivel del surco intercolicular del mesencéfalo; mientras, en la segunda cortó en la unión médula oblonga-médula espinal. Bremer observó que aquellos gatos con cerebro aislado presentaban ondas lentas en su EEG (electroencefalograma)¹ y sus pupilas permanecían mióticas. Con estos datos interpretó que el animal estaba dormido, a diferencia de los gatos con encéfalo aislado, los cuales presentaban un ritmo electroencefalográfico de sueño y vigilia. Con estas observaciones Bremer supuso que el estado que interpretó como sueño era consecuencia de la desafereenciación, porque el corte evitaba que los estímulos sensoriales llegaran por vía de la médula espinal y del nervio trigémino. De esta manera apoyó la teoría pasiva del sueño (revisado en Prospéro-García, O. & Drucker-Colín, R., 1996).

En 1949 Moruzzi y Magoun estimularon en gatos el área cerebral que había entre las dos preparaciones de Bremer (formación reticular), observando una desincronización del EEG en los gatos que tenían actividad lenta de fondo. A esto lo llamaron despertar electroencefalográfico. Moruzzi y Magoun postularon la existencia de un sistema reticular activador ascendente, cuya función sería activar a la corteza cerebral, siendo este el responsable del estado de vigilia de un sujeto (Saper *et al.*, 2001).

¹ El desarrollo de la electroencefalografía por Hans Berger en 1929 fue muy importante para el estudio del sueño, ya que a través de esta técnica fue posible registrar la actividad cerebral (electroencefalograma) y asociarla a estados conductuales.

En 1953 Aserinsky y Kleitman reportan la ocurrencia de movimientos oculares rápidos durante el sueño y a partir de ese momento el sueño es dividido en dos grandes fases: sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR) y sueño sin Movimientos Oculares Rápidos o no MOR (NMOR). Posteriormente se reportó que durante el sueño MOR no solo hay movimientos de los ojos, sino también atonía muscular y una actividad cerebral rápida similar a la presentada en la vigilia, por lo que se le llamó también sueño paradójico (revisado en Prospéro-García, O. & Drucker-Colín, R., 1996).

Jouvet en la década de los 70's propone la teoría monoaminérgica del sueño, la cual postula a la serotonina como reguladora del sueño NMOR y a la noradrenalina como reguladora del MOR. Por otro lado, Hernández Peón postuló la teoría colinérgica del sueño, proponiendo a la acetilcolina como moduladora del sueño MOR. Las investigaciones actuales indican que la serotonina y la noradrenalina están más relacionada con la regulación de la vigilia, aunque Jouvet estaba equivocado, sus investigaciones iniciaron un gran campo de investigación en el sueño² (revisado en Prospéro-García, O. & Drucker-Colín, R., 1996).

1.2 ¿Qué es el sueño?

El sueño no es un proceso aislado, es parte de un ciclo, el ciclo sueño-vigilia, así, se estudia al sueño con respecto a la vigilia y viceversa. Por ejemplo, una diferencia entre el sueño normal y la vigilia normal es el grado de percepción.

² Los términos monoaminérgica, serotoninérgica y colinérgica refieren a sistemas de neurotransmisión. La neurotransmisión es un proceso celular que permite la comunicación neuronal (mediante activación-inhibición) por medio de moléculas endógenas (neurotransmisores), como la serotonina.

Durante la vigilia percibimos y somos concientes del mundo externo, interactuamos con él y respondemos a él; por el contrario, la esencia fundamental del sueño es retirarnos de la interacción con el ambiente. Esta retirada es un proceso activo, que consiste en bloquear el nivel de percepción del organismo, así como, la entrada sensorial. En este contexto, tenemos que admitir que sólo la conciencia duerme, mientras la inconciencia sigue activa.

1.2.1 Fases del ciclo sueño-vigilia

Las fases de ciclo sueño-vigilia se han establecido con base en tres parámetros:

- o Electroencefalograma (EEG): registro de la actividad eléctrica neuronal.
- o Electromiograma (EMG): registro de la actividad eléctrica muscular.
- o Electrooculograma (EOG): registro de los movimientos de los ojos.

El sueño en mamíferos se ha dividido en dos grandes fases: el sueño sin Movimientos Oculares Rápidos (NMOR) y el sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR). El sueño NMOR se caracteriza por una disminución en la actividad electroencefalográfica, llegando a ser lenta y de gran amplitud (Sueño de Ondas Lentas, SOL), presencia de tono muscular y ausencia de movimientos oculares rápidos. La mayor cantidad de sueño NMOR en humanos se presenta en la primera mitad de la noche. El sueño MOR se caracteriza por una actividad electroencefalográfica rápida y de bajo voltaje, ausencia de tono muscular y presencia de movimientos oculares rápidos. La mayor parte del sueño MOR se presenta en la segunda mitad de la noche y se ha relacionado con la mayor cantidad de ensoñaciones, en el humano.

Durante la vigilia (V) en humanos se presentan dos ritmos de actividad cerebral: el ritmo beta, rápido y de bajo voltaje (14 a 25 Hz) y otro que se presenta en la vigilia tranquila llamado ritmo alfa (8 a 13.5 Hz), relacionado al estado de reposo con ojos cerrados. Se observa la presencia de tono muscular y de movimientos oculares rápidos (Sleep Research Society, 1993); (ver fig. 1.1).

En humanos el sueño NMOR se ha dividido en 4 fases (ver fig. 1.1):

- Fase 1: disminuye la actividad cerebral alfa, se presenta el ritmo theta (4-7 Hz), el tono muscular disminuye y aparecen las ondas agudas del vertex.
- Fase 2. se presentan los husos del sueño (12-14 Hz) y los complejos K. La actividad del EEG es de bajo voltaje.
- Fase 3. Se presenta una actividad electroencefalográfica lenta de 0.5-3 Hz, llamada ritmo delta.
- Fase 4. Más del 50% del registro electroencefalográfico es delta.

Se le denomina sueño delta a la fase 3 y 4.

El sueño MOR se caracteriza por una actividad cortical rápida y de bajo voltaje, con un ritmo theta y beta mezclados, es clara la ausencia de tono muscular y la presencia de movimientos oculares rápidos (ver fig. 1.1) (Sleep Research Society, 1993).

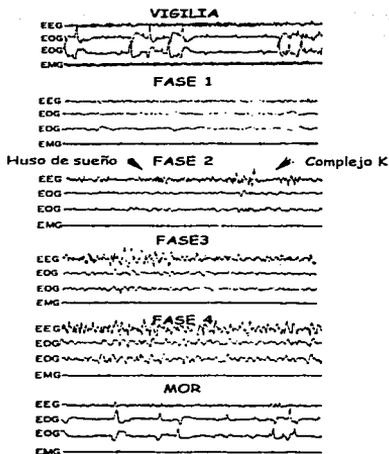


FIG.1.1 Registro polisomnográfico e humanos. EEG, electroencefalograma EOG, electro-oculograma; EMG electromiograma. FUENTE: Manual d la Sociedad de Investigación del sueño

Para aproximarnos a una definición de sueño más clara debemos de pensar en al menos 2 niveles de explicación; el sueño como cambio conductual y como cambio en la actividad cerebral.

1.3 Sueño como cambio conductual

El sueño definido operacionalmente es un estado de quietud de un organismo, acompañado de una postura en reposo (especie-específica), con una disminución en la capacidad para responder a los estímulos externos (Sleep Research Society, 1993).

Los criterios conductuales para considerar que un organismo está durmiendo son:

1. disminución o ausencia de movilidad
2. reducción en la respuesta a los estímulos externos
3. postura característica / especie-específica (estereotipada)
4. reversibilidad rápida al estado de vigilia (diferente a la muerte o al coma)

1.4 Sueño como cambio en la actividad cerebral

El sueño como producto del cambio en la actividad cerebral debemos entenderlo al menos en dos niveles: cambios en la actividad de las estructuras cerebrales y cambios en los sistemas neuroquímicos.

1.4.1 Sueño y estructuras

Estudios de PET (tomografía por emisión de positrones) en humanos reportan una actividad cerebral apenas medible durante el sueño NMOR, principalmente en estructuras rostrales como: el tálamo, ganglios basales, hipotálamo, corteza prefrontal y parietal. En esta fase el cerebro presenta una actividad tan baja que parece estar "desconectado".

En el sueño MOR se observa intensa actividad en el tallo cerebral, tálamo, corteza occipital, lóbulos prefrontales en su parte media-basal y sistema límbico (amígdala, hipocampo y corteza del cíngulo). Por el contrario, la actividad de la corteza parietal y prefrontal dorsolateral disminuye (Braun *et al.*, 1997).

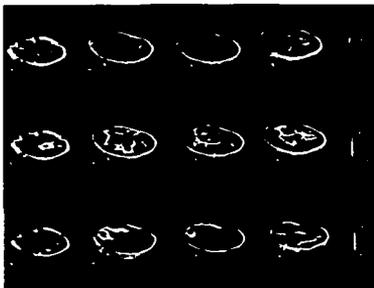


Fig. 1.2 Captación de oxígeno como indicador de la actividad cerebral en las distintas fases del ciclo sueño-vigilia. El panel superior ejemplifica la actividad cerebral durante el sueño NMOR, el panel medio al sueño MOR y el panel inferior a la vigilia. El tono azul indica menor actividad cerebral, el rojo mayor actividad. (Tomado de *Braun et al.* 1997).

Durante la vigilia siempre hay una gran actividad en: corteza prefrontal, lóbulo occipital y lóbulo parietal (principalmente en el izquierdo), además de la periferia del cíngulo y la amígdala (*Braun et al.*, 1997). Ver figura 1.2.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.4.2 Sueño químico y celular

Vigilia

La estimulación del hipotálamo posterior induce el estado de vigilia por acción de las neuronas histaminérgicas. La destrucción de estas neuronas incrementa el sueño y el bloqueo farmacológico con antihistaminérgicos promueve el sueño.

La estimulación eléctrica del hipotálamo anterior provoca sueño por acción de las neuronas GABA-érgicas, las cuales inhiben a las neuronas histaminérgicas del hipotálamo posterior y del núcleo reticularis talámico. La neuronas histaminérgicas están más activas durante la vigilia y menos activas durante el sueño.

En la formación reticular, los núcleos PPT (tegmental pedúnculo-pontino) y LDT (tegmental latero-dorsal) del tallo cerebral contienen neuronas colinérgicas que activan los núcleos intralaminares talámicos, los cuales estimulan a la corteza

cerebral produciendo una actividad eléctrica rápida y de bajo voltaje (Pace-Schott & Hobson, A., 2002; Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M., 2000).

Las neuronas noradrenérgicas del Locus coeruleus y las serotoninérgicas del Rafe dorsal y medio envían sus axones al hipotálamo lateral, donde se unen a las neuronas histaminérgicas. Produciendo la activación de la corteza cerebral (Pace-Schott & Hobson, A., 2002; Kandel, E. R.; Schwartz, J. H. & Jessell, T. M., 2000).

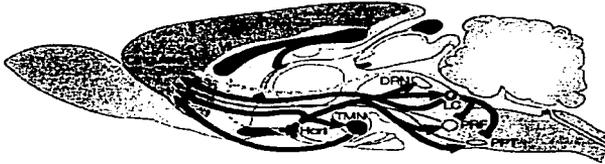


Fig. 1.3 Sistemas de neurotransmisión durante la vigilia. Tomado de Hobson, 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sueño NMOR

El patrón electroencefalográfico del sueño NMOR o de ondas lentas es producido por una sincronización de los potenciales de acción de neuronas corticales; activadas por neuronas talámicas, que a su vez son activadas por el cerebro basal anterior y el área preóptica. La actividad eléctrica cerebral durante el sueño NMOR es rítmica, porque el tálamo es inhibido por neuronas GABAérgicas de los núcleos reticulares talámicos.

Los husos de sueño que aparecen en esta fase dependen de la hiperpolarización inducida por GABA y de la despolarización inducida por calcio en las neuronas de

los núcleos talámicos. Estas neuronas incrementan su ritmo de disparo en el sueño NMOR y disminuye durante el sueño MOR.

El patrón de disparo rítmico de estas células talámicas y corticales impide el libre paso de la información sensorial a través del tálamo hacia la corteza (Pace-Schott & Hobson, A., 2002; Kandel *et al.*, 2000).

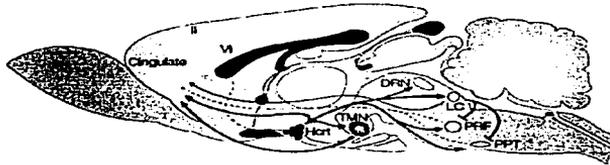


Fig. 1.4 Sistemas de neurotransmisión durante el sueño NMOR. Tomado de Hobson, 2002.

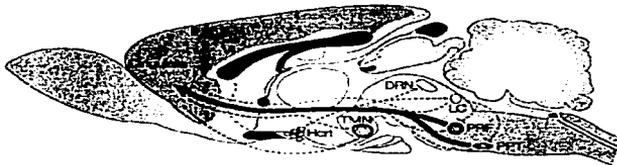
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sueño MOR

Las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior y del puente cerebral (PPT y LDT) se activan durante el sueño MOR. Esta activación provoca que las neuronas GABAérgicas del núcleo *reticularis* talámico se despolaricen, inhibiendo la actividad sincrónica producida por el *reticularis* talámico durante el sueño NMOR, por lo que, las neuronas tálamo-corticales presentan un patrón de disparo desincronizado (Pace-Schott & Hobson, A., 2002; Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M., 2000).

La destrucción bilateral del núcleo *reticularis pontis oralis* inhibe el sueño MOR por largos períodos de tiempo. Este núcleo recibe proyecciones colinérgicas de PPT y

LDT, las cuales generan las espigas PGO (ponto geniculo occipital) del sueño MOR. Las neuronas serotoninérgicas del Rafe dorsal inhiben la actividad PGO. Las neuronas colinérgicas son las llamadas REM-on por Hobson, mientras que las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas locus coeruleus son las llamadas REM off. Las neuronas noradrenérgicas del y las histaminérgicas disminuyen su disparo durante el MOR e inhiben a las neuronas REM-on durante la vigila. La atonía muscular observada en el sueño MOR ocurre por el efecto inhibitorio de neuronas GABAérgicas pontinas sobre serotonina y noradrenalina del puente, con una activación o desinhibición colinérgica. La acetilcolina excita a neuronas glutamatérgicas, las que a su vez, activan interneuronas de la médula espinal liberando glicina. La glicina inhibe a la motoneurona por hiperpolarización, lo que finalmente se observa como una parálisis motora (Pace-Schott & Hobson, A., 2002; Kandel *et al.*, 2000).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig. 1.5 Sistemas de neurotransmisión durante el sueño MOR. Tomado de Hobson, 2002.

1.5 Factores Inductores de Sueño

Pieron (1913) privó de sueño por varios días a un grupo de perros, les extrajo líquido cefalorraquídeo (LCR) y lo administró a otro grupo de perros que habían

dormido libremente. Los perros a los que les administró el LCR se durmieron, Pieron concluyó que esto ocurría por el efecto de alguna molécula o moléculas acumuladas en el LCR de los perros que no habían dormido. A esta molécula la llamó hipnotoxina, sugirió que era producto del metabolismo del organismo y se acumulaba cuando se realizaban diversas conductas. Así, cuando la hipnotoxina alcanzaba ciertos niveles en el organismo se presentaba la necesidad del dormir (revisado en Prospéro-García, O.; Méndez Díaz, M. & Navarro, L., 2001). La búsqueda de hipnotoxinas o moléculas reguladoras del sueño-vigilia ha sido intensa, teniendo ahora una larga lista de estas. TABLA 1.1

Factores Inductores de Sueño

SUSTANCIAS PROMOTORAS DE SUEÑO	SOL	MOR	VIG	SUSTANCIAS PROMOTORAS DE SUEÑO	SOL	MOR	VIG
Hormona del crecimiento, GH	▲	▲	▼	Péptido Vasoactivo Intestinal	▲	▲	▼
Hormona prolactina	--	▲	▼	Pép. semejante a Corticotropina	--	▲	▼
Hormona Liberadora de GH	▲	▲	▼	Cortistatina	▲	▼	--
Insulina	▲	--	▼	Órexinas	▼	▼	▲
Somatostatina	--	▲	▼	Pép. Inductor de Sueño Delta	▲	▼	▼
Progesterona	▲	--	▼	Factor S	▲	▼	▼
Arginina-Vasotocina	▲	--	▼	Sust. Promotora de Sueño	▲	▼	▼
Leptina	▲	--	▼	Uridina	▲	▼	▼
Interferón 2	▲	▼	▼	Deoxicitidina	▲	▼	▼
Interleucina 1 α y β	▲	▼	▼	Neuroproteínas	--	▲	▼
Péptidos murami	▲	▼	▼	Óleamida	▲	--	▼
Factor Necrosis Tumoral	▲	▼	▼	Anandamida	▲	▲	▼
Colecistocimina	--	▲	▼	Prostaglandina D2	▲	--	▼

Tabla 1.1. Factores Inductores de Sueño. Fuente: Los Endocannabinoides y el Sueño, Prospero García *et al.*, 2001. ▲ indica un efecto promotor sobre el sueño, ▼ indica un efecto inhibitor sobre el sueño, -- no cambios observados. SOL (sueño de ondas lentas), MOR (sueño de movimientos oculares rápidos), VIG (vigilia).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.6 Resumen del capítulo

El sueño es el resultado de cambios en la actividad cerebral, para esto, necesita de al menos 2 sistemas neuroquímicos:

- El ejecutor. Se refiere a aquellas moléculas implicadas en producirlo, mediante su activación e inactivación, por ejemplo, acetilcolina.
- El promotor. Activa-inhibe a las moléculas ejecutoras, este sistema no produce el sueño *per se*, solo regula la actividad del ejecutor, por ejemplo los factores inductores de sueño.

Las moléculas implicadas en el sistema promotor generalmente actúan como sistemas ejecutores y/o promotores de otros procesos. Por ejemplo las citocinas inducen sueño NMOR y regulan respuestas inmunológicas. Siguiendo con este ejemplo: las citocinas actúan como factores inductores de sueño NMOR pero quizá no podrían actuar como moléculas del sistema inmunológico si el organismo no duerme. De esta manera, se establece una relación entre el sistema inmune (sistema promotor) y el sueño como resultado del sistema colinérgico o histaminérgico (sistema ejecutor). Un sistema parece necesitar del otro.

La acción de estas moléculas reguladoras de sueño puede ser la clave para conocer el tercer nivel del estudio del sueño: su función.

CAPÍTULO 2. BUSCANDO LAS FUNCIONES DEL SUEÑO

El sueño es un fenómeno que ocupa la tercera parte de nuestra vida. Esta sola observación ya lo hace interesante. Durante años se ha investigado su función, obteniendo datos de sus moléculas y estructuras ejecutoras; se conoce su distribución en el tiempo, incluso se ha clasificado por etapas. Por supuesto estos datos no son suficientes para conocer con certeza su función.

En este capítulo revisaré los experimentos que se han utilizado clásicamente para investigar la función del sueño. Estos experimentos brindan datos muy generales sobre las consecuencias que tiene la pérdida selectiva de sueño sobre un organismo.

2.1 Privación de Sueño

Una forma de investigar los procesos neuronales es alterando su funcionamiento normal. Un método muy utilizado en el estudio del sueño es la privación de sueño (PS) o también llamada vigilia prolongada (VP), que básicamente consiste en no permitir a un organismo que duerma por un periodo de tiempo. El tiempo de PS varía de acuerdo al objetivo del investigador. Así, puede ser moderada (horas) o crónica (días a semanas). Además se puede privar de sueño total (PST) o sólo de sueño MOR (PSMOR). Privar de sueño NMOR es muy difícil, pero se han realizado algunos estudios en humanos que revisaremos adelante.

Una consecuencia de la PS es el llamado rebote de sueño (RS), que consiste en un período de recuperación posterior a la PS (cuando se permite al sujeto dormir), durante el cual, el sujeto duerme más en las fases de sueño delta y MOR,

disminuyendo considerablemente la vigilia y la somnolencia (Sleep Research Society, 1993).

El tiempo de RS varía en función del tiempo de privación, llegando a ser aproximadamente el mismo tiempo que duro la PS. Para fines de investigación el experimentador puede detener el periodo de RS en el momento requerido por el experimento, por ejemplo, privar de sueño por 24 horas a una rata y permitirle dormir dos hora, la rata tendría un rebote de sueño por 2 horas.

La PS brinda información sobre los efectos de la supresión selectiva de sueño y el RS sobre los efectos del propio sueño sobre el organismo.

Los efectos de estas manipulaciones pueden registrarse en los dos niveles que mencione anteriormente: conductual y de actividad cerebral.

2.1.1 Privación de sueño en animales

Everson, Bergman & Rechtschaffen (1989) observaron que la privación de sueño total (PST) en ratas las lleva a una muerte inminente en un rango de 11-32 días³. Las ratas presentaron un deterioro en la apariencia física: ulceraciones en la piel, en la cola y en las patas; alteraciones en la coordinación motora y postural (ataxia); aumento en la ingesta de alimento acompañada de una pérdida de peso considerable e incremento en la energía expedita. Además, durante las ultimas 24 horas, algunas ratas cursaron con disminución en la temperatura corporal.

La PSMOR tiene prácticamente los mismos efectos que la PST sobre las ratas: mueren entre los 16 y 54 días, con lesiones en cola y patas, pérdida de peso a pesar de un incremento en la ingesta de alimento.

³ Día terminal de la PST: 11, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 24 y 32 días.

Por otro lado, Benca *et al.* (1989) encaminados a conocer la causa de la muerte de las ratas privadas de sueño, estudiaron el sistema inmunológico de ratas con PSMOR durante un periodo de 17-26 días y PST por 14 días, encontrando que la PS no alteran el sistema inmunológico de los animales.

PST y recuperación

Everson *et al.* (1989) observaron una óptima recuperación en ratas con PST o PSMOR después de un periodo de recuperación de sueño (RS), alrededor de los 19 días para la PST y de 15 días para la PSMOR. Las ratas mostraron un rebote de sueño MOR en las primeras 14 horas de recuperación tanto para la PST como para la PSMOR. Sin embargo, algunas ratas murieron en un tiempo de 2 a 6 días⁴ aún con el periodo de recuperación. A esto lo llamaron "punto de no retorno". Estas ratas presentaron un gran decremento en la temperatura corporal (3.3, 2.8 y 3.2°C), durante la fase de recuperación no presentaron periodos de sueño o eran mucho menores que las que si se recuperaron de la PS.

Estos estudios aportan datos sobre los efectos físicos de la PS, sin embargo la supresión de sueño también tiene repercusiones importantes en la conducta de los organismos. Los estudios en humanos nos brindan esta información.

⁴ 1 rata con PSMOR por 29 días y 2 con PST por 12 y 22 días

2.1.2 Privación de sueño en humanos⁵

En los estudios de PS con humanos se observa un déficit moderado en pruebas que evalúan procesos cognitivos y, la eficacia para resolver éstas pruebas se recupera con el simple hecho de dormir. Por ejemplo, Harrison & Horne (2000) reportan déficits en memoria temporal en sujetos privados de sueño por 36 horas. En humanos, los déficits en tareas cognitivas como memoria, aprendizaje verbal y atención después de la PS han sido relacionados con el mal funcionamiento de la corteza prefrontal (CPF), sugiriendo una menor actividad neuronal. Sin embargo, Drummond & Brown (2001) reportan que la actividad cerebral de la CPF bajo una tarea de aprendizaje verbal es mayor en sujetos con PS por 34 horas que en aquellos sujetos que durmieron libremente. Estos autores proponen a la activación de la CPF como un mecanismo compensatorio de la PS.

Privación selectiva de sueño No MOR

Agnew y Webb (1967) observaron que la privación del sueño delta provoca malestar físico, síntomas hipocondríacos y conductas interpretadas como aislamiento social; disminuye la vigilancia e incrementa la somnolencia. Sin embargo, es muy difícil privar de sueño NMOR sin afectar al sueño MOR, además

⁵ El mayor tiempo de PS en humanos reportado ha sido por 464 horas y 12 minutos (11 días sin dormir), después de 5 días con PS el sujeto se mostraba irritable, presentaba ensoñaciones diurnas, pequeños déficits en memoria y disminución en la motivación. En la noche tenía claras ilusiones perceptivas; una prueba neuropsicológica realizada 12 horas antes del periodo de recuperación reportó alteraciones en funciones cognitivas, en particular de memoria, atención y lenguaje. El análisis neurológico reportó: deficiente control de los movimientos oculares, disminución en la expresión facial, temblor, movimientos involuntarios en las extremidades y pobre coordinación manual. El registro de EEG solo mostró signos de extremada somnolencia. El sujeto durmió 14 horas y 40 minutos para recuperarse con un RS mayor en la fase 4 y el sueño REM (Ramos Platón, M. J., 1996).

el sueño NMOR ocupa 75-80% del sueño total, por lo que se ha sugerido que los efectos observados por la privación de NMOR son consecuencia de una privación casi total de sueño (citado en Ramos Platón, M. J., 1996).

2.2 Resumen del capítulo

Los estudios con humanos evalúan los efectos de la PS sobre su ejecución en diferentes pruebas cognitivas. La evaluación de su ejecución es muy subjetiva, reportando efectos en el "estado de ánimo o en la motivación" de los sujetos. Los estudios con PET brindan información al estudio del sueño, pero los resultados son inconsistentes, o simplemente, no sabemos como interpretarlos.

En los estudios con animales los resultados también son muy variables, bajo la PST crónica los sujetos ni siquiera mueren en días cercanos. Las observaciones de Rechtschaffen sobre el cuadro clínico anterior a su muerte no esclarecen si es efecto de la supresión de sueño *per se*, o es el resultado del estrés ocurrido durante la PS.

Estos resultados sólo muestran que otros procesos celulares no están ocurriendo normalmente con la supresión de sueño, así, si no dormimos la homeostasis del un organismo se altera y esto resulta en una descompensación metabólica, observándose, por ejemplo en la temperatura corporal.

Es claro que el no dormir produce un desbalance homeostático en el organismo, esto hizo pensar a los investigadores que la función del sueño era "restaurar" al organismo del desgaste ocurrido en la vigilia.

Si aceptamos esto, tenemos que definir primeramente ¿qué significa restaurar? y ¿qué restauraría el sueño? El término restaurar se define como: volver a poner

una cosa en el estado o circunstancia en que se encontraba antes. Por lo que, hablando de sistemas cerebrales restaurar sería *el proceso celular básico necesario para que las neuronas tengan las condiciones óptimas para su buen funcionamiento en el cerebro*. Este trabajo enmarca al sueño como cambio en la actividad cerebral, así, restauraría los sistemas cerebrales. Siendo el sustrato específico las neuronas.

La restauración neuronal se ha relacionado con moléculas llamadas factores neurotróficos (FNT's), los cuales se han relacionado con la sobrevivencia neuronal. Los estudios que relacionan a estas moléculas restaurativas y el sueño es precisamente el tema del siguiente capítulo.

CAPÍTULO 3. FACTORES NEUROTRÓFICOS Y SUEÑO

3.1 Factores Neurotróficos

Los Factores Neurotróficos (FNT's) son moléculas endógenas (polipéptidos y proteínas) que promueven la supervivencia, crecimiento, diferenciación y mantenimiento de las neuronas. Los FNT's hasta ahora descritos son: NGF (factor de crecimiento nervioso), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NT3 y NT4 (neurotrofinas 3 y 4).

En la década de los 40's fue descrito el primer FNT por Víctor Hamburger y Rita Levi-Montalcini: el NGF. Ellos observaron que la supervivencia de neuronas sensoriales y simpáticas durante el desarrollo embrionario dependen del NGF. En ausencia de este factor o su receptor de alta afinidad las neuronas mueren (fig. 3.1). Además el tratamiento con NGF exógeno mantiene neuronas que normalmente morirían (revisado en Zigmond, M. J., Blomm, F. E., Landis, S. C., Robets, J. L. & Squire, L., 1999). Esto llevó a la postulación de la hipótesis neurotrófica, la cual propone que las neuronas inmaduras compiten por células blanco proveedoras de factores tróficos que están suministrados limitadamente. Únicamente las neuronas que tienen éxito en establecer las conexiones sinápticas correctas para la obtención del factor trófico sobrevivirían, las neuronas no exitosas, morirían (Yuan & Yankner, 2000).

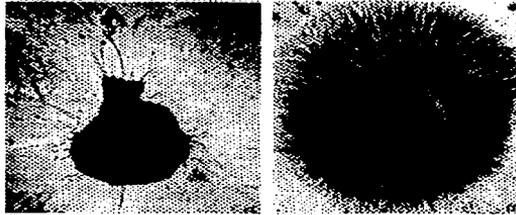


Fig. 3 1Ganglio dorsal de pollo sin NGF (panel de la izquierda) y con NGF (panel de la derecha).
Obsérvese el crecimiento de neuritas en el ganglio tratado con el factor de crecimiento nervioso (NGF),
por lo que se le llamo así. Tomado de Zigmond *et al.*, 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.1 Factores Neurotróficos y sus funciones

Además del clásico estudio de Levi-Montalcini y Hamburger diversos estudios han mostrado el papel de los FNT's en la sobrevivencia celular. Por ejemplo, Rabacchi *et al.* (1999) muestran que el BDNF y la NT4 promueven la sobrevivencia y el crecimiento de neuritas en neuronas de las fibras musgosas ponto-cerebelares.

En ratones knockout deficientes en BDNF y NGF se ha observado una pérdida selectiva de neuronas sensoriales y simpáticas (Altar *et al.*, 1997).

En general la ausencia de las neurotrofinas provoca una pérdida de neuronas en el cerebro. En el Sistema Nervioso Central (SNC) en desarrollo se observan altos niveles de neurotrofinas, esto sugiere un papel importante en el desarrollo y mantenimiento neuronal.

El BDNF facilita la función sináptica en neuronas hipocampales, en cortes hipocampales y en el hipocampo *in vivo* (Schuman, 1999). El BDNF aumenta la

liberación cuantal de neurotransmisor en las zonas activas de sinapsis excitatorias hipocampales (Tyler & Pozzo-Miller, 2001). Así, el BDNF modula la síntesis y liberación de neurotransmisores, apertura de canales iónicos y potenciación a largo plazo en neuronas (Altar *et al.* 1997). Por otro lado, la NT3 es capaz de disminuir la transmisión inhibitoria en neuronas hipocampales (Schuman, 1999).

3.1.2 Receptores con actividad de tirosina cinasa (Trk)

Los FNT's se unen a los receptores membranales trk (receptor de tirosina con actividad de cinasa). Los trk's son glucoproteínas con una masa molecular de 140-145 kDa. Se caracterizan porque al unirseles neurotrofinas fosforilan en su región intracelular un dominio que contiene tirosina, iniciando una gran cantidad de señales intracelulares; incluyendo autofosforilarse (auto activarse). Estos receptores están sumamente conservados entre las especies, encontrándose tanto en humanos como en insectos. Hay 3 tipos de trk descritos: trkA, trkB y trkC. El trkA tiene una alta afinidad con NGF, el trkB con BDNF y NT4, mientras tiene baja afinidad para NT3, finalmente el trkC es de alta afinidad a NT-3. La distribución de los trk's en el cerebro ha sido investigada, por ejemplo, el BDNF, el NT3 y sus receptores, el trkB y el trkC (receptor de tirosina con actividad de cinasa B y C) tienen una alta expresión en la corteza cerebral y en el hipocampo. La especificidad de la distribución del BDNF y la NT3 está relacionada con su participación en procesos de plasticidad neuronal, asociados con el aprendizaje y la memoria (Zigmond *et al.*, 1999).

La unión de los FNT's a los receptores trk activan la formación de dímeros de trk, los cuales activarán otras moléculas, tales como, fosfolipasa C (PLC), fosfatidilinositol-3 cinasa (IP-3K), proteína adaptadora Shc. Estas moléculas coordinan la sobrevivencia neuronal. Por ejemplo: IP3-K al ser activada cataliza la producción de fosfoinositoides, los cuales se unen a una proteína cinasa, Akt. Esta proteína participa en la sobrevivencia de neuronas privadas de FNT's. Akt puede activar varias vías para las señales de sobrevivencia, inhibiendo la acción de Bad, una proteína que promueve la muerte celular ó activando a factores de transcripción como, CREB y NF-kB (factor nuclear-kappaB), moléculas que estimulan vías de sobrevivencia (Yuan & Yankner,2000).

La acción de los FNT's en el SNC maduro está relacionada con procesos de plasticidad sináptica, por ejemplo, la liberación de neurotransmisor; estos procesos requieren del conjunto de la actividad cerebral. Para lograr esto es necesario una interacción con varios grupos neuronales. Se ha mostrado que neuronas colinérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas, GABAérgicas, motoneuronas; neuronas del cerebro basal anterior, hipocampales y cerebelosas son responsivas a NTF's. Sugiriendo la presencia de estos FNT's en prácticamente todo el cerebro y por ende una modulación en muchos procesos neuronales.

En este sentido, los neurotransmisores involucrados en la ejecución del sueño como acetilcolina y la serotonina para la vigilia podrían estar interactuando con los

FNT's en una modulación del sueño-vigilia. Los experimentos que abordaré en el siguiente apartado muestran una primera interacción ente los FNT's y el sueño.

3.2 Sueño y FNT's

Aunque la Hormona del Crecimiento HC no se considera una neurotrofina, si esta relacionada con la función de sobrevivencia y crecimiento de todas las células del organismo. Se ha investigado la función de la HC en el sueño. Por ejemplo, se asocia el pico máximo de liberación de la HC con la fase de sueño NMOR en el humano y en la rata. Si se administra la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (HLHC) se observa un incremento en el sueño NMOR en humanos. La administración central en ratas y conejos induce también sueño NMOR. Si se priva de sueño (PS) a un sujeto se observa un decremento en la proteína de HLHC, la PS en la rata muestra un aumento en los niveles de mRNA (mensajero del ácido desoxirribonucleico) de la HLHC en el hipotálamo; estructura relacionada con la acción de la HC en el organismo y con el sueño. Si se le permite dormir a la rata una o dos horas después de la PS, los niveles de mRNA de HLHC disminuyen (Zhang *et al.*, 1998).

Takahashi & Krueger (1999), observó que la administración de NGF en el ventrículo de conejos provoca un incremento en el sueño REM y NREM, desde la primera hora posterior a la administración del NGF y hasta por 9 horas.

Kushikata, Fang, & Krueger, (1999), muestran como la administración intracerebroventricular de BDNF modifica la cantidad de sueño en ratas y

conejos. En ratas observa un incremento en el sueño NREM y en conejos un incremento en el sueño NREM y REM.

La mayoría de estos experimentos han sido realizados por el grupo de Krueger, quien propone que durante la vigilia el uso de los circuitos neuronales activaría la producción de los FNT's y estos instalarían el sueño. Durante el sueño los FNT's ayudan y cambian los circuitos cerebrales como función del sueño. En este sentido los FNT's actuarían como Sustancias Promotoras del Sueño (SPS), propuestas por Piéron desde 1913 (ver Capítulo 1), las cuales son moléculas que se acumulan durante la vigilia para inducir sueño. Sin embargo, estos resultados no necesariamente indican que los FNT's solo actúan como SPS. Probablemente en el sistema modulador del sueño tengan este papel, pero podrían estar regulando otros procesos que ocurren durante el sueño o la vigilia; como ya he mencionado, el proceso de sobrevivencia celular.

Cirelli (2000) evalúan en ratas los efectos de: el sueño (S), la vigilia espontánea (VE) y la vigilia prolongada (VP) por 3 y 8 horas sobre la expresión del mRNA de 3 moléculas relacionadas con procesos de plasticidad sináptica: P-CREB (elemento forofilado de unión responsivo al cAMP), Arc y BDNF; así como los niveles de sus proteínas. Cirelli & Tononi observan que durante la VP o la VE se incrementa la expresión de P-CREB y Arc en corteza cerebral (Ctx), y sólo de Arc en hipocampo (Hip) ambos relacionados con consolidación de memoria. Por el contrario, durante el S disminuye la expresión de estos genes. Por otro lado, BDNF incrementa su expresión solo con 8 horas de VP o VE en Hip y Ctx, durante el S

disminuye su expresión. Concluyendo que durante la VE o la VP la expresión de estas moléculas incrementa y durante el S disminuye.

Taishi *et al.*, (2001) replican los resultados del trabajo de Cirelli y muestra que si después de la PS les da 2 horas de RS a las ratas, ya no observa diferencias significativas entre el grupo de RS y su control en los niveles de mRNA de BDNF en la Ctx. Adicionalmente, si incrementan la temperatura del recinto donde se encuentran las ratas, se observa un incremento en el sueño MOR y NMOR. Taishi *et al.* observan una disminución en los niveles de mRNA de BDNF en Ctx por el incremento de la temperatura ambiental⁸.

El corte de las vibrisas de un animal provoca un cambio en la organización de neuronas corticales (originalmente organizadas en barril) en la corteza somatosensorial; este fenómeno se utiliza como un modelo animal para estudiar la plasticidad neuronal. Brand *et al.*, (2001) relaciona este modelo con el sueño. Brand mide la inmunoreactividad de neuronas reactivas a NGF en dos condiciones: solo bajo el corte de las vibrisas (CV) versus el CV más PST por 6 horas. Brand reporta un incremento en los niveles de NGF por la sola privación de sueño (37% sobre su control) y en el grupo con CV más PST (41% sobre su control y 21% sobre el control intacto), pero no el grupo con solo el CV. La importancia de este experimento es el incremento de la expresión de NGF observado con la sola privación de sueño.

3.3 Resumen del capítulo

Los estudios presentados en este capítulo validan una relación entre el sueño y el sistema restaurador del cerebro, representado por los FNT's. ¿Para que sirve esta interacción? La teoría de los grupos neuronales propuesta por Krueger y Obál en 1993, propone que el sueño resulta del uso y mantenimiento de las sinapsis que fueron insuficientemente estimuladas durante la vigilia, por lo tanto la función del sueño sería preservar una constancia en la superestructura sináptica, probablemente a través de los FNT's (Krueger, J. M., Obál, F., Kapás, L. & Fang, J., 1995).

En el capítulo anterior observamos que el no dormir resulta dañino al organismo, en este capítulo se muestra una relación entre el sueño y el sistema de restauración neuronal, por lo que, varios investigadores pensaron que la PS podía provocar muerte neuronal o daño en algunas estructuras cerebrales; este es el tema que el capítulo 4 aborda.

* el incremento de la temperatura fue de 25 a 28°C

I CAPITULO 4. APOPTOSIS Y SUEÑO

La sobrevivencia celular como resultado de un proceso de restauración neuronal es solo parte del sistema funcional que regula la homeostasis en el número neuronal, su complemento es la muerte celular llamada también apoptosis. Si los FNT's inducen sueño, esperaríamos que si un organismo no duerme la cantidad de muerte neuronal podría incrementar. Debido a ello, se han realizado numerosas investigaciones esperando encontrar daño neuronal o muerte por efecto de la PS.

4.1 Apoptosis

Los organismos multicelulares necesitan eliminar células que están en exceso o que son potencialmente peligrosas para el organismo, como células infectadas con algún virus. Desde hace dos siglos los biólogos del desarrollo y los citólogos observaron un tipo de muerte celular común a varios tejidos y tipos de células en desarrollo. A este tipo de muerte celular se le llamó apoptosis, término griego dado por Cúrrie en 1972, que describe la caída de las hojas o el marchitar de una flor. La apoptosis tiene características morfológicas diferentes a las observadas en la muerte celular bajo condiciones patológicas o por intoxicación (llamada muerte necrótica), resultando en un común y conservado tipo de muerte celular programada endógena (Hengartner, 2000).

La apoptosis es un proceso de muerte celular activo, regulado por genes específicos y caracterizado por una serie de cambios morfológicos de las células. Por ejemplo, una reducción del volumen celular y la condensación de la cromatina.

4.2 Mecanismos intracelulares de la apoptosis

El proceso de muerte celular incluye la activación de una serie de moléculas intracelulares reguladoras de apoptosis, por ejemplo, la familia de proteínas Bcl-2, la proteína adaptadora Apaf-1 y la familia de caspasas (Yuan & Yankner, 2000).

Familia de proteínas Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 ejerce acciones anti y pro-apoptóticas. Por ejemplo, las proteínas Bcl-2 y Bcl-xl tienen una acción anti-apoptótica; mientras, Bax es una proteína pro-apoptótica (Yuan & Yankner, 2000).

Apaf-1 y Caspasas

Durante el proceso apoptótico Apaf-1 forma un complejo molecular con el citocromo c (liberado por la mitocondria) y la procaspasa 9, llamado apoptosoma, el cual activará a la caspasa efectora 3 y contribuirá a los cambios morfológicos observados en el proceso de muerte. (Hengartner, 2000; Yuan & Yankner, 2000).

Las caspasas son consideradas ejecutores centrales de las vías apoptóticas, porque ellas efectúan los cambios estructurales característicos de este proceso. Por ejemplo, la condensación del núcleo celular es causado por la acción de caspasas sobre proteínas del citoesqueleto, como la fodrina o gelsolina. Además, si se inhibe a las caspasas se observa generalmente una disminución o una prevención de la apoptosis (Hengartner, 2000).

La apoptosis ocurre de manera natural durante el desarrollo embrionario, la regeneración hepática, en células infectadas por algún virus, células del sistema inmune o células que porten mutaciones genéticas.

La apoptosis en un nivel celular puede ser activada por dos vías:

1. Falta de señales positivas o de supervivencia, como los FNT's.
2. Recepción de señales negativas o de muerte: por un incremento en los niveles de oxidantes celulares (especies reactivas de oxígeno, ROS), daño en el DNA y por moléculas que se unen a receptores de la superficie celular activando un programa de apoptosis, como el TNF- α o la VIHgp120.

4.2.1 TNF- α (factor de necrosis tumoral-alfa)

El TNF- α es una citosina secretada por macrófagos, linfocitos T y por muchas células parenquimatosas en situaciones fisiopatológicas. El gen que la regula está mapeado en el complejo mayor de histocompatibilidad I, ubicado en el cromosoma 6. Regula entre otros procesos: citotoxicidad, respuestas inflamatorias y acciones inmunológicas (Pan *et al.*, 1997).

El TNF- α tiene dos receptores, el p55 o TNFR1(receptor a TNF-1) y el p75 o TNFR2. La cascada de muerte apoptótica activada por el TNF- α inicia en el receptor p55. La activación de p55 promueve la unión de TRADD (dominio de muerte asociado al receptor a TNF), éste a su vez, recluta a otra molécula llamada FADD (dominio de muerte asociado a Fas). Este complejo manda la señal de muerte apoptótica, promoviendo la activación de una proteasa, la caspasa 8; la cual activa otras caspasas efectoras, como la caspasa 3 (Baud & Karin, 2001); iniciando así una cascada de proteólisis, prácticamente irreversible.

Aunque no se conocen claramente las cascadas intracelulares que activa el p75, se ha asociado a procesos de supervivencia celular, iniciados por el TNF- α o por el mismo NGF. Yang, Lindholm, Konishi, Li, & Shen (2002), observaron la translocación del factor nuclear-kB en neuronas hipocámpales, donde sólo está presente el receptor p55, sugiriendo el uso de esta vía para su función.

TNF- α y sueño.

TNF- α es considerado una sustancia promotora de sueño. La administración i.c.v de 500ng de TNF- α en ovejas, incrementa la cantidad de sueño NMOR hasta 6 horas post-administración (Dickstein, Moldofsky, Lue, & Hay, 1999). Kubota, Li, Guan, Brown, & Krueger (2002) muestran que la administración de TNF- α en el área preóptica del hipotálamo es capaz de incrementar el sueño NMOR en ratas. El ratones con el receptor p55 bloqueado se observa menos sueño espontáneo que en aquellos que si expresan el receptor. Adicionalmente, en el hipotálamo de la rata se han observado variaciones diurnas en los niveles del RNAm de TNF- α , con niveles máximos en la fase del luz, periodo donde la rata duerme. En humanos los niveles de TNF- α en sangre están mas altos durante la noche, igualmente en la fase de sueño (Petrovsky, Mc Nair & Harrison, 1998).

4.2.2 VIHgp120 (glucoproteína 120, derivada del Virus de Inmunodeficiencia Humana)

En condiciones patológicas se han detectado diversas moléculas capaces de disparar cascadas moleculares que llevan a la apoptosis. Por ejemplo, la VIHgp120 se ha relacionado con la muerte neuronal observada por la Demencia

Asociada al VIH (DAV), (Kaul, Garden & Lipton, 2001). La DAV se presenta entre el 20 y 30% de los pacientes adultos y en el 50% de los pacientes pediátricos infectados con VIH. Se caracteriza por déficits en procesos cognitivos, como memoria, atención, el aprendizaje de nueva información y el procesamiento de la misma, así como déficits en el control motor. Estudios post mortem de pacientes con DAV revelaron un daño celular en estructuras cerebrales como ganglios basales, tálamo y puente; así como la presencia del virus en macrófagos y microglia en el cerebro (revisado en Galicia, Sánchez-Alavéz, Méndez-Díaz, Navarro, & Próspero-García, 2002).

La VIHgp120 es una glicoproteína de la superficie viral del VIH, con un peso molecular de 120kD, que se ha involucrado con el deterioro funcional que se observa en la DAV. Brenneman y cols (1988) muestran que la VIHgp120 es capaz de inducir muerte celular en cultivos de neuronas hipocámpales, a concentraciones muy bajas. Ratones transgénicos que expresan la VIHgp120 muestran cambios neuronales y gliales similares a los presentados por los pacientes con DAV (en Galicia *et al.*, 2002).

Los estudios conductuales muestran que la administración de VIHgp120 o VIFgp120⁷ en el ventrículo cerebral de ratas deteriora la ejecución de éstas en una tarea espacial. Además de alterar la actividad espontánea y el equilibrio en tareas motoras. La VIHgp120 disminuye la producción de AMP cíclico en el hipocampo de rata y deteriora la instalación de la Potenciación a Largo Plazo en el hipocampo (Sánchez Alavéz *et al.*, (2000).

⁷ glicoproteína 120 derivada del Virus de Inmunodeficiencia Felina.

La VIHgp120 es capaz de suprimir la señal P300 en ratas, esta señal es un potencial provocado que resulta ante un estímulo novedoso (en este caso auditivo) en presencia de uno constante; por lo que se ha asociado a procesos de atención. Es decir, la VIHgp120 es capaz de suprimir casi totalmente una respuesta atenta (Galicia, O. *et al.*, 2000).

En relación con el sueño, la VIHgp120 es capaz de reducir la cantidad de sueño MOR en gatos, aumentar la latencia para entrar en esta fase de sueño e incrementar la vigilia (Próspero-García *et al.*, 1994 en Galicia *et al.*, 2002).

4.3 Apoptosis y sueño

El primer trabajo que investiga sistemáticamente si la PS induce muerte o degeneración neuronal en el cerebro de la rata es realizado por Cirelli en 1999. Ella priva de sueño por un período de 8 horas y por un período de 14 días. Cirelli evalúa la muerte celular con el método de TUNEL y la degeneración celular con la tinción Fluoro-Jade. No observa diferencias significativas en muerte o degeneración celular, entre las ratas PS y sus controles. Además determina la expresión de mRNA de genes relacionados con apoptosis y con estrés. Igualmente, Cirelli no observa diferencias significativas entre los grupos con PS y sus controles (Cirelli, Shaw, Rechtschaffen & Tononi; 1999).

El estrés oxidativo es un proceso celular relacionado con la apoptosis. D'Almeida *et al.* (1997), determinan en ratas con PS por 96 horas y sus controles los cambios en moléculas involucradas en el estrés oxidativo, tales como, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. D'Almeida *et al.* no observaron

diferencias significativas en la cantidad de estrés oxidativo entre el grupo privado de sueño por 6 horas y el grupo que durmió libremente..

Hipólite *et al.* (2002) tampoco observan muerte necrótica o apoptótica en el cerebro de ratas privadas de sueño por 96 horas. Adicionalmente evalúan la expresión de mRNA de bcl-2 y bax, genes antiapoptóticos y proapoptóticos, en diferentes regiones cerebrales y no encuentran diferencias significativas. En hipotálamo, amígdala y corteza cerebral miden apoptosis por TUNEL y tampoco observa diferencias entre los grupos.

4.3 Resumen del capítulo

De este capítulo podemos concluir:

1. La PS aguda no produce muerte neuronal o degeneración neuronal, tampoco activa vías relacionadas con esta.
2. La PS crónica (hasta por 14 días) tampoco produce muerte o degeneración neuronal.

CAPÍTULO 5. PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DEL PROBLEMA

El ciclo sueño-vigilia es un proceso fisiológico regulado por diversas moléculas, entre ellas, algunos factores de crecimiento como: hormona de crecimiento, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). El NGF y el BDNF pertenecen a la familia de las neurotrofinas o factores neurotróficos (FNT's), los cuales promueven la *sobrevivencia neuronal* (Zigmond, *et al.*, 1999).

Se ha observado que la administración i.c.v. de NGF o BDNF a conejos incrementa la cantidad de sueño, mientras en ratas el BDNF sólo aumenta la cantidad de sueño sin movimientos oculares rápidos o no MOR (Takahashi & Krueger, 1999; Kushikata, Fang, & Krueger, 1999). Esto sugiere una relación entre los FNT's y el sueño, los FNT's actuarían como moduladores del ciclo sueño-vigilia. Adicionalmente, la privación de sueño total (PST) por 8 horas aumenta los niveles de BDNF, su receptor y su RNA mensajero, en la corteza cerebral e hipocampo de ratas (Cirelli & Tononi, 2000). Asimismo la PST por 6 horas aumenta la expresión de NGF en neuronas corticales (Brand *et al.*, 2001).

El objetivo de este trabajo es mostrar si el sistema de restauración cerebral, dependiente de los FNT's puede modificarse con la manipulación del sueño en un organismo vivo. Esto es, si los FNT's acumulados por la PST ejercen su acción de la restauración neuronal ante un estímulo que induce apoptosis. Esto demostraría una relación funcional entre el ciclo vigilia-sueño y la restauración neuronal, mediada por los factores tróficos.

5.1 Hipótesis y objetivos

5.1.1 Hipótesis

La vigilia prolongada (VP) protege de la apoptosis inducida por $\text{TNF-}\alpha$ y VIHgp120.

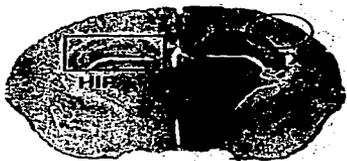
5.1.2 Objetivo general

Observar si la vigilia prolongada o privación de sueño total por 24 horas es capaz de reducir la apoptosis inducida por la administración ventricular de $\text{TNF-}\alpha$ y VIHgp120, en ratas.

5.1.3 Objetivos particulares

1. Caracterizar la Curva Dosis Respuesta de $\text{TNF-}\alpha$ para obtener la dosis efectiva capaz de inducir apoptosis. En tres regiones: Corteza cerebral (CTX), CA3 (cuerno de Ammon 3) y giro dentado (GD)⁸. Ver fig. 5.1.
2. Cuantificar la apoptosis inducida por $\text{TNF-}\alpha$ y VIHgp120 en el cerebro de rata, en tres estructuras: CTX, CA3 y GD. Bajo dos condiciones: vigilia prolongada o PST por 24 h como condición experimental y ciclo sueño-vigilia espontáneo por 24 h como condición control.

⁸ Por ser las estructuras donde es más expresado BDNF y su receptor, así como por estar involucrados en procesos de plasticidad cerebral (Zigmond *et al*, 1999).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.1 Localización de las regiones en el cerebro de rata donde se realizó el conteo de células apoptóticas, así como el análisis morfológico grueso de las neuronas. En la figura izquierda se muestra un corte coronal del cerebro de rata, se indica con un círculo el área de la Corteza Cerebral que fue cuantificada y con un cuadro se enmarca el hipocampo. A la izquierda una ampliación del hipocampo, GD-indica la unión de Giro Dentado, CA3-el área denominada Cuernos de Ammon 3.

5.2 MÉTODO

Sujetos

Cuarenta y seis ratas macho de la cepa Wistar entre 250-350 g de peso. Bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 (con la luz prendiéndose a las 8:00am y apagándose a las 8:00pm), con agua y alimento *ad libitum*.

Materiales

Fármacos

TNF- α en diferentes dosis (20ng/ μ l, 40ng/ μ l, 80ng/ μ l y 160ng/ μ l); VIHgp120, a una dosis de 140ng/5 μ l y solución salina como vehiculo.

Procedimiento

Se dividió en 2 etapas experimentales: la caracterización de la curva dosis-respuesta de TNF- α y los estudios con vigilia prolongada o privación de sueño total.

Curva dosis-respuesta de TNF- α .

Para determinar la dosis efectiva para inducir muerte neuronal de TNF- α se realizó una curva dosis-respuesta farmacológica para este péptido. Se hicieron 5 grupos con las siguientes concentraciones de TNF- α : 20ng/ μ l (n=4), 40ng/ μ l (n=4), 80ng/ μ l (n=4), 160ng/ μ l (n=5) y solución salina (n=6) como control. Para la administración de los fármacos se realizó una cirugía estereotáxica y se colocó una cánula de acero inoxidable, dirigida al ventrículo lateral derecho.

Cirugía

- I. Se anestesió a las ratas con una mezcla de: carbalem 1ml, rompum 1ml, ketamina 5ml y salina 12ml; se administró 0.8 ml intraperitoneal (i.p.), por cada rata con un rango de peso entre 250-350 grs.
- II. Se colocó a la rata en un aparato estereotáxico, se localizó sobre el cráneo la posición del ventrículo lateral (L:1.5mm, AP:0.8mm, P:3.6mm, referente a bregma). Se introdujo la cánula.
- III. Finalmente la cánula fue fijada con acrílico dental y un par de tornillos de sostén. Se dio un período de recuperación de 10 días.

Administración de los fármacos

- I. Se corroboró el libre paso de 5 μ l de solución salina a través de la cánula, solo se utilizaron las ratas con la cánula permeable para asegurar que estuviera en el ventrículo⁹
- II. El día 11 se administró a las ratas el fármaco correspondiente, todos los fármacos fueron diluidos en 5 μ l de salina como vehículo y la administración

⁹ Se administró en un ventrículo cerebral para asegurar que el fármaco llegaría a todo el tejido cerebral.

duró 5 min (5µl/5min). Se utilizó una jeringa Hamilton y una bomba de infusión.

Veinticuatro horas después de la administración del fármaco se sacrificó a todos los sujetos, se extrajo el cerebro y se realizó el proceso histológico. Para corroborar que la cánula estuviera en el ventrículo de la rata y para un análisis grueso de la morfología celular se realizó la tinción de violeta de cresilo; para un análisis fino de la apoptosis observada se utilizó la técnica de Hoechst.

Proceso histológico

- I. Se realizó una perfusión transcardíaca en ratas anestesiadas con 0.3 ml de pentobarbital, 24 horas después de la administración del fármaco. Posteriormente, se administró 150ml de PBS 0.01 M, seguido de 150ml de paraformaldehído al 4% en PBS 0.2 M. Se extrajo el cerebro de las ratas.
- II. Los cerebros pasaron por un proceso de fijación. Este proceso consiste en incubar cada cerebro durante una noche, en una de las siguientes soluciones: 1ª noche, paraformaldehído al 4%; 2ª noche, sacarosa al 18% y 3ª noche, sacarosa al 30%.
- III. Los cerebros se congelaron a -20°C, se hicieron cortes coronales y sagitales a 30 micras; se colocaron en portaobjetos y se realizó la tinción correspondiente.

Técnica de Violeta de Cresilo

Consiste en teñir los cuerpos neuronales. Para esto, se somete a un proceso de deshidratación por alcoholes a diferentes porcentajes. Posteriormente se

deja reposar en el colorante violeta de cresilo, se lava el exceso del colorante y se cubren los portaobjetos en un medio resinoso.

Técnica de Hoechst

Se basa en la captación del colorante bis-benzimidazole (Hoechst 33342), el cual marca la cromatina del núcleo de la célula. Consiste en colocar Hoechst 33342 al 0.1% en PBS en tejidos previamente montados en los portaobjetos, se cubre con un parafilm y se incuba durante 40 min en la oscuridad. Posteriormente se lavan los portaobjetos con PBS, se cubre con una solución de montaje (70% glicerol y 30% PBS) y se sella con barniz (ver Monti, 2000). Esta tinción fue estandarizada en ratas de 250-350 g de peso, el indicador de apoptosis son los núcleos condensados (fig. 5.2).



TEJIDOS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.2 Tinción de Hoechst en la Corteza Cerebral de rata. Los círculos indican ejemplos de núcleos que fueron tomados como apoptóticos; obsérvese que están condensados, son más pequeños, más redondos y más luminosos que los núcleos de las otras neuronas. Imagen aumentada 200veces.

Posteriormente se tomaron fotos en un microscopio de fluorescencia y se contaron las células con núcleo condensado (tomando esto como un indicador de apoptosis), en tres estructuras cerebrales: corteza cerebral, unión de giro dentado y CA3 (fig. 5.1).

Se realizó la prueba estadística ANOVA (análisis de varianza) de un factor, comparando la cantidad de núcleos condensados bajo las diferentes concentraciones de TNF- α . Se determinó así que la dosis efectiva capaz de inducir mayor condensación en los núcleos fue 160ng/ μ l, ésta fue utilizada en los siguientes experimentos.

Vigilia prolongada o Privación de Sueño Total.

Se formaron 3 grupos de ratas, por tratamiento farmacológico. Estos grupos fueron: salina, TNF- α (160 ng/ μ l) y VIHgp120 (140ng/5 μ l)¹⁰. Cada grupo se dividió en dos condiciones experimentales: sueño espontáneo (SE) y privación de sueño total (PST) por 24 horas o vigilia prolongada (VP). (ver tabla 5.1). La PST fue realizada por el método de *manipulación gentil*, la cual consiste en mover al animal cada que presenten signos de somnolencia. Se realizó por 24 horas para observar la inducción de apoptosis por TNF- α y VIHgp120 (Charriaut-Marlangue et al., 1996).

El procedimiento para colocar la cánula y administrar los fármacos fue el descrito para la curva dosis-respuesta de TNF- α . Después de la administración de los

¹⁰ La curva dosis respuesta para VIHgp120 fue reportada por Sánchez-Alavez et al., 2000.

fármacos se inició la manipulación del ciclo sueño-vigilia (a un grupo de ratas no se le permitió dormir por 24 horas y al otro grupo si).

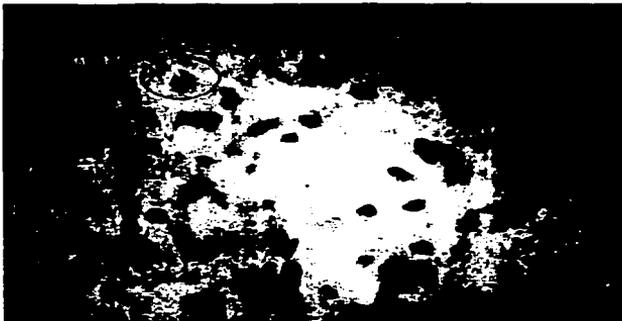
PRIVACION	Control	Experimental 1	Experimental 2
SE	Salina (6)	TNF- α (5)	HIVgp120 (5)
PST o VP	Salina (7)	TNF- α (5)	HIVgp120 (6)

Tabla 5.1. Condiciones por grupo. SE- sueño espontáneo, indica que los sujetos durmieron libremente; PST- privación de sueño total o VP- vigilia prolongada, indica que no se permitió dormir a los sujetos por 24 horas. El número encerrado en el paréntesis indica el número de sujetos por grupo (n).

24 horas después de la administración de los fármacos se sacrificó a los sujetos, se extrajo el cerebro, se realizó el proceso histológico arriba descrito y se utilizó para cuantificar apoptosis la tinción de Hoechst (descrita en la sección anterior) y el método de TUNEL.

Técnica de TUNEL

Es una prueba utilizada para marcar la fragmentación del DNA que se genera en el proceso de apoptosis (fig. 5.3). Este marcaje ocurre al agregar nucleótidos dUTP marcados con fluoresceína y una enzima (DNA polimerasa terminal), que pegará al nucleótido marcado con los fragmentos de DNA del tejido producidos por la apoptosis. El procedimiento consiste en: lavar los tejidos con Triton X-100, enjuagar con PBS. Agregar la mezcla de nucleótidos y enzima a los tejidos e incubar en una cámara húmeda en la oscuridad a 37°C por una hora. Finalmente se enjuaga con PBS y se monta con una solución de PBS-glicerol (Monti, 2000; Cirelli, 1999).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.3 Tinción de TUNEL, los núcleos neuronales son las manchas negras, aquellos que emiten fluorescencia indican núcleos con el DNA fragmentado (círculos rojos). Fotografía de la Corteza Cerebral de la rata, imagen aumentada 400 veces.

Se determinó el número de núcleos condensados (expresado en porcentaje por mm²) y el número de núcleos fragmentados (expresado como células positivas a TUNEL por campo) para evaluar la apoptosis presentada ante las diferentes condiciones experimentales (ver. tabla 5.1).

El conteo celular se realizó en corteza e hipocampo, en este último en dos regiones específicas, CA3 y Giro Dentado (fig. 5.1).

Los resultados fueron analizados con la prueba estadística ANOVA de dos factores, los datos a comparar fueron: el número de células muertas (apoptosis) entre los 3 grupos farmacológicos, bajo dos condiciones: ratas con privación de sueño y ratas que durmieron libremente.

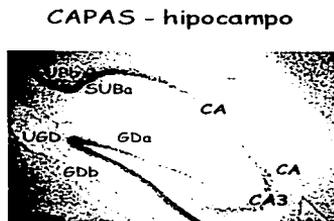
CAPÍTULO 6. RESULTADOS

Los resultados los dividiré en dos secciones: la primera referente a la caracterización de la curva dosis-respuesta de TNF- α y en la segunda parte mostraré los resultados de la privación de sueño con la administración de TNF- α y VIHgp120. Todo esto acorde con los objetivos particulares.

6.1 Curva dosis respuesta de TNF- α

6.1.1 Análisis grueso de la morfología celular:

1. El grosor de las capas celulares del hipocampo en rata (fig 6.1), fue cuantificado 24 horas después de la administración i.c.v. de diferentes dosis de TNF- α (Tabla 6.1). El grosor disminuido indicaría una muerte masiva de neuronas por acción del TNF- α . No hubo diferencias significativas entre el grosor de las capas (tinción Violeta de Cresilo).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

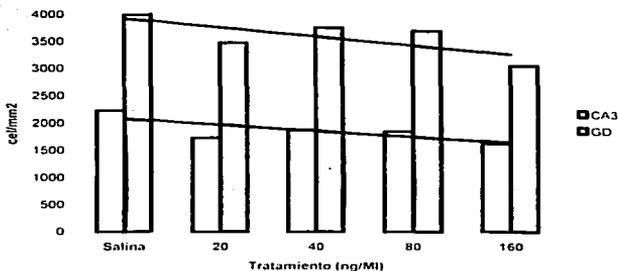
Fig. 6.1 Capas celulares del hipocampo en el cerebro de rata. La tinción utilizada es violeta de Cresilo, se marcan los núcleos de las neuronas, observándose las capas de neuronas granulares del Giro Dentado (GD) y piramidales de Cornu Ammonis (CA). Las abreviaciones indican: subículo (SUB), y unión del giro dentado (UGD).

	GDa	GDb	UGD	CA	SUBa	SUBb
Salina	65.3	66.6	153.3	80.0	66.6	153.3
20 ng/μl	62.0	86.6	146.6	95.3	66.6	126.6
40 ng/μl	60.0	71.0	146.6	67.5	56.6	136.5
80 ng/μl	66.3	58.3	153.3	75.0	55.0	201.6
160 ng/μl	68.7	64.5	160.0	67.5	50.7	162.5

Tabla 6.1 Grosor de la capa de células Piramidales y granulares del hipocampo de rata bajo la administración i.c.v. de TNF- α a cuatro dosis, evaluación 24 horas posterior a la administración (unidades en micrómetros) (n = 2, por tratamiento).

2. Número de células por mm² en el hipocampo de rata. La reducción del número neuronal indica mayor apoptosis, la fig. 6.2 muestra que se observaron menos neuronas conforme se incrementó la dosis de TNF- α .

La dosis elegida fue 160 ng/μl, (tinción violeta de cresilo).



TESIS CON
 FOLLA DE ORIGEN

Fig. 6.2 Densidad Neuronal ante cuatro dosis de TNF α (20, 40, 80 y 160 ng/μl) comparadas con solución salina como el grupo control y su efecto sobre el número de células/mm² presentes en CA3 y GD. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración i.c.v. de TNF α .

3. La dosis de 160 ng/ μ l de TNF- α induce una gran desorganización celular en un lapso de 24 horas en el cerebro de la rata. La figura 6.3 muestran dos regiones del hipocampo con una morfología celular afectada y una evidente disminución de neuronas en una rata tratada con TNF- α , comparada con el control (salina).



Fig. 6.3 Efecto de la administración i.c.v. de TNF- α sobre la morfología celular de CA3 (panel izquierdo) y Giro Dentado (panel derecho) en el hipocampo de rata (tinción violeta de cresilo).

6.1.2 Análisis con la tinción de Hoechst

Se observó un efecto diferencial de TNF- α sobre la cantidad de muerte neuronal en el cerebro de rata: en la corteza cerebral 160 ng/ μ l fue la mejor dosis para inducir muerte neuronal (fig. 6.4). En CA3 no hay diferencias significativas por la variabilidad individual, siendo 40 ng/ μ l la dosis que induce mayor muerte neuronal (fig. 6.5). Contrario a los resultados esperados, en Giro Dentado el TNF- α inhibe la apoptosis natural, suprimiéndola totalmente con la dosis de 40 y 80 ng/ μ l (fig. 6.6).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

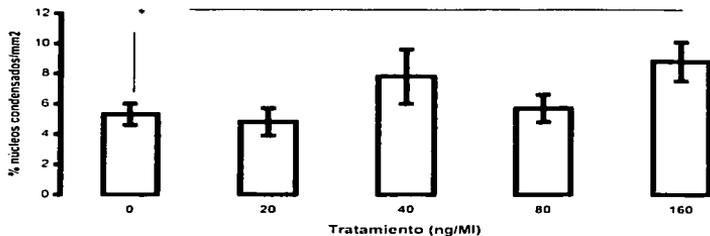


Fig. 6.4 Efecto de la administración i.e.v. de diferentes dosis de TNF- α sobre la apoptosis observada en la Corteza Cerebral de rata. El porcentaje de núcleos condensados es el indicador de apoptosis, el mayor porcentaje de muerte observado fue con la dosis más alta de TNF- α . La línea indica la diferencia entre tratamiento. Tinción Hoechst. * $p \leq 0.05$, (\pm ES).

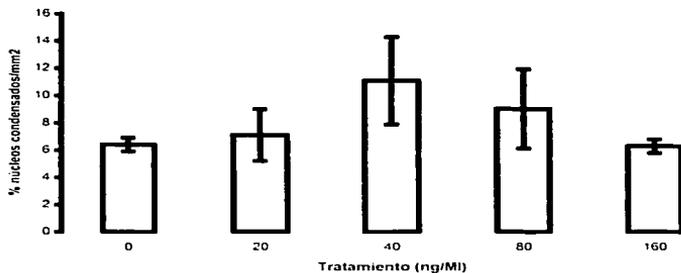


Fig. 6.5 Efecto de la administración i.e.v. de diferentes dosis de TNF- α sobre la apoptosis observada en la región de CA3, en el hipocampo de rata. El porcentaje de núcleos condensados es el indicador de apoptosis. Tinción Hoechst.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

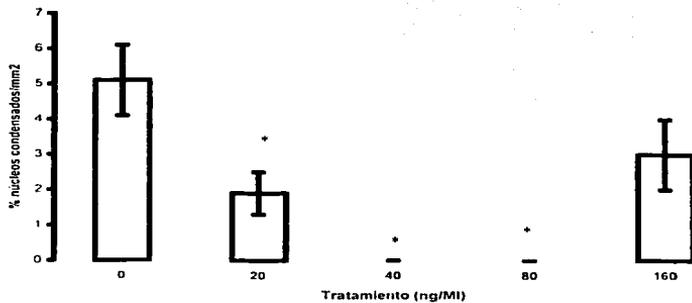
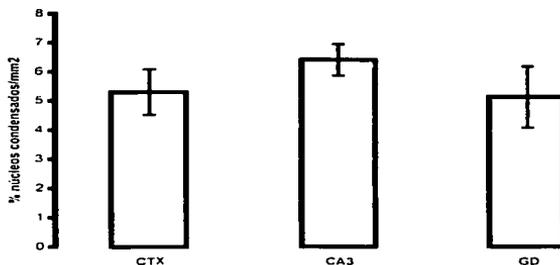


Fig. 6.6 Efecto de la administración i.v. de diferentes dosis de TNF- α sobre la apoptosis observada en el Giro Dentado de rata. El porcentaje de núcleos condensados es el indicador de apoptosis. Obsérvese la supresión de apoptosis a las dosis de 40 y 80 ng/ μ l. Tinción Hoechst. * $p < 0.05$, comparada con el control (\pm ES).

6.2 Privación de sueño

6.2.1 Apoptosis espontánea en el cerebro de la rata

El porcentaje promedio de núcleos condensados cuantificados con la tinción de Hoechst, como indicador de apoptosis espontánea en el cerebro de la rata fue: 5.3 ± 0.71 para CTX, 6.4 ± 0.54 para CA3 y 5.1 ± 1.05 para GD (fig. 6.7). Estos datos son similares a los obtenidos con la tinción de TUNEL, la cantidad de núcleos con la cromatina fragmentada como indicador de apoptosis fue: 4 ± 1.1 para CTX, 6.33 ± 2.3 para CA3 y 1.33 ± 0.3 para GD (6.8).¹¹



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6.7 Apoptosis espontánea en la corteza cerebral (CTX) y el hipocampo (Cuernos de Ammon 3-CA3 y Giro Dentado-GD) del cerebro de rata. Tinción de Hoechst.

¹¹ Para localizar las estructuras cuantificadas ver la figura 5.1.

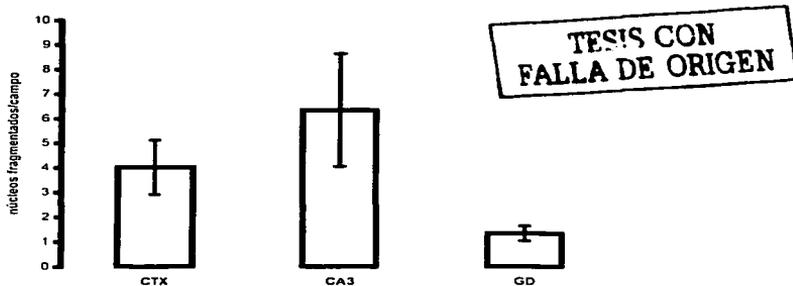


Fig. 6.8 Apoptosis espontánea en la corteza cerebral (CTX) y el hipocampo (Cuernos de Ammon 3-CA3 y Giro Dentado-GD) del cerebro de rata. La tinción utilizada fue TUNEL.

6.2.2 Privación de sueño y apoptosis inducida por $TNF-\alpha$ y VIHgp120

Los resultados con la tinción de Hoechst muestran que en CTX la muerte neuronal inducida por $TNF-\alpha$ (8.85 ± 1.3 % cel/mm²) es mayor que el grupo de salina sin privación de sueño (5.3 ± 0.7 % cel/mm²). La privación de sueño (PS) es capaz de reducir esta muerte neuronal (54.5 ± 0.9 % cel/mm²). La muerte neuronal inducida por VIHgp120 (7.24 ± 0.8 % cel/mm²) es reducida por la PS (3.6 ± 0.6 % cel/mm²), (fig. 6.9).

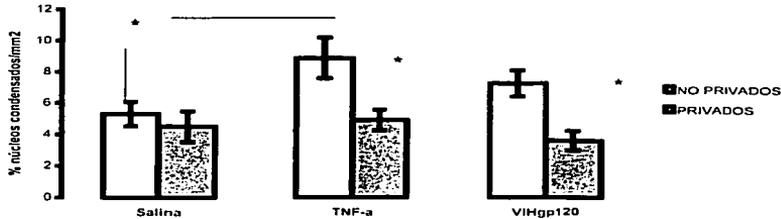


Fig. 6.9 Corteza Cerebral, porcentaje de núcleos condensados como indicador de apoptosis para los grupos que fueron administrados i.e.v. con Salina, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) o la glucoproteína 120 derivada del VIH (VIHgp120); bajo dos condiciones, privados de sueño total por 24 horas (PST) o no privados. Tinción de Hoechst. * $p \leq 0.05$, (\pm ES) - diferencias estadísticamente significativas. La línea indica diferencias entre grupos.

En CA3 la PS aumenta la muerte neuronal en el grupo de TNF- α (10.18 ± 1.2 %cel/mm²) con respecto a su control (6.3 ± 0.5 %cel/mm²). En el grupo con VIHgp120 se observa una tendencia a incrementar la muerte neuronal por la PS (4.7 ± 0.7 %cel/mm²) con respecto a su control (2.8 ± 1.3 %cel/mm²), (fig. 6.10). En GD no se observan diferencias estadísticamente significativas por la enorme variabilidad individual, sin embargo las tendencias observadas son: aumento en la muerte neuronal en el grupo de TNF- α (5.53 ± 0.5 %cel/mm²) por efecto de la PST, con respecto a su control (3.06 ± 1.06 %cel/mm²). La sola administración de TNF- α inhibe la muerte (3.06 ± 1.13 %cel/mm²) comparado con el grupo salina (5.12 ± 1.05 %cel/mm²), (fig. 6.11).

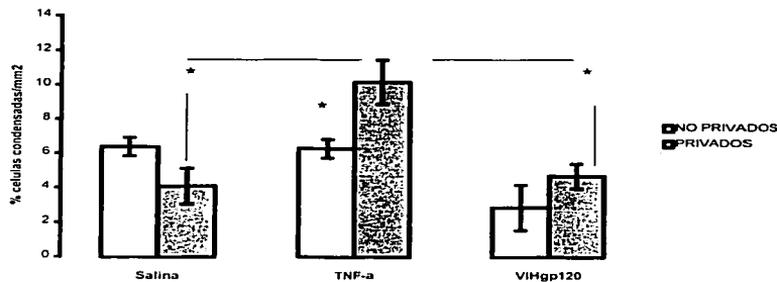


Fig. 6.10 Hipocampo-CA3, porcentaje de núcleos condensados como indicador de apoptosis. Los grupos fueron administrados i.c.v. con Salina, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) o la glucoproteína 120 derivada del VIH (VIHgp120); bajo dos condiciones, privados de sueño total por 24 horas (PST) o no privados. Tinción de Hoechst. * $p \leq 0.05$, (\pm ES) = diferencias estadísticamente significativas. La línea indica diferencias entre grupos.

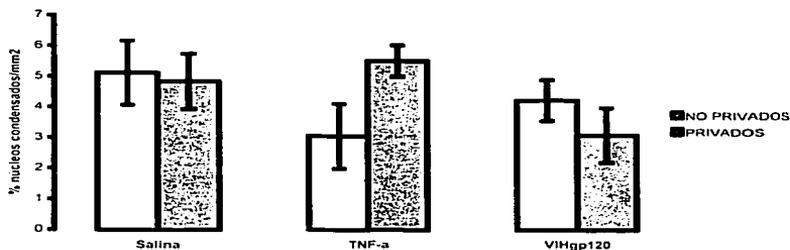


Fig. 6.11 Unión de Giro Dentado, porcentaje de núcleos condensados como indicador de apoptosis para los grupos que fueron administrados i.c.v. con Salina, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) o la glucoproteína 120 derivada del VIH (VIHgp120); bajo dos condiciones, privados de sueño total por 24 horas o no privados. Tinción de Hoechst.

La tinción de TUNEL corrobora para CTX los resultados obtenidos con Hoechst, se observa una reducción de la muerte celular inducida por TNF- α (8.33 \pm 2 cel+TUNEL) y VIHgp120 (9 \pm 1 cel+TUNEL) por efecto de la privación de sueño. Esto es, 2.66 \pm 2 cel+TUNEL para TNF- α y 3.5 \pm 1 cel+TUNEL para VIHgp120 al (fig. 6.12).

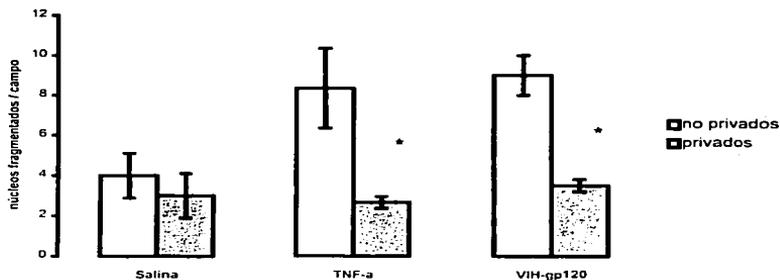


Fig. 6.12 Corteza cerebral de rata, las barras ilustran el número de células positivas a TUNEL indicando fragmentación nuclear, parte del proceso apoptótico. Los grupos fueron administrados l.c.v. con Salina, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) o glucoproteína 120 derivada del VIH (VIHgp120): bajo dos condiciones, privados de sueño total por 24 horas (PST) o no privados. * $p \leq 0.05$, (\pm ES) - diferencias estadísticamente significativas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En CA3 y GD no se observan diferencias estadísticamente significativas por la variabilidad individual, pero los datos no son contradictorios a la tinción de Hoechst (fig. 6.13 y 6.14).

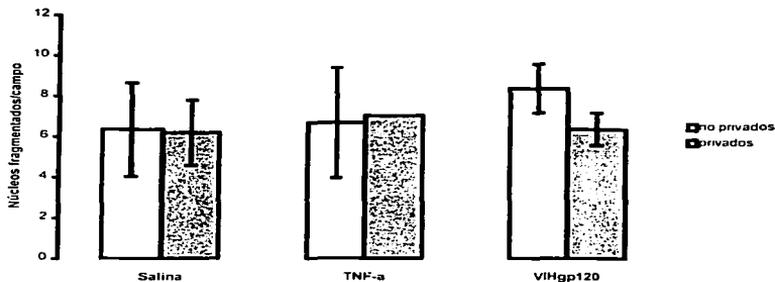


Fig. 6.13 CA3 en el hipocampo de rata, las barras ilustran el número de células positivas a TUNEL, indicando fragmentación nuclear, parte del proceso apoptótico. Los grupos fueron administrados i.c.v. con Salina, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) o glucoproteína 120 derivada del VIII (VIHgp120); bajo dos condiciones, privados de sueño total por 24 horas (PST) o no privados. No hubo diferencias estadísticas significativas.

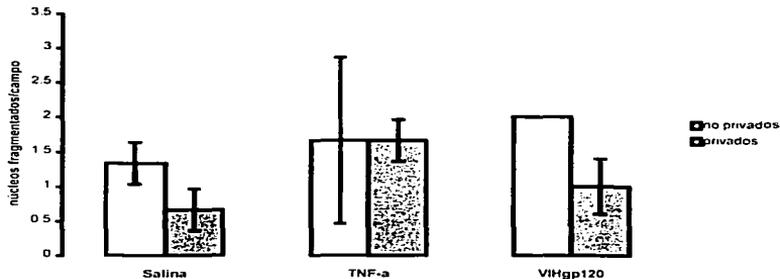


Fig. 6.14 Unión de Giro Dentado en la rata, las barras ilustran el número de células positivas a TUNEL, indicando fragmentación nuclear, parte del proceso apoptótico. Los grupos fueron administrados i.c.v. con Salina, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) o glucoproteína 120 derivada del VIII (VIHgp120); bajo dos condiciones, privados de sueño total por 24 horas (PST) o no privados. No hubo diferencias estadísticas significativas.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

7.1 Curva Dosis-Respuesta de TNF- α

Referente a la curva dosis respuesta de TNF- α , la dosis efectiva para inducir apoptosis en la Ctx fue de 160ng/ μ l. En CA3 la cantidad de núcleos condensados por efecto de la administración de TNF- α tuvo una distribución estadística de U invertida o campana. En el Giro Dentado la apoptosis basal es inhibida por la administración de TNF- α . Su efecto tiene una distribución estadística en forma de U, siendo 40 ng/ μ l y 80 ng/ μ l las dosis efectivas para suprimir totalmente la apoptosis.

Estos resultados evidencian la acción de TNF- α en el cerebro de la rata a través de sus dos receptores: el p75 asociado a la sobrevivencia celular y el p55 involucrado en cascadas de muerte celular. Posiblemente en la Ctx esta actuando a través del p55 y en el GD a través del p75, mostrando que TNF- α tiene una acción diferencial para estas 2 estructuras cerebrales. Esto nos sugiere la especificidad que tiene el cerebro para regular la población de neuronas que lo integran.

7.2 Apoptosis espontánea en el cerebro de la rata

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que ocurre una muerte neuronal basal en el cerebro de la rata adulta, al menos en las 3 estructuras estudiadas: CTX, GD y CA3, lo cual sugiere que diariamente el cerebro necesita prescindir de

neuronas que ya cumplieron su función o que simplemente no necesita. Esto, indicaría la existencia de un sistema cerebral dinámico que es capaz de seleccionar su materia prima para su óptimo funcionamiento: las células.

Existen datos contradictorios sobre este tema. Weaver, I. C. G., Grant, R. J. & Meaney J. M. (2002) reportan una muerte neuronal menor a una célula en CA3. Sin embargo el experimento es realizado en otra cepa de ratas (Long-Evans) y la técnica para marcar las células muertas varía con respecto a la utilizada en este trabajo. Chen J, Chen X, Yang K, Xia T & Xie H. (2002) reportan una muerte de 5.35 ± 0.79 neuronas en el hipocampo; Cirelli (1999) reporta una muerte neuronal de 1 para el hipocampo y de 3 para la corteza. A pesar de haberse realizado el conteo de muerte neuronal con la tinción de TUNEL las diferencias observadas pueden deberse a variaciones en la técnica; por ejemplo, dobles marcajes, si la tinción es fluorescente o de luz y por ende el microscopio en que se observó la muestra. Además, hay diferencias en la forma de cuantificar las células muertas, la cepa y el peso del animal. Este trabajo amplía la información sobre la muerte celular basal que puede ocurrir en el cerebro adulto, el marcaje es más sensible con respecto a otros métodos, ya que cuantificamos solo aquellos núcleos con DNA fragmentado.

7.3 Privación de Sueño y Apoptosis inducida por TNF- α y VIHgp120.

La privación de sueño total por 24 horas (PST) redujo la apoptosis inducida por TNF- α y VIHgp120 en la Corteza Cerebral de rata, esto sugiere:

- La protección celular en la Ctx de ratas, es dependiente del ciclo sueño-vigilia, ya que si alteramos tal ciclo se observa un decremento en la cantidad de apoptosis inducida por acción de TNF- α y VIHgp120.
- Los Factores Neurotróficos (FNT's) como BDNF y NGF, con receptores ampliamente distribuidos en Ctx serían las moléculas candidatas para involucrarlas en el efecto protector observado, ya que los niveles de estas moléculas estarían mas elevados en los grupos con PS que en los que durmieron libremente.¹²
- Los resultados de este trabajo sugieren que la acumulación de estos FNT's por efecto de la PST cumple con su función restaurativa *in vivo*; reduciendo la muerte neuronal inducida por la administración de TNF- α y VIHgp120, en el cerebro de la rata.

Sin embargo, se deben realizar investigaciones que prueben que tal protección celular es efectivamente mediante los FNT's. Una propuesta de investigación que se desprende de este trabajo es: inhibir la acción de los Trk's durante la administración de TNF- α o VIHgp120 y privar de sueño por 24 horas, esperando abolir el efecto protector de la PST, observado en este trabajo.

¹² Esta conclusión se apoya en los trabajos realizados por Krueger y Cirelli, donde muestran una acumulación de FNT's (NGF y BDNF) por efecto de la PST.

7.4 Acerca de la función del sueño.....

Es imposible con las investigaciones actuales saber cual es "la función del sueño". Este trabajo no pretende decir cual o cuales son las funciones del sueño, sin embargo, con los resultados obtenidos podemos sugerir una relación funcional entre el ciclo sueño-vigilia y el sistema de restauración neuronal (FNT's). Haré una propuesta teórica retomando los elementos de la introducción para abordar este tema.

Primeramente, tenemos que definir el término *función*. Nos referimos a función, como el resultado de la actividad celular, en este caso neuronal, que agrupa en un trabajo conjunto, la excitación y la inhibición del sistema nervioso ante las señales que llegan al organismo; elaborando así un sistema de conexiones neuronales temporales; y asegurando con ello, el equilibrio del organismo con el medio. La función debe cumplir una tarea biológica determinada; mediante una actividad neuronal dinámica de eslabones, situados en diferentes niveles del Sistema Nervioso (SN). Al requerir eslabones y acciones celulares interrelacionadas, estaríamos hablando de un sistema: *un sistema funcional*. Estos eslabones pueden cambiar aunque la propia tarea no se inmute, asegurando un complejo de acciones celulares inter-vinculadas que, al final, conducen al logro del efecto biológico correspondiente (función).

Podemos hablar de un Sistema Funcional del sueño, ya que, el estado de sueño es producto de cambios neuronales, temporales y específicos en un organismo. Para esto, se necesitan diferentes niveles y estructuras del SN (ver capítulo 1).

¿Qué estructuras estarían formando el sistema funcional del sueño? parafraseando a Jouvet en su libro "el sueño y los sueños" *no hay relación lineal entre la estructura y la función*, por lo que no debemos buscar la función del sueño en las estructuras que lo ejecutan, o peor aún, no podemos pensar que existe una estructura que delimita la función del sueño. Retomando a Claude Bernard: "*una función integra el funcionamiento de numerosas estructuras*". El sistema funcional del sueño debería estar formado por sistemas neuroquímicos que engloban varias estructuras.

Este trabajo plantea abordar el estudio del sueño con una aproximación teórica diferente, proponiendo un *sistema funcional del sueño*, el cual enmarca su función o funciones como producto de la interacción entre dos sistemas neuroquímicos, *el ejecutor del proceso y el promotor o modulador del proceso*. Me referiré específicamente al sistema promotor relacionado con el sistema de restauración neuronal.

El **sistema ejecutor**, involucraría a aquellos sistemas neuroquímicos que producen el sueño o la vigilia, por ejemplo: adenosina instala el sueño NMOR, mientras, acetilcolina instala el sueño MOR; serotonina y noradrenalina, instalan la vigilia. Si estos sistemas no están el sueño se suprime, por eso son parte del sistema ejecutor, el cual, es imprescindible para que se presente el estado de sueño o vigilia; podemos decir que este sistema es como la maquinaria de una fabrica.

El sistema promotor, pueden ser todas las Sustancias Promotoras del Sueño (SPS), su función en el sueño es facilitar, la Hormona Liberadora de la Hormona de Crecimiento (HLHC) es un ejemplo de estas SPS. Este sistema serían los obreros de la fábrica, estos modulan el funcionamiento de la maquinaria.

Siguiendo con el ejemplo, si la HLHC no está presente en el organismo el sueño de todas formas se presentará, por lo que decimos que la HLHC no es indispensable para que el sueño se presente. Sin embargo, la HLHC es capaz de incrementar la cantidad de sueño no MOR, lo que indica que facilita o mantiene el sueño. Pero, si el sueño no se instala, la acción de la HLHC en el SN se ve afectada, es ahí donde se interrelaciona este sistema promotor con el ejecutor.

Adicionalmente, algunas SPS presentan variaciones en la cantidad de proteína o en la expresión de su receptor a lo largo del ciclo sueño-vigilia, es decir su acción sobre el SN es dependiente de este ciclo.

El sistema funcional del sueño es solo un concepto que este trabajo propone para fusionar estos dos sistemas. Los cambios neuronales temporales necesarios para un sistema funcional estarían dados por la interacción entre las moléculas del sistema ejecutor y las moléculas del sistema promotor. Existen varios promotores del sueño (por ejemplo los FNT's), *la acción de las diversas moléculas del sistema promotor sobre el cerebro determinaría la función biológica del sueño-vigilia.* En el ejemplo de la fábrica, el trabajo realizado sería el sistema funcional, pues se interrelaciona la maquinaria con el obrero.

Este trabajo propone como una función del sueño *la restauración neuronal*, donde los FNT's actúan como un sistema promotor del sueño, ubicándolo como parte del sistema funcional del sueño. Es funcional porque es capaz de ejercer su acción de restauración neuronal ante un estímulo que induce muerte neuronal. La PST protege de la apoptosis, esto parece contradecir que el sueño restaure a las células; sin embargo es importante decir que hipotéticamente lo que hicimos con la manipulación experimental fue incrementar la cantidad de FNT's, los cuales se acumulan al final de la vigilia para promover el sueño. Esta acumulación es necesaria porque el receptor a BDNF (TrkB) en CTX es menor durante el sueño comparado con la vigilia (Bova, R., Micheli, M. R., Qualadrucci, P. & Zucconi, G. G., 1998)), por lo que se necesita más ligando (BDNF) para ejercer su acción en condiciones normales. En este contexto, los FNT's restaurarían el sistema cerebral, no solo protegiendo a las células; su acción biológica implicaría también no estimular a aquellas neuronas que deben morir. Todo esto, con el solo fin de conservar las condiciones fisiológicas necesarias para el exacto funcionamiento cerebral.

Ahora bien, el beneficiario de tal función no solo sería el sistema promotor, o el ejecutor; sería todo el sistema celular. Es decir, la acción de los FNT's sobre la restauración neuronal, no beneficiaría solo a las estructuras ejecutoras del sueño, como el hipotálamo o el puente cerebral; sino a todas las neuronas que necesitan ser estimuladas por los FNT's.

Un buen ejemplo para entender el concepto de función y sus beneficiarios es el de la glucosa y la regulación de la ingesta de alimento. Cuando los niveles de

glucosa están bajos son detectados por el hipotálamo, mandan la señal de hambre y el sujeto come; cuando se reestablecen los niveles de glucosa el hipotálamo ejecuta la señal de saciedad y el sujeto deja de comer. Los mecanismos neuroquímicos del hipotálamo indican las señales de hambre o saciedad del organismo, la glucosa modula la acción del hipotálamo con el cambio de sus niveles, y el beneficio de los niveles adecuados de glucosa no sería únicamente para el hipotálamo, sino para todo el organismo, ya que es la fuente energética para muchas funciones fisiológicas. La interacción glucosa-hipotálamo sería un sistema funcional.

Así, los beneficios del dormir no se observarán solo en los estructuras cerebrales del sistema ejecutor, sino en todo el cerebro. La acción del $TNF\alpha$ es un buen ejemplo del sistema funcional del sueño y sus beneficiarios. El $TNF\alpha$ es capaz de inducir sueño NMOR, sobrevivencia y muerte neuronal; además, modifica la respuesta inmunológica; estos efectos dependen del ciclo sueño-vigilia (presenta variaciones en la concentración en sangre a lo largo del día, con una máxima expresión durante la fase de sueño en humanos). Al parecer, para que $TNF\alpha$ ejerza su mayor acción, el sujeto debe dormir. Por ejemplo, durante el proceso de enfermedad, se incrementan los niveles de $TNF\alpha$, nos sentimos cansados con ganas de dormir y efectivamente dormimos más. Esto posiblemente ocurre de la siguiente manera: el $TNF\alpha$ promueve el estado de sueño porque el organismo necesita dormir para restaurarse; el $TNF\alpha$ actúa durante el sueño y manda

señales al sistema inmunológico; para que este responda ante la enfermedad. El beneficiario de este mecanismo es todo el organismo.

Esquema de la propuesta teórica:

Las sustancias promotoras de sueño como NGF y BDNF se incrementan al final de la vigilia de un organismo → el Sistema Nervioso detecta esta señal → el sistema ejecutor se activa → se instala el sueño → NGF, BDNF ejercen su acción (restauración neuronal) o se acumulan más para actuar en la vigilia; pueden ocurrir ambos eventos.

La mayor acción de NGF y BDNF se observará en las estructuras cerebrales donde estén sus receptores (Trk's). Esto beneficiaría a todo el cerebro.

CAPITULO 8. CONCLUSIÓN

8.1 Curva Dosis-Respuesta de TNF- α

La dosis efectiva para inducir muerte celular en Ctx fue 160ng/ μ l. Contrariamente, en el Giro Dentado la apoptosis basal es inhibida por la administración de TNF- α . El TNF α parece estar actuando en el SNC *in vivo* en forma diferencial, indicando una acción celular específica dada por la distribución de sus receptores en el cerebro. En este sentido, es posible que en la Ctx esté actuando a través del receptor p55 (muerte neuronal) y en el GD a través del p75 (sobrevivencia neuronal).

8.2 Apoptosis espontánea en el cerebro de la rata

Existe una muerte neuronal basal en el cerebro adulto de rata, con un promedio de 5 células por cada 100 en un mm² en la corteza cerebral y 6 para el hipocampo.

8.3 Privación de Sueño y apoptosis inducida por TNF- α y VIHgp120.

La privación de sueño total por 24 horas (PST) tuvo un efecto protector sobre la apoptosis inducida por TNF- α y VIHgp120 en la Corteza Cerebral de rata.

Dicha protección está dada posiblemente por acción de los factores neurotróficos como BDNF y NGF.

8.4 Propuesta teórica.

Finalmente, se propone que, "la acción de los FNT's es dependiente del ciclo sueño-vigilia", esta relación sugiere a *la restauración neuronal como una posible función del sueño*. Ya que, si modificamos este ciclo, privando de sueño a un animal se incrementan los niveles de BDNF y NFG, y, como se muestra en este trabajo, si administramos un inductor de apoptosis a ratas, el grupo con PST tiene menos muerte neuronal en la Ctx. Adicionalmente, los FNT's son capaces de inducir sueño NMOR; el BDNF y su receptor (TrkB) presentan variaciones diurnas en el cerebro de rata, por lo que su efecto durante el ciclo es diferencial. Indicando pues una relación funcional entre el sueño y la restauración neuronal.

BIBLIOGRAFIA

- Altar, C. A., Cai, N., Bliven, M. J., Conner, J. M., Acheson, A. L., Lindsay, R. M. & Wiegand, S. J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. Nature, **389**, 856-860.
- Baud, V. & Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. TRENDS in Cell Biology, **11(9)**, 372-377.
- Benca, R. M., Kushida, C. A., Everson, C. A., Kalski, R., Bergmann, B. M. & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep Deprivation in the Rat : VII. Immune Function. Sleep, **12 (1)**, 47-52.
- Bova, R., Micheli, M. R., Qualadrucci, P. & Zucconi, G. G. (1998). BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light-dark cycle. Molecular Brain Research, **57**, 321-324.
- Brandt, J., Churchill, L., Guan, Z., Fang, J., Chen, L. & Krueger J. M. (2001) Sleep deprivation but not a whisker trim increase nerve growth factor within barrel cortical neurons. Brain Research **898**, 105-112.
- Braun, A. R., Balkin, T. J., Wesensten, N. J., Carson, M. V., Baldwin, P., Selbie, S., Belenkey, G. & Herscovitch (1997). Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. Brain, **120**, 1173-1197.
- Charriaut-Marlangue, C., Aggoun-Zouaoui, D., Represa, A. & Ben-Ari, Y. (1996) Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp120 toxicity. Trends in Neurosciences, **19(3)**, 109-114.

- Chen, J., Chen, X., Yang, K., Xia, T. & Xie, H. (2002). Studies on DNA damage and apoptosis in rat brain induced by fluoride. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 36(4), 222-224. [Resumen, articulo en Chino].
- Cirelli, C. & Tononi, G. (2000) Differential Expression of Plasticity-Related Genes in Waking and Sleep and Their Regulation by the Noradrenergic System. The Journal of Neuroscience, 20(24), 9187-9194.
- Cirelli, C., Shaw, P. J., Rechtschaffen, A. & Tononi, G. (1999) No evidence of brain cell degeneration after long-term sleep deprivation in rats. Brain Research, 840, 184-193.
- D'Almeida, V., Hipólido, D. C., Azzalis, L. A., Lobo, L. L., Junqueira, V. & Tufik, S. (1997). Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. Neuroscience Letters, 235, 25-28.
- Dickstein, J. B., Moldofsky, H., Lue, F. A. & Hay, J. B. (1999). AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 276 (45), R1018-R1022.
- Drummond, S. & Brown, G. (2001). The effects of total sleep deprivation on cerebral responses to cognitive performance. Neuropsychopharmacology, 26, S68-S73.
- Everson, C. A., Bergmann, B. M. & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep Deprivation in the Rat : III. Total Sleep Deprivation. Sleep, 12 (1), 13-21.
- Everson, C. A., Guilligan, M. A., Kushida, C. A., Pilcher, J. J., Fang, V. S., Refetoff, S., Bergmann, B. M. & Rechtschaffen, A (1989). Sleep Deprivation in the Rat : IX. Recovery. Sleep, 12 (1), 60-67.

- Galicia, O., Sánchez-Alavez, M., Díaz-Ruiz, O., Sánchez Narváez, F., Elder, J.H., Navarro, L. & Prospéro-García, O. (2000). HIV-derived protein gp120 suppresses P3 potential in rats: potential implications in HIV-associated dementia. Neuroreport, 11(6), 1351-1355.
- Galicia, O., Sánchez-Alavéz, M., Méndez-Díaz, M., Navarro, L. & Prospéro-García, O. (2002). La glicoproteína 120 del VIH: potencial agente etiológico de la Demencia Asociada al SIDA. Revista de Investigación Clínica, 54(3), 113-128.
- Harrison, Y. & Horne, J. A. (2000). Sleep Loss and Temporal Memory. The Quarterly Journal of Experimental Psychology, 53 (1), 271-279.
- Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature, 407, 770-776.
- Hipólido, D. C., D'Almeida, V., Raymond, R., Tufik, S. & Nobrega, J. N. (2002). Sleep deprivation does not affect indices of necrosis or apoptosis in rat brain. International Journal of Neuroscience, 112(2), [Resumen].
- Hobson, J. A. & Pace-Schott, E. F. (2002). The Cognitive Neuroscience of Sleep: Neuronal Systems, consciousness and learning. Nature Review Neuroscience, 3 (9), 679-93.
- Hothersall, D. (1997). Historia de la Psicología. México: Mc Graw Hill.
- Jouvet, M. (1998). El sueño y los sueños. México: Fondo de Cultura Económica.
- Junying, Y. & Yanker, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. Nature, 407, 802-809.

- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (2000). Principles of Neural Science. USA : McGraw-Hill. (936.947)
- Kaul, M., Garden, G. A. & Lipton, S. A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV- associated dementia. Nature, 410, 988-994.
- Krueger, J. M., Obál, F., Kapás, L. & Fang, J. (1995). Brain organization and sleep function. Behavioral Brain Research, 69, 177-185. .
- Kubota, T., Li, N., Guan, Z., Brown, R. A. & Krueger, J. M. (2002). Intrapreoptic microinjection of TNF-alpha enhances non-REM sleep in rats. Brain Research, 932, 37-44.
- Kushikata, T., Fang, J. & Krueger, J. M. (1999). Brain-derived neurotrophic factor enhances spontaneous sleep in rats and rabbits. AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 276, R839-R845.
- Montes-Rodríguez, C. J., Alavez, S., González-Lira, B., Haro-Valencia, R., Moran, J., Helder, J. H. & Prospéro-García, O. (2002). TNF α -induced neuronal death in the brain cortex of rats is prevented by deprivation of total sleep. 32 Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Abstract 701.4.
- Monti, B., Zanghellini, P. & Contestabile, A. (2001) Characterization of ceramide-induced death in cerebellar granule cells in culture. Neurochemistry International, 39, 11-18.
- Pace-Schott & Hobson, A. (2002). The Neurobiology of Sleep: Genetics, Cellular Physiology and Subcortical Networks. Nature Reviews Neuroscience, 3, 591-604.

- Pan, W., Zadina, J. E., Harlan, R. E., Weber, J. T., Banks, W. A. & Kastin, A. J. (1997). Tumor Necrosis Factor- α : a Neuromodulator in the CNS. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 21(5), 603-613.
- Petrovsky, N., McNair, P. & Harrison, L. C. (1998). CYTOKINE, 10(4), 307-312.
- Prospéro-García, O. & Drucker-Colin, R., (1996). Control Neural del Ciclo Vigilia-Sueño: Mecanismos Neurofisiológicos y Neuroquímicos. Factores Inductores del Sueño. En Ramos Platón, J. M.(Ed.), Sueño y Procesos Cognitivos (pp. 131-160). Madrid, España: Síntesis Psicología.
- Prospéro-García, O., Méndez Díaz, M. & Navarro, L. (2001) Los endocannabinoides y el sueño. Vigilia Sueño13(2) 177-186.
- Rabacchi, S. A., Kruk, B., Hamilton, J., Carney, C., Hoffman, J. R., Meyer, S. L., Springer, J. E. & Baird, D. H. (1999). BDNF and NT4/5 Promote Survival and Neurite Outgrowth of Pontocerebellar Mossy Fiber Neurons. Journal of Neurobiology, 40, 254-259. [Abstract]
- Ramos-Platón, J. M. (1996). Funciones del Sueño. En Ramos Platón, J. M. (Ed.), Sueño y Procesos Cognitivos (pp. 79-101). Madrid, España: Síntesis Psicología.
- Sanchez-Alavez, M., Criado, J., Gómez-Chavarín, M., Jiménez-Anguiano, A., Navarro, L., Díaz-Ruiz, O., Galicia, O., Sánchez-Narváez, F., Murillo-Rodríguez, Henriksen, S. J., Elder, J. H. & Próspero-García, O. (2000) HIV- and FIV-Derived gp120 Alter Spatial Memory, LTP, and Sleep in Rats. Neurobiology of Disease, 7, 384-394.

- Saper, B. C., Chou, T. C. & Scamell, E. T. (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. Trends in Neurosciences, 24, 726-731.
- Schuman, E. M. (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. Current Opinion in Neurobiology, 9, 105-109.
- Siao, C. J. & Tsirka, S. E. (2002). Extracellular proteases and neuronal cell death. Cell Molecular Biology, 48(2), 151-161. [.]
- Sleep Research Society, (1993). Basics of Sleep Behavior, USA.
- Taishi, P., Sanchez, C., Wang, Y., Fang, J., Harding, J. W. & Krueger, J. M. (2001). Conditions that affect sleep alter the expression of molecules associated with synaptic plasticity. AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 281, R839-R845.
- Takahashi, P., & Krueger, J.M. (1999) Nerve growth factor enhances sleep in rabbit. Neuroscience Letters, 264, 149-152.
- Tyler, W. J. & Pozzo-Miller, L. D. (2001). BDNF Enhances Quantal Neurotransmitter Release and Increases the Number of Docked Vesicles at the Active Zones of Hippocampal Excitatory Synapses. The Journal of Neuroscience, 21 (12), 4249-4258. [Abstract]
- Weaver, I. C. G., Grant, R. J. & Meaney J. M. (2002). Maternal behavior regulates long-term hippocampal expression of BAX and apoptosis in the offspring. Journal of Neurochemistry, 82, 998-1002.
- Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Li, R. & Shen, Y. (2002). Target Depletion of Distinct Tumor Necrosis Factor Receptor Subtypes Reveals

Hippocampal Neuron Death and Survival through Different Signal Transduction Pathways. The Journal of Neuroscience **22(8)**, 3025-3032.

- Yuan, J. & Yankner B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. Nature, **407**, 802-809.
- Zhang, J., Chen, Z., Taishi, P., Obál, F., Jr., Fang, J. & Krueger J. M. (1998). Sleep deprivation increases rat hypothalamic growth hormone-releasing hormone mRNA. AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, **44**, R1755-R1761.
- Zigmond, M. J., Blomm, F. E., Landis, S. C., Robets, J. L. & Squire, L. R. (1999). Fundamental Neuroscience. San Diego, CA. EE UU: Academic Press.