

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE
PROTEÍNAS CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL
DURANTE EL SUEÑO DE MOVIMIENTOS
OCULARES RAPIDOS (sMOR)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**
P R E S E N T A
RUBEN GONZALEZ RIVERA

DIRECTORA DE TESIS: RA. MARIA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO

MEXICO, D.F.



FEBRERO, 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: González Rivera Rubén

FECHA: 6 de Febrero 2004

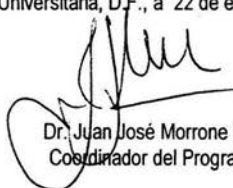
FIRMA: González R.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de diciembre, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) González Rivera Rubén, con número de cuenta 85263633, con la tesis titulada: "Identificación y caracterización de proteínas con expresión diferencial durante el sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR)", bajo la dirección del(a) Dra. María de la Luz Navarro Angulo.

Presidente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles
Vocal:	Dr. León Cintra McGlone
Secretario:	Dra. María de la Luz Navarro Angulo
Suplente:	Dr. Guillermo Mendoza Hernández
Suplente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de enero de 2004.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

PRESENTACIÓN

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL DURANTE EL SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS (sMOR)”

Tesis realizada en el grupo de Neurociencias del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. Por el Biólogo Rubén González Rivera. Bajo la tutoría de la Dra. María de la Luz Navarro Angulo.

El trabajo de Tesis fue supervisado por el Comité Tutorial formado por la Dra. Ma. de la Luz Navarro Angulo, Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña y el Dr. Guillermo Mendoza Hernández

El desarrollo de esta Tesis fue apoyado por el donativo de **CONACyT 25128N** otorgado a Luz Navarro y por la Beca de **CONACyT** otorgada a Rubén González Rivera con número de Becario **142925**.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luz Navarro, por su accesoria, apoyo en la realización de este trabajo y sobre todo por su confianza en que podría terminar con éxito este trabajo.

Al Comité Tutorial formado por la Dra. Ma. de la Luz Navarro Angulo, Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña y el Dr. Guillermo Mendoza Hernández, por sus observaciones y comentarios tan importantes durante el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Dr. Oscar Próspero, por su constante e incansable presión, cuando no tenía resultados sólidos para fundamentar mi proyecto de investigación, lo cual le agradezco.

A la Candidata a Doctora en C.B. Bióloga Marina Martínez por su ayuda en la corrección inicial de este escrito.

A mi Padre Guillermo González Damián, porque siempre me ha apoyado y ha confiado en que he de terminar con éxito las metas que me propongo.

A mi Madre Julia Rivera Cásales, porque me ha apoyado en momentos difíciles.

A Maru, Gracias Maru porque siempre he contado contigo para compartir mis intentos fallidos para lograr el éxito, así como, has estado para compartir mis éxitos.

A Xchel y Mexitli Atzin porque en momentos de presión en la realización de este trabajo, al llegar a casa se me olvidaban solo de ver sus lindas sonrisas.

A Rodolfo Martínez Vargas y familia, porque en momentos difíciles siempre ha apoyado a mi familia formada por Marina, Xchel, Atzin y yo. Ese apoyo ha servido para tener la tranquilidad para canalizar esfuerzos hacia este logro académico y otros en los que estamos trabajando, los cuales beneficiarán ampliamente a la familia González Martínez. ¡¡ **Gracias Rodol !!**

A mi hermano Daniel González Rivera y a su familia por su apoyo incondicional y porque siempre han confiado en que he de lograr las metas que me propongo.

A mis hermanos Alfredo, Antonio, Bernardo y Ricardo González Rivera, porque siempre he contado con ellos en momentos difíciles y el hecho de visitarlos y en ocasiones trabajar con ellos me hacía olvidar la presiones del trabajo.

A Armando González Galicia y familia por su valiosa amistad y por la convivencia familiar que siempre hemos mantenido.








“A MARU”

**Eres una Flor de radiantes colores
Que opacas al sol cuando sonríes
Que iluminas de colores la naturaleza
Que los factores externos no logran opacar tu belleza
Que por siempre.....!!brilles intensamente¡¡**

**Eres un copito de nieve
Que no necesita del frío
Que no necesita que llueva
Para poder existir y flotar en el aire
El sol no puede derretir toda esa felicidad que irradas
Con esa blancura y pureza
Resplandeces infinitamente iluminando el Universo**

Maru: Gracias por compartir tu existencia conmigo y con dos cachorritos Xchel y Atzin. Viva la felicidad.

● ● ●
INDICE

TÍTULO	
PRESENTACIÓN	
AGRADECIMIENTOS	 
INDICE	  
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
EL SUEÑO	5
ESTADOS DE VIGILANCIA	6
Vigilia:	6
Electrofisiología.	
Neuroquímica y neuroanatomía de la vigilia.	
Noradrenalina	
Dopamina	
Acetilcolina	
Histamina	
Glutamato	
Péptidos	
Orexinas o hipocretinas	
Sueño sin movimientos oculares rápidos (snMOR)	11
Electrofisiología.	
Neuroquímica y neuroanatomía del snMOR.	
Serotonina (5-HT)	
Adenosina	
Ácido gama amino butírico (GABA)	
Péptidos opioides endógenos	
Galanina	
Factor liberador de la hormona del crecimiento	
Oleamida/anandamida	

Sueño con movimientos oculares rápidos (sMOR)	16
Electrofisiología.	
Neuroquímica y neuroanatomía del sMOR.	
Acetilcolina (ACh)	
GABA	
Glutamato	
Péptidos	
Oxido nítrico	
PRIVACIÓN SELECTIVA DE sMOR	22
REBOTE DE sMOR	23
TEORÍA HÚMEDA DEL SUEÑO	24
LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
MÉTODOS	33
Material biológico	
Privación selectiva de sMOR	
Florero invertido	
Obtención de LCR	
Variaciones diurnas	
Cuantificación proteica	
Electroforesis	
Tinción con plata	
Densitometría	
Obtención de secuencias parciales	
RESULTADOS	37
Concentración de proteínas totales en LCR	
Mezcla de LCR Control (C), Privado (P) y Rebote (R)	
Análisis densitométrico de bandas proteicas de LCR	
Incremento del periodo de rebote de sMOR	
Variación diurna de la proteína de 15 KDa	
Espectrometría de masas	
Tabla de resultados	
DISCUSIÓN	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TEXTO

μ V	Microvolts
5-HT	Serotonina
C	Grupo control
CB1	Receptor a cannabinoides tipo 1
CC	Cistatina C
D.O.	Densidad óptica
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
GABA	Ácido gama amino butírico
GABA _A	Receptor a GABA tipo A
GABA _B	Receptor a GABA tipo B
Hz	Ciclos por segundo
i.c.v.	Intracerebro ventricular
KDa	Kilo Daltons
LC	Locus coeruleus
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDT	Núcleo tegmental laterodorsal
MOR-off	Grupos neuronales inactivas durante el sMOR
MOR-on	Grupos neuronales activas durante el sMOR
NA	Noradrenalina
NDR	Núcleo dorsal del rafe
NDR	Núcleo dorsal del rafe
NR	Núcleo del rafe
P	Grupo privado de sMOR
P.M.	Peso molecular
PC	Plexo coroideo
PPT	Núcleo tegmental pedúnculo pontino
psMOR	Privación selectiva de sMOR
R	Grupo rebote
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida adicionado con dodesilsulfato de sodio
sMOR	Sueño con movimientos oculares rápidos
SNC	Sistema nervioso central
snMOR	Sueño sin movimiento oculares rápidos
SOL	Sueño de ondas lentas
TMN	Núcleo tuberomamilar

VIP	Péptido vasoactivo intestinal
VLPO	Núcleo preóptico ventrolateral
VMN	Núcleo ventromedial

RESUMEN

El sueño es un estado conductual necesario para nuestra salud y sobrevivencia, la privación permanente del mismo es incompatible con la vida.

El estudio electrofisiológico del sueño ha mostrado que no se trata de un estado uniforme, al menos podemos identificar dos etapas: el sueño lento o sin movimientos oculares rápidos y el sueño con movimientos oculares rápidos en el cual se presentan las ensoñaciones.

Para el estudio de los mecanismos que dan lugar a las diversas etapas de sueño, se han utilizado diferentes enfoques, uno de ellos ha sido la búsqueda de sustancias capaces de inducir o mantener el sueño (teoría húmeda del sueño). Estos estudios datan desde los trabajos realizados por Pierón, a principios del siglo XX, en los que plantea la existencia de la hipnotoxina, sustancia termolábil y no dializable (probablemente una proteína), contenida en el líquido cefalorraquídeo y capaz de inducir sueño. Sin embargo, es hasta la década de los 70's, con los trabajos de Drucker, en los que propiamente se asocian las proteínas y el sueño, en particular se asocia el SMOR con la liberación de proteínas en la formación reticular mesencefálica. Además de que la administración de inhibidores de síntesis de proteínas disminuyen esta fase de sueño, mientras que los inhibidores de proteasas la incrementan.

A la fecha se han descrito una gran cantidad de moléculas con propiedades inductoras de sueño entre las cuales se encuentran hormonas, citocinas y neuropéptidos; entre otras; la mayoría de naturaleza proteica.

Continuando con al búsqueda de moléculas de naturaleza proteica, nos interesamos en analizar la presencia de proteínas en LCR de ratas, durante la privación selectiva de SMOR y durante el periodo de rebote (periodo en el cual se les permite dormir a los sujetos experimentales y en que predomina la fase de sMOR., así como identificar aquellas proteínas que cambiarán su concentración con la privación. Encontramos una banda proteica de 15 KDa que incrementó su expresión en el grupo de privación y con una tendencia a disminuir en el rebote. También analizamos su patrón de expresión a lo largo de las 24 horas día, y

encontramos una mayor concentración a las 13 y 17 horas y una menor concentración a la 1 de la mañana, estos datos se correlacionan con la prevaencia de sMOR en la rata. La secuencia de esta proteína corresponde a la cistatina C, un inhibidor natural de algunas cistein-proteasas, lo que sugiere que tanto la cistatina C como las proteasas a las que inhibe puedan jugar un papel fisiológico en la regulación del SMOR.

INTRODUCCION

El sueño.

El sueño es un estado al cual recurrimos diariamente, es necesario para nuestra salud y sobrevivencia. En promedio los humanos requerimos ocho horas de sueño por noche. Disminuir este periodo o anularlo por completo disminuye la calidad de la vigilia, por ejemplo afectando las actividades motrices y cognitivas afectando consecuentemente las capacidades adaptativas. Incluso la privación permanente de sueño nos lleva a la muerte.

El sueño es una de las funciones fisiológicas integrativas más complejas en los mamíferos superiores y aparentemente en cualquier ser vivo, parece estar regulada por factores humorales endógenos. Este estado ha llamado la atención de la humanidad desde épocas muy remotas y se han propuesto diversas teorías para explicar su función y mecanismos. Sin embargo, hasta el momento no hay una teoría única que explique satisfactoriamente los mecanismos ni la función del sueño (Drucker-Colín & Merchant-Nancy, 1995).

Desde un punto de vista conductual, el sueño se caracteriza por la disminución en el movimiento corporal, la presencia de una posición corporal estereotipada y una reducida respuesta a los estímulos de baja intensidad tales como sonidos, toques etc. (Antrobus et al, 1993). Es un estado reversible, es decir podemos "despertar" del sueño, lo cual lo distingue del estado de coma y la muerte.

Aunque inicialmente el estudio del sueño sólo consideraba el aspecto mental de las ensoñaciones, sin involucrar el estado fisiológico del cerebro, actualmente es estudiado de forma más completa incluyendo la evaluación de la actividad eléctrica del cerebro (EEG), la actividad ocular (EOG) y muscular (EMG) (Antrobus et al, 1993; Prospéro-García & Drucker-Colín, 1996).

Basándose en el registro de estas señales, en los humanos, el ciclo sueño-vigilia se ha clasificado en las siguientes fases: Vigilia, sueño sin Movimientos Oculares Rápidos (snMOR) dividido en cuatro etapas de la I a IV y sueño con movimientos oculares rápidos (sMOR), mientras que en las ratas, especie utilizada en este trabajo, el snMOR solo se divide en dos etapas I y II.

ESTADOS DE VIGILANCIA

VIGILIA

Electrofisiología: En la vigilia, el EEG alterna entre dos patrones principales: una actividad de bajo voltaje (10-30 μV) rápida (16-25 Hz), frecuentemente es llamada "activación" o patrón desincronizado. La otra actividad que se registra, es un patrón sinusoidal de 8 a 12 Hz, entre 20 y 40 μV , que es llamada actividad "alfa" (Carskadon & Dement, 2000), también se observa una actividad theta en el EEG del vertex, asociada con movimientos corporales, una amplitud alta y variable en el EMG y ocasionalmente movimientos oculares en el EOG (Timo-Iraria et al 1970 revisado en Yoshimoto et al 1999).

Neuroquímica y neuroanatomía de la vigilia: La vigilia es un estado conductual que resulta de la participación orquestada de algunos neurotransmisores en diversas regiones cerebrales. Entre las regiones involucradas se encuentran el tallo cerebral, la formación reticular oral pontina y del cerebro medio, el diencefalo caudal (hipotálamo posterior, subtálamo y tálamo ventral) y el cerebro basal anterior (**Fig. 1**).

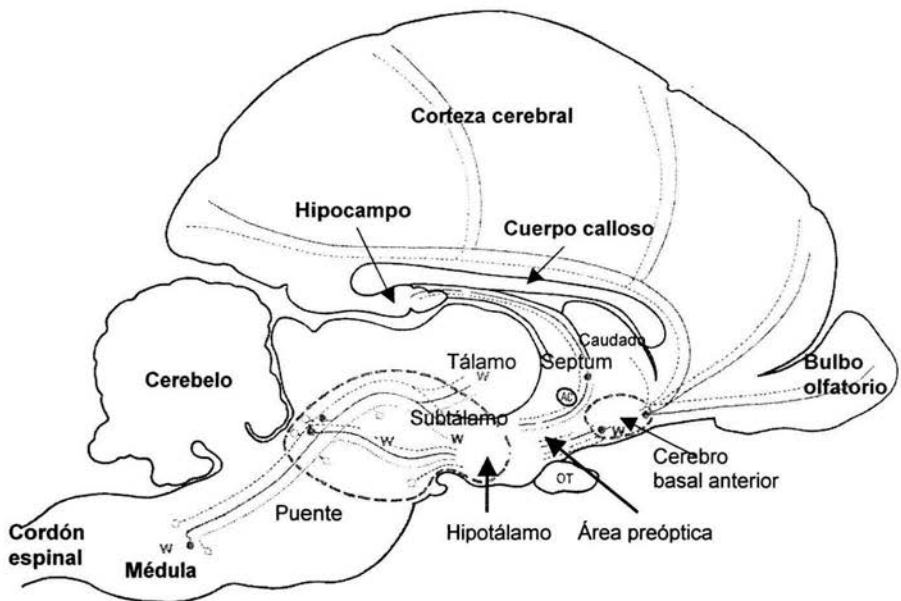


Fig. 1 Grupos neuronales implicado en la generación y mantenimiento de la vigilia.

Las áreas encerradas con una línea discontinua representan las regiones en el tallo cerebral, diencefalo caudal y cerebro basal anterior. Áreas marcadas con W: Indican sitios donde la estimulación eléctrica ocasiona activación cortical y despertar, también corresponde a sitios donde hay actividad neuronal espontánea mayor durante la vigilia que durante el snMOR. Las áreas marcadas con diamante: Indican a las neuronas de la formación reticular y las líneas punteadas representan sus proyecciones ascendentes hacia el cerebro anterior. Los círculos vacíos: representan a las neuronas catecolaminérgicas del tallo cerebral y del LC, el cual contiene noradrenalina y de la sustancia negra y el área ventral tegmental las cuales contienen dopamina. Los círculos llenos representan neuronas que contienen acetilcolina en la formación reticular del tallo cerebral, así como del cerebro basal anterior. Figura tomada de Jones 2000.

La formación reticular medular ventral, pontina central y del cerebro medio, así como los núcleos talámicos mediales, ventrales e intralaminares, el subtálamo posterior, el hipotálamo y el cerebro basal anterior presentan una actividad eléctrica espontánea mayor durante la vigilia que durante el snMOR y su estimulación induce despertar cortical, por lo que se sugiere que participan de manera importante en la generación y mantenimiento de la vigilia.

Las neuronas del sistema reticular reciben información colateral de los sistemas visceral, somático y de los sistemas sensoriales y envían esta información a lo largo de proyecciones ascendentes al cerebro anterior a través de dos vías: la vía dorsal y la vía ventral. La vía dorsal es a través de núcleos talámicos no específicos, y de allí proyecta hacia la corteza cerebral. La vía ventral es a través del hipotálamo y el subtálamo hacia el cerebro basal anterior y septum donde las neuronas proyectan a diversas áreas corticales e hipocampo. (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002)

Noradrenalina

Los estudios iniciales de Jouvet implicaban al locus coeruleus (LC) en la generación de sMOR. Sin embargo, estudios más recientes consideran que este núcleo está más implicado en la vigilia. Las neuronas noradrenérgicas del LC están más activas durante la vigilia, durante los procesos de atención y de despertar así como en situaciones de estrés. Por otro lado, muestran actividad durante la vigilia quieta, progresivamente su intensidad de disparo decrece durante el snMOR y cesa totalmente durante el sMOR (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002). Se ha observado que las neuronas noradrenérgicas proyectan directamente y de manera difusa a la corteza cerebral y la activan. También envían axones hacia la médula espinal.

Saper et al (2001) proponen que los núcleos aminérgicos: el núcleo tuberomamilar (TMN), el LC y el núcleo dorsal del rafe (NDR) promueven la vigilia, por efectos excitatorios directos sobre la corteza y por inhibición de las neuronas promotoras de sueño del núcleo preóptico ventrolateral (VLPO).

Dopamina

Las neuronas dopaminérgicas están localizadas en la sustancia negra y área ventral tegmental y además hay una distribución difusa de estas neuronas a través del hipotálamo posterior y del subtálamo. De la sustancia negra proyectan a través del hipotálamo lateral hacia el neocórtex, el cerebro basal anterior, el núcleo acumbens, el septum, la amígdala y la corteza frontal; predominantemente,

están implicadas en modular la actividad del sistema límbico y motor. (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Acetilcolina (ACh)

La acetilcolina (ACh) participa en los procesos de activación cortical durante la vigilia y durante el sMOR. Los núcleos colinérgicos se encuentran en la formación reticular del tallo cerebral (núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPT), núcleo tegmental laterodorsal (LDT) y el cerebro basal anterior (sustancia negra inominata, banda diagonal y septum). Las neuronas colinérgicas del tallo cerebral proyectan a regiones subcorticales incluyendo el tálamo, el subtálamo, el hipotálamo, el cerebro basal anterior y el septum, y las neuronas del cerebro basal anterior proyectan de manera amplia a la corteza y al hipocampo (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Las neuronas del cerebro basal anterior están activas durante la vigilia y sMOR. La secreción de acetilcolina en la corteza cerebral está altamente asociada con la activación cortical espontánea durante la vigilia y el sMOR, la cual, es inducida durante la estimulación eléctrica de la formación reticular del cerebro medio.

Histamina

El efecto de la histamina en la vigilia se infiere desde que se observó el efecto sedativo de los antihistamínicos, además la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de histamina ocasiona despertar. Las neuronas histaminérgicas se encuentran en el hipotálamo posterior, pueden recibir proyecciones de la formación reticular del tallo cerebral y proyectan directamente a la corteza cerebral (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Glutamato

Glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio, este neurotransmisor participa en la actividad de las neuronas durante la vigilia. Las neuronas glutamatérgicas se encuentran en la formación reticular del tallo cerebral. El glutamato parece ser el neurotransmisor primario del sistema reticular de activación ascendente, del tálamo y de la corteza cerebral (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Péptidos

En los procesos de la vigilia participan algunos péptidos, tales como: la sustancia P, el factor liberador de corticotropina, el factor liberador de tiotropina, el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y la neurotensina. A menudo se colocan con neurotransmisores implicados en la promoción vigilia. Estos péptidos pueden ser liberados en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y difundir ampliamente en el cerebro, o bien actuar en sistemas neuronales con amplias proyecciones. (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Orexinas o hipocretinas

La participación de las hipocretinas en la regulación del ciclo vigilia-sueño se establece con las observaciones relacionadas con la narcolepsia, una de las patologías del sueño. La narcolepsia se caracteriza porque se presenta una desorganización del ciclo vigilia sueño, con severa somnolencia diurna, aparición prematura de la etapa de sMOR y cataplexia (atonía muscular provocada por emociones como risa o furia). Lin et al (1999) demostraron que la narcolepsia en perros es ocasionada por una mutación en el receptor a hipocretina-2. Por otro lado, los niveles de hipocretina-1 en sujetos narcolépticos están disminuidos. En estudios de hibridación *in situ* se observa una marcada disminución o ausencia de neuronas hipocretinérgicas en cerebros de personas que estando vivas sufrieron narcolepsia. Las hipocretinas 1 y 2 son neuropéptidos producidos por grupos neuronales ubicados en el hipotálamo dorsal, posterior y lateral. Sus proyecciones van hacia el núcleo arcuato, núcleo paraventricular y núcleo ventromedial. Estas

estructuras están relacionadas con la regulación de la ingesta de alimento. Las neuronas que liberan hipocretinas también proyectan a estructuras asociadas con el sistema límbico, como el núcleo acumbens, la amígdala, el septum, al cerebro basal anterior, los núcleos de la base de la estría terminalis, a áreas específicas del tálamo (reticular y paraventricular) y al tallo cerebral. En el tallo cerebral se encuentran densas proyecciones hipocretinérgicas a todos los grupos de células monoaminérgicas: al LC, al NR, a la sustancia negra, al área ventral tegmental y al TMN. En la actualidad se ha propuesto que las neuronas hipocretinérgicas están dirigiendo el tono monoaminérgico y el colinérgico durante el ciclo vigilia-sueño con una máxima actividad durante la vigilia y una mínima durante el sMOR (revisado en Hugs & Mignot 2001; Torterolo. 2002).

SUEÑO SIN MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS (snMOR)

Se denomina snMOR porque en esta fase de sueño no se presentan movimientos oculares rápidos. Se caracteriza porque en el organismo, los músculos se encuentran relajados, aunque la actividad somática no está ausente. Predomina la actividad parasimpática, disminuyen el ritmo cardiaco y la presión arterial, mientras que la actividad gastrointestinal se incrementa.

Electrofisiología: En las ratas, la actividad neuronal alfa decrece, el registro de EEG consiste principalmente de actividad de bajo voltaje y una frecuencia mixta de 3 a 7 Hz. con husos de sueño, que son ondas sinusoidales con una frecuencia entre 12 y 14 Hz, y con ondas "delta", son ondas de amplitud alta ($>75 \mu\text{V}$) de baja frecuencia (0.5-2 Hz) y una clara ausencia de actividad theta en el EEG del vertex de la rata (Carskadon & Dement, 2000; Timo-Irraria et al, 1970)

En el inicio de esta fase de sueño se presenta una progresiva hiperpolarización en neuronas talamocorticales las cuales comienzan a descargar en un modo oscilatorio. Posiblemente algunas llegan a hiperpolarizarse más rápido que otras dando como consecuencia las oscilaciones en el rango de ondas

lentas, lo que explica que esta fase se conozca también como sueño de ondas lentas (SOL) (Borbély et al 1998)

Neuroquímica y neuroanatomía del snMOR: Entre las regiones que participan en la regulación, promoción e inicio del snMOR se encuentran los NR, el cerebro basal anterior, el hipotálamo anterior, el área preóptica, el núcleo del tracto solitario y los núcleos talámicos no específicos. Las neuronas del núcleo del tracto solitario y del tegmento adyacente proyectan hacia el cerebro anterior viscerolímico (Fig. 2).

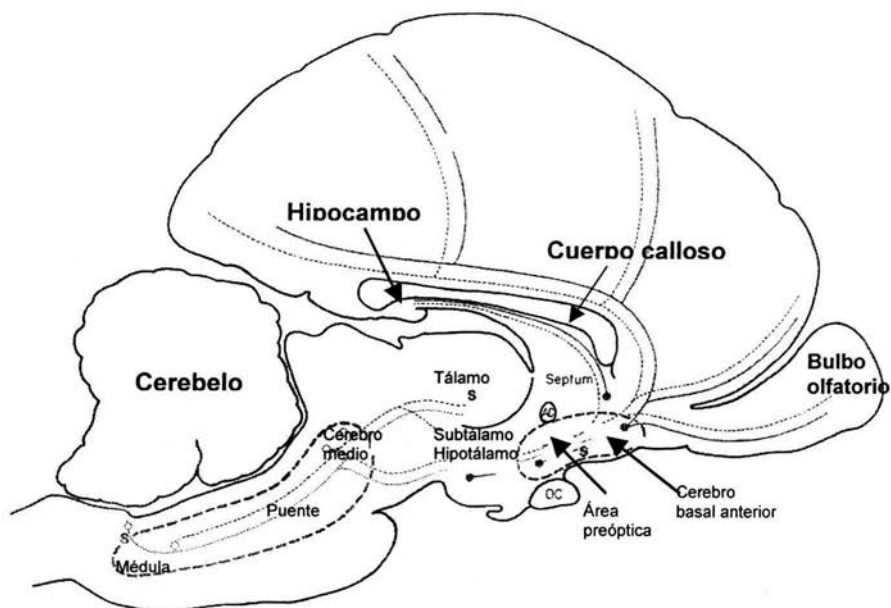


Fig. 2 Grupos neuronales implicados en la generación y mantenimiento del snMOR.

Las áreas encerradas con línea discontinua representan grupos neuronales implicados en la generación y mantenimiento de snMOR, presentes en el tallo cerebral y el cerebro anterior. Puntos marcados con S, indican los grupos neuronales que manifiestan alta actividad espontánea (típico patrón de actividad de ráfaga-pausa) durante el snMOR. Los diamantes representan a los grupos neuronales del núcleo del tracto solitario y el tegmento adyacente implicado en la regulación del snMOR y sus proyecciones (líneas discontinuas) hacia el cerebro anterior viscerolímico. Los círculos vacíos representan a las neuronas serotoninérgicas del NR del tallo cerebral, las cuales proyectan hacia el tegmento rostral, al tálamo, al subtálamo y al hipotálamo. Figura tomada de Jones 2000.

Serotonina (5-HT)

Las neuronas serotoninérgicas, que se encuentran en el núcleo del rafe, inervan al cerebro y a la médula espinal. La proyección rostral del rafe va hacia el cerebro basal anterior y a todas las áreas corticales; caudalmente proyecta hacia la medula espinal.

El NDR presenta neuronas especialmente serotoninérgicas, neuronas peptidérgicas (neuropéptido Y y colecistocinina) y neuronas dopaminérgicas. El NDR inerva a neuronas colinérgicas de la región compacta del núcleo PPT y del núcleo LDT (revisado en Monti & Monti , 2000).

Los estudios iniciales del grupo de Jouvet consideraban que la serotonina modulaba al sMOR, estudios posteriores mostraron que las neuronas del NDR decrecen su disparo con el inicio del sueño y durante el snMOR, y que prácticamente cesa su disparo durante el sMOR, por lo tanto las neuronas serotoninérgicas no juegan un papel esencial en el mantenimiento del sueño.

Actualmente se considera que la 5-HT puede estar preparando al cerebro y al organismo durante la vigilia para que se presente el snMOR por atenuación de los sistemas de activación cortical. Esta acción posiblemente se lleve a cabo a través de una acción inhibitoria sobre neuronas colinérgicas en el tegmento pontomesencefálico y el cerebro basal anterior, adicionalmente promoviendo la acumulación de factores inductores de sueño.

Adenosina

La adenosina es considerada como un neurotransmisor y también está presente en el fluido extracelular como un producto de degradación del trifosfato de adenosina, el cual es almacenado y liberado por vesículas sinápticas (revisado en Smith 1991, Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002). Este neurotransmisor actúa a través de receptores posinápticos para

bloquear la liberación de neurotransmisores, así inhibe las neuronas colinérgicas del tallo cerebral y del cerebro basal anterior. En el tálamo y en la corteza, la adenosina hiperpolariza las proyecciones neuronales y puede facilitar las salvas de actividad que subyacen a la actividad de ondas lentas que se observa en el snMOR. La administración de esta molécula ocasiona un incremento en el snMOR y un retraso en el sMOR, mientras que moléculas antagonistas de adenosina (metilxantinas: cafeína, teofilinas) reducen el sueño. La adenosina inhibe la actividad de las células de los núcleos PPT/LDT y del cerebro basal anterior, lo cual sugiere que su efecto en el sueño depende en parte de la inhibición de los sistemas colinérgicos que regulan la vigilia y el sueño. Las concentraciones de adenosina en el cerebro basal anterior se incrementan durante la vigilia y disminuyen con el sueño (revisado en Navarro et al, 2000, Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002)

Ácido gama amino butírico (GABA)

El ácido gama amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. Lleva a cabo sus efectos a través de dos tipos de receptores GABA_A y GABA_B, ambos receptores participan en la hiperpolarización asociada con los usos de sueño y las ondas lentas. Cabe mencionar que las benzodiazepinas, principales agentes sedativos e hipnóticos utilizados, llevan a cabo su acción a través de su unión al receptor GABA_A.

Se han localizado neuronas gabaérgicas distribuidas en el hipotálamo anterior, el área preóptica y el cerebro basal anterior y representan tanto a interneuronas como a neuronas de proyección. Algunas de ellas proyectan hacia el hipotálamo posterior, donde pueden inhibir sistemas activadores localizados en esta región. La liberación de GABA en el hipotálamo posterior y en el cerebro basal anterior es mayor durante el snMOR que durante la vigilia y el sMOR. Las neuronas gabaérgicas del hipotálamo y cerebro basal anterior también dan lugar a proyecciones ascendentes hacia la corteza. Asimismo se han descrito interneuronas corticales gabaérgicas, que son mas activas durante el snMOR que

durante la vigilia. Es claro que la transmisión gabaérgica es fundamental para que se presente el snMOR (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Péptidos opioides endógenos

Entre los péptidos que participan en la generación y mantenimiento del snMOR, se encuentran las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas. Estas moléculas tienen un papel importante en la modulación sensorial y la analgesia, lo cual podría ser muy importante en el inicio y mantenimiento del sueño. Las encefalinas son secretadas por neuronas de la corteza cerebral y por neuronas que se encuentran relacionadas con el snMOR incluyendo núcleo del tracto solitario, el área preóptica y el núcleo dorsal del rafe en donde se colocan con serotonina. El LC, promotor de la vigilia, es potencialmente inhibido por los péptidos opioides y recibe aferencias encefalinérgicas, el incremento local de péptidos opioides ocasiona una disminución de la vigilia y un incremento del snMOR.

Galanina

El VLPO libera al GABA y al péptido inhibitorio galanina. El VLPO proyecta al LC y el DR, núcleos promotores de alerta, y al hipotálamo. El VLPO está formado por dos regiones, una región difusa y una región compacta, la región compacta proyecta al TMN y podría selectivamente promover el snMOR (revisado en Pace-Schott & Hobson, 2002).

Factor liberador de la hormona del crecimiento.

Se secreta por las neuronas parvocelulares del hipotálamo, estimula la secreción de la hormona del crecimiento en la pituitaria y parece tener propiedades inductoras de sueño, actuando sobre las neuronas del hipotálamo anterior y del área preóptica, facilitando el snMOR y a su vez induciendo la secreción de la hormona del crecimiento la cual se lleva cabo durante el snMOR,

en el primer tercio de la noche (revisado en Jones, 2000, Prospéro-García 2000 y Pace-Schott & Hobson 2002).

Oleamida/anandamida.

Son endocannabinoides que tienen su efecto a través de la unión al receptor a cannabinoides tipo 1 (CB1). Son capaces de producir efectos similares a los que produce la marihuana, como somnolencia, Por ejemplo la anandamida induce un incremento de snMOR y sMOR en la rata, mientras que oleamida solo induce un incremento en snMOR (Prospero García et al 2000).

En la generación del snMOR participan otros factores, tales como la hormona estimulante de los melanocitos, la somatostatina, la cortistatina, la prostaglandina D₂, interleucinas, los cuales a menudo son colocalizados con uno de los neurotransmisores, ya sea 5-HT o GABA.

SUEÑO CON MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS (SMOR)

El sueño con movimientos oculares rápidos fue descrito en la década de los 50's por Aserinsky y Kleitman, posteriormente en la década de los 60's Jouvét observó que el registro del EEG durante esta etapa de sueño era similar al de la vigilia por lo cual lo denominó sueño paradójico.

Electrofisiología: En el sMOR se presenta actividad cortical de bajo voltaje, con frecuencia mixta similar a la etapa inicial de snMOR. Esta fase de sueño se caracteriza principalmente por la presencia de movimientos oculares rápidos, la atonía muscular y la disrritmia cardiopulmonar. (revisado en Carskadon & Dement, 2000).

El EEG en la rata es de bajo voltaje 10-30 μ V y actividad rápida 20-50 Hz, otra característica, es la presencia de actividad rítmica theta en el EEG del vertex considerada como actividad theta hipocampal, una baja amplitud en el EMG y

movimientos oculares en el EOG (Timo-Iraria et al, 1970 revisado en Yoshimoto et al, 1999).

Las estructuras neuroanatómicas generadoras de los signos característicos del sMOR son las siguientes:

El EEG presenta una activación tónica en la frecuencia de disparo de las neuronas reticulares, talamocorticales y corticales.

Los movimientos oculares rápidos, por lo cual se denominó a esta fase de sueño, son el resultado de la actividad fásica de las células reticulares y vestibulares que posteriormente excitan a las neuronas oculomotoras.

El ritmo theta originado por la actividad del hipocampo, es influenciado por el tallo cerebral y mediado por el núcleo medial del septum y del cerebro basal anterior.

La atonía muscular resulta de la inhibición tónica de las motoneuronas del cuerno anterior espinal por la formación reticular pontomedular. (revisado en Pace-Schott & Hobson, 2002).

Neuroquímica y neuroanatomía del sMOR:

El modelo de interacción recíproca propuesto por Hobson y McCarley (1975), plantea que neuronas colinérgicas y aminérgicas de la unión mesopontina, interactúan en una manera tal que originan la alternancia ultradiana del snMOR y sMOR en mamíferos.

De la década de los 70's a la fecha se han realizado avances en el estudio del sueño y actualmente se acepta a los núcleos pontinos colinérgicos como generadores del sMOR. En estos núcleos se han descrito neuronas que incrementan su disparo durante el sMOR, a las que se les ha denominado neuronas MOR-on. Mientras que en los núcleos aminérgicos pontinos NDR y LC se han descrito neuronas que cesan su disparo durante el sMOR y son conocidas como MOR-off.

Las neuronas colinérgicas del LDT y PPT actúan para promover el sMOR, activando a las neuronas glutamatérgicas de la formación reticular pontina medial. Todas estas neuronas son inhibidas por células serotoninérgicas, noradrenérgicas y presumiblemente histaminérgicas, dopaminérgicas y orexinérgicas (revisado en Monti & Monti 2000).

Durante el snMOR las neuronas MOR-off continúan activas posiblemente a causa de la aferencia de neuronas diferentes a las del tipo MOR-on. La actividad de las neuronas MOR-off puede causar la liberación de noradrenalina a través de sus proyecciones colaterales, y así hiperpolarizarse ellas mismas. Este mecanismo posiblemente ocasiona que las neuronas MOR-off tengan actividad rítmica. Se propone que las proyecciones noradrenérgicas del LC cercanas a neuronas MOR-on, ocasionan un incremento de noradrenalina en torno a neuronas colinérgicas MOR-on, manteniendo una inhibición sobre ellas (revisado en Mallick et al, 2001).

El incremento en la liberación de NA en el LC, tiende a hiperpolarizar y autoinhibir a las neuronas del LC. Esto podría desinhibir las neuronas colinérgicas MOR-on, iniciando su activación.

Posteriormente el GABA (proveniente de la sustancia negra pars reticulata, del área gris periacueductal, del núcleo dorsal paragigantocelular y de interneuronas locales) actúa sobre las neuronas del LC y del NDR, inhibiendo a las neuronas MOR-off y liberando a las neuronas MOR-on de la inhibición aminérgica. En este proceso también participan los autoreceptores colinérgicos que se activan ante la liberación de acetilcolina, las neuronas MOR-on se autoestimulan y se establece el sMOR. (revisado en Pace-Schott & Hobson, 2002).

Así la inhibición por GABA y la autoinhibición en LC podría causar que las neuronas noradrenérgicas cesaran su disparo y se iniciara el sMOR. La

continuación de sMOR podría depender de la duración en que el GABA este disponible (Mallick et al 2001).

Acetilcolina (ACh)

La participación de la ACh en la generación del sueño fue planteada por Hernández-Peón y Jouvet en la década de los 60's en lo que se conoce como la teoría colinérgica del sueño.

Como se señaló antes, los principales núcleos colinérgicos involucrados en la generación del sMOR son los núcleos PPT y LDT.

El núcleo PPT está situado en el tegmento mesopontino dorsolateral. Con base a la densidad celular, se ha dividido en dos regiones: la parte compacta y la parte difusa. La parte compacta está formada por neuronas colinérgicas claramente separadas de las neuronas vecinas noradrenérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas. La parte difusa: rodea al tegmento mesopontino y contiene un amplio número de neuronas glutamatérgicas, también se han encontrado neuronas gabaérgicas en los bordes del PPT (revisado en Monti & Monti. 2000).

El núcleo LDT esta localizado caudalmente adyacente al PPT en la sustancia gris central y esta bordeado medialmente por el núcleo tegmental dorsal de Gudden, más rostralmente por el NDR y lateralmente por el LC, contiene neuronas colinérgicas intercaladas con neuronas no colinérgicas, principalmente glutamatérgicas.

Se ha observado que lesiones neurotóxicas aplicando ácido kaínico en el PPT y LDT inducen la desaparición o la disminución de sMOR, mientras que la microinyección de agonistas colinérgicos en la misma área inducen sMOR.

Las neuronas colinérgicas en PPT y LDT son inhibidas principalmente por neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas, sin embargo existen evidencias que

indican que también reciben proyecciones adrenérgicas, dopaminérgicas, histaminérgicas y orexinérgicas.

Las neuronas del PPT/LDT proyectan al cerebro medio, a la formación reticular pontina y bulbar, al sistema límbico, al tálamo y cerebro basal anterior. También hay proyecciones LDT-LDT y LDT-PPT las cuales tienen una función inhibitoria reciproca (revisado en Monti & Monti 2000).

GABA

La entrada de GABA al NDR y LC proveniente del área gris periacueductal, de la sustancia negra pars reticulata, del núcleo paragigantocelular y de interneuronas locales puede ser la etapa sináptica final responsable para desconectar las células sMOR-off serotoninérgicas y noradrenérgicas, desinhibiendo la red de células pontinas sMOR-on.

Las neuronas gabaérgicas localizadas en la parte inferior del tallo cerebral y cordón espinal, inhiben a las motoneuronas somáticas que se encuentran en el cuerno anterior espinal para producir la atonía muscular, esta acción la llevan a cabo junto con glicina (Maloney et al, 2000).

Durante el sueño, el VLPO inhibe a las regiones promotoras de la vigilia a través de proyecciones gabaérgicas y galaninérgicas. El core del VLPO inerva al TMN, al LC y al NDR, la inhibición de los sistemas de vigilia mediados por aminas, desinhibe a neuronas del VLPO, estabilizando el sueño.

El VLPO puede promover al sMOR por desinhibición de los núcleos PPT y LDT, a través de las interneuronas de estos núcleos, e inhibiendo a las neuronas aminérgicas que normalmente inhiben a las células promotoras de sMOR (revisado en Saper et al 2001).

También se ha mostrado que las concentraciones de GABA son mayores durante el sMOR comparado con la vigilia en el NDR y que el mucimol, agonista

GABA_A, aplicado en el NDR incrementa el sMOR, mientras que los antagonistas bicuculina o picrotoxina lo reducen (revisado en Monti & Monti 2000).

Glutamato

El glutamato activa a las neuronas colinérgicas y colinoceptivas en el PPT para generar el incremento exponencial en la actividad reticular pontina y mesopontina asociada con el inicio del sMOR. Este efecto es mediado a través de la actividad de los receptores kainato, ya que su efecto es revertido por el ácido sulfónico D-γ-glutamilaminometano, antagonista específico de estos receptores (Datta, 2002). Las fuentes endógenas de glutamato se encuentran en el PPT, en las subpoblaciones colinérgicas y no colinérgicas; la otra fuente esta en la formación reticular pontina la cual proyecta hacia el PPT (Datta et al, 2002). Las células glutamatérgicas del puente excitan a neuronas glicinérgicas.

Péptidos

El bloqueo de receptores a la somatostatina reduce el sMOR espontáneo y durante el periodo de rebote posterior a un periodo de privación. La administración de antagonistas a la somatostatina en LC ocasiona una reducción del sMOR, lo cual sugiere que este efecto puede ser parcialmente mediado por el sistema noradrenérgico de LC (Toppila et al, 2000). Se ha propuesto que neuropéptidos como el VIP y numerosas hormonas peptídicas participen en la regulación del sMOR.

Oxido nítrico

Se propone que el oxido nítrico participe en la modulación del ciclo sueño-vigilia, funcionando como un mensajero intercelular que puede incrementar la capilaridad, la vasodilatación y la liberación de neurotransmisores, entre ellos ACh (revisado en Leonard TO & Lydic 1999; Pace & Hobson 2002).

PRIVACIÓN SELECTIVA DE sMOR:

Durante la privación selectiva de sMOR (psMOR) se presenta un incremento en la “necesidad o presión” para que se presente esta fase de sueño, la cual es expresada por un incremento en la frecuencia de inicios de sMOR.

La privación de sMOR en ratas por 16 a 54 días de psMOR induce una debilidad progresiva y disminución de peso corporal, formación de úlceras e hiperqueratosis en la piel de la cola y la superficie plantar de las extremidades, pérdida de peso, a pesar de un incremento en la ingesta de alimento hasta de un 100%, incremento en el gasto energético, disminución de la temperatura corporal provocando irremediabilmente la muerte (Rechtschaffen et al 1989).

Uno de los métodos más utilizados para la psMOR, es el de “florero invertido o pedestal”. La psMOR por este método durante 24 horas, ocasiona un incremento significativo de sMOR durante las primeras 24 horas de periodo de rebote. Por otra parte la psMOR induce modificaciones en diversos sistemas de neurotransmisores. Por ejemplo, se ha observado un incremento de la tirosina hidroxilasa, enzima que participa en la síntesis de noradrenalina y el RNAm de la proteína transportadora de noradrenalina, la cual es responsable de la recaptura de NA y de mantenerla en las vesículas sinápticas en el LC (Basheer et al 1998).

Ante la privación de sMOR, se incrementa la concentración de GABA posiblemente para tratar de reducir la actividad de neuronas noradrenérgicas y resistir los efectos adversos de la privación. Sin embargo dado que las neuronas noradrenérgicas no cesan su disparo a pesar de que GABA está incrementado, parece que durante la privación selectiva de sMOR puede haber una entrada activa sobre neuronas adrenérgicas MOR-off para su continuo disparo (Majumdar & Mallick, 2003).

También se ha observado que durante la psMOR, la actividad continua del LC, causa un incremento de la concentración de NA, lo que podría activar a las neuronas gabaérgicas en PPT/LDT, pudiendo mantener a las neuronas MOR-on inhibidas y prevenir el inicio de sMOR (revisado en Majumdar & Mallick 2003).

Después de la psMOR por 96 horas, se observa un incremento en la actividad de la acetilcolinesterasa en el puente y en estructuras que reciben proyecciones colinérgicas del puente, como el tálamo y medula oblongada, este incremento en la actividad de la enzima sugiere una alta tasa de recambio de ACh (Benedito & Camarín, 2001).

REBOTE DE sMOR

El concepto de rebote de sueño sMOR fue propuesto por Dement en 1960, el cual consiste en el incremento de esta fase de sueño posterior a su privación selectiva. La supresión de sMOR induce una "necesidad" de sMOR. La "reparación" se lleva a cabo con un subsecuente incremento compensatorio u homeostático de sMOR (Jouvet, 1994). El incremento en los intentos para entrar a sMOR ante la privación es una función primaria de la ausencia de sMOR (Ocampo-Garcés et al, 2000).

Para explicar la presencia del periodo de rebote de sMOR posterior a un periodo de privación selectiva de sMOR se han propuesto tres hipótesis: la presináptica o hidráulica, la postsináptica y la del estrés.

Hipótesis presináptica o hidráulica: El rebote de sMOR es debido al incremento de factores inductores del sMOR. El rebote de sueño es considerado como un mecanismo intrínseco. La duración del rebote de sueño es usualmente proporcional a la duración de la privación de sMOR tal que el déficit o deuda de sMOR es parcialmente reparado (50 a 80%) (Jouvet, 1994).

Hipótesis postsináptica: La privación selectiva de sMOR induce alteración de la sensibilidad de receptores. A finales de la década de los 70 se observó que la privación de sMOR mejoraba a sujetos deprimidos. El rebote de sMOR era abolido por la administración de antagonistas a receptores de monoaminas. Con base en estos datos se propuso que el rebote de sMOR resulta del incremento en la sensibilidad de receptores a monoaminas o a ACh (Jouvet 1994; Siegel & Rogawski, 1998).

Hipótesis del estrés: El rebote de sueño sMOR es causado por varias situaciones estresantes que ocurren durante la privación de sMOR. El rebote de sMOR no está relacionado con el clásico eje hipotálamo-pituitaria-adrenal implicado en el estrés. El rebote de sMOR ocurre aun en rata o gato hipofisectomizados; Además no hay una correlación entre el incremento en corticosterona y el rebote de sMOR. El rebote de sMOR ha sido propuesto como un mecanismo compensatorio o protector, como ya había mencionado (Jouvet, 1994).

Por otra parte se ha visto que las proyecciones del PPT son muy importantes para disparar los intentos a entrar a sMOR durante la privación selectiva de esta fase. La propensión de sMOR fue comprometida después de una lesión extensiva de las neuronas colinérgicas del PPT y también disminuyó el tiempo total de sMOR en el rebote (Deurveilher & Hennevin, 2001).

TEORÍA HÚMEDA DEL SUEÑO

Como ya mencionamos, el estudio del sueño, se ha abordado mediante diversas estrategias. Destacando entre ellas la búsqueda de sustancias capaces de inducir y/o regular el sueño. Uno de los métodos más empleados ha sido la privación total de sueño, o selectiva de sMOR, con la finalidad de inducir la acumulación de posibles factores inductores de sueño. La búsqueda de estos factores coincide con la llamada teoría húmeda del sueño.

Esta aproximación se inicia con Pierón en 1913, con la descripción de los efectos de una sustancia no identificada, a la cual llamó hipnotoxina, la cual se acumula en el LCR durante la vigilia e induce sueño (Revisado en: Prospéro-García et al 1997).

Los estudios de Pierón fueron retomados por Schenedorf en 1939 quien obtuvo LCR de perros privados de sueño y lo inyectó en perros que habían dormido *ad libitum*. A los perros receptores se les había extraído LCR previamente para que no hubiera un incremento en la presión intraventricular. Se observó que inducía sueño en los perros receptores del LCR. Posteriormente la búsqueda de la hipnotoxina reclutó varios seguidores, entre los que destaca los grupos de investigación de Monier, Pappenheimer, Uchizono y Drucker-Colín

Debido a este interés, actualmente para proponer a una sustancia como factor inductor de sueño, se han sugerido una serie de criterios que dichas moléculas tienen que cubrir (Borbely & Tobler, 1989). Entre éstos destacan: inducir y/o mantener el sueño; producir un efecto inductor de sueño de manera dosis-dependiente; presentar un efecto similar en diferentes especies; existir naturalmente en el organismo; mostrar variaciones en su concentración, síntesis o recambio asociadas a los cambios en el ciclo sueño-vigilia, o bien en los receptores que medien sus efectos y estar químicamente identificada.

A la fecha se conoce una gran cantidad de sustancias que cumplen con uno o más de los criterios antes mencionados, entre los que podemos mencionar hormonas, citocinas, neuropéptidos entre otros, como se puede apreciar en la tabla 1 (revisado en: Navarro et al, 2000; Prospéro-García et al, 2000).

Algunos de estos factores se han aislado del parénquima cerebral, por ejemplo, las proteínas de 73 y 45 KDa, etc., mientras que otros factores se han aislado del LCR por ejemplo Factor S, VIP.

FACTORES INDUCTORES DE SUEÑO					
	NATURALEZA QUÍMICA	PESO MOLECULAR (KDa)	snMOR	sMOR	VIGILIA
5-HT	Mod de aa	0.2	↑	=	↓
Ach	Mod de aa	0.2	-	↑	↑
NA	Mod de aa	0.2	↓	↓	↑
GABA	Mod de aa	0.1	↑		
Adenosina	Nucleósido	0.3	↑		↑
ACTH	Péptido	39 aa			
GH	Péptido	21 (h) 47 (b)	=	↑	↓
PRL	Péptido	23	-	↑	↓
GHRH	Péptido	5.3	↑	=	↓
SS-14	Péptido	1.6	=	↑	↓
P4	Esteroides	0.3	↑	↓	↑
Insulina	Péptido	6	↑	=	↓
Melatonina	Mod de aa	0.2	↑		
Uridina	Nucleósido	0.2	↑	↓	↓
CLIP	Péptido	2.6	=	↑	↓
DSIP	Péptido	0.8	↑	↓	↓
Factor S	Péptido	0.5	↑	↓	↓
Perfusados					
FRM	Péptido	45 y 73		↑	
VIP	Péptido	3.3		↑	↓
CCK-8	Péptido	1		↑	↓
IFN 2	Péptido	20	↑		
IL 1 - IL 1	Péptido	17	↑		
TNF	Péptido	17	↑		
BDNF	Péptido	13.6	↑		
Orexina A	Péptido	3.5	=	↓	↑
Prostaglandinas	Lípido	0.3	↑	↓	↓
Anandamida	Lípido	0.3		↑	
Oleamida	Lípido	0.3	↑	=	↓

TABLA 1. Sustancias promotoras o reguladoras de sueño. Modificado de García-García & Drucker-Colín 1999; Prospero-García et al, 2000.

Las proteínas de 73 y 45 KDa fueron descritas por el grupo de Drucker-Colín. En 1975 Drucker y colaboradores describieron un patrón de expresión a lo largo del cíclico sueño-vigilia en los niveles de proteínas de perfusados obtenidos de la formación reticular mesencefálica (FRM) de gatos. Los niveles más altos ocurrían durante el sMOR. También describieron la presencia de dos proteínas de alto peso molecular (45 y 73 KDa) ausentes en el perfusado obtenido durante el snMOR y vigilia (Spanis et al, 1976). Posteriormente obtuvieron anticuerpos que tienen inmunoreactividad contra las proteínas del perfusado de la FRM obtenido durante la fase de sueño MOR. La administración de estos anticuerpos provocó una reducción significativa del sueño MOR, sin alterar al snMOR (Drucker-Colín et al, 1980).

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El LCR se encuentra en las cavidades ventriculares y en el espacio subaracnoideo en torno al cerebro y la médula espinal y está separado del cerebro por el epéndimo (**Fig. 3**),

El LCR es predominantemente secretado por el tejido coroidal localizado en los cuatro ventrículos. Sin embargo, de 10 a 30 % de la producción total de LCR es de origen extracoroide y esta formado por el flujo de líquido intersticial del parénquima cerebral hacia el ventrículo y el espacio subaracnoideo (Cserr 1984). El LCR participa en el mantenimiento de un ambiente extracelular constante para las neuronas y las células gliales, proporciona amortiguamiento mecánico para proteger al cerebro de impactos con el hueso, por esta acción de flotamiento producido por el LCR, reduce el peso efectivo del cerebro *in situ* a 50 gr (en humanos; revisado en Segal 2001).

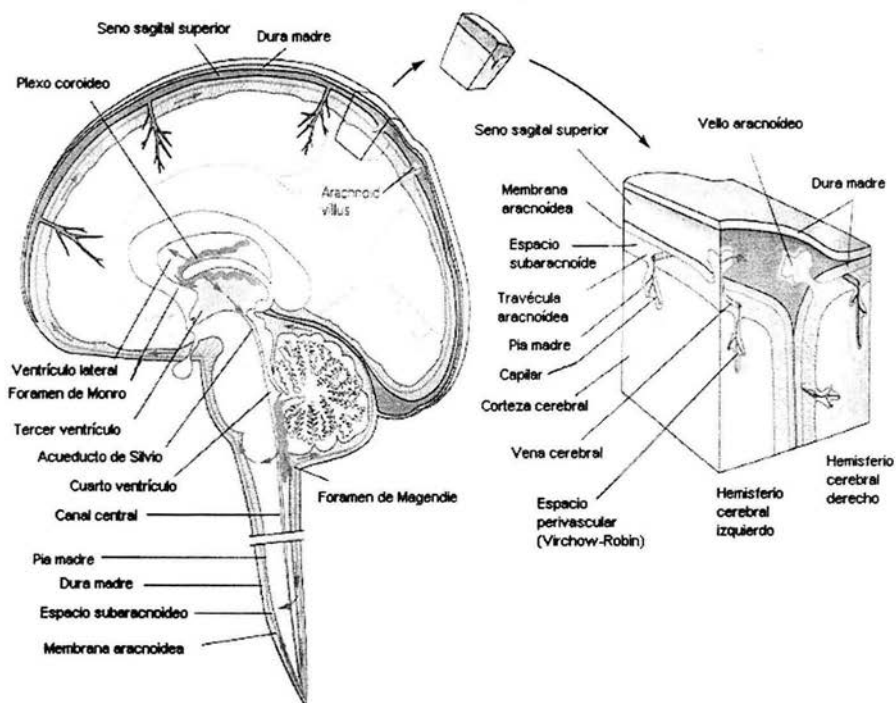


Fig. 3 Distribución del LCR en el SN y localización de los plexos coroideos, estructuras principales secretoras del LCR. Tomada de Laterra & Goldstein, 2000.

El LCR y el fluido extracelular del cerebro están en estado de equilibrio bajo circunstancias fisiológicas normales. La concentración de K^+ , Ca^{2+} bicarbonato y glucosa en el LCR son menores que en plasma sanguíneo, el LCR es más ácido. Estas diferencias son debido a la regulación de los constituyentes del LCR por transporte activo. El plasma sanguíneo y el LCR están en equilibrio osmótico, la concentración de proteínas en el LCR difiere importantemente con el plasma (Tabla 2)

Tabla 2. Concentración de diversos solutos (mM) en plasma y en LCR lumbar en humanos. (Segal 2001)

Sustancia	Plasma	LCR
Na ⁺	159.0	147.0
K ⁺	4.63	2.86
Mg ²⁺	1.61	2.23
Ca ²⁺	4.70	2.28
Cl ⁻	99.0	113.0
HCO ₃	26.8	23.3
Glucosa	4-6	0.8
Aminoácidos	2.62	0.72
Proteína mg/100ml	7000.0	42.0
Osmolaridad	289.0	289.0
pH	7.397	7.30
pCO ₂ (mmHg)	41.1	50.5

Las proteínas presentes en el LCR, están formadas principalmente por isoformas de albúmina e inmunoglobulinas. El origen de estas proteínas es en un 80% de plasma, mientras que el 20% restante son originados en el SNC.

La tasa de formación del LCR en humanos adultos es de 0.35 ml/min o cerca de 500ml/día, tal que el volumen total de LCR es renovado de tres a cuatro veces por día.

El plexo coroideo (PC) mediante un mecanismo de filtración capilar y de epitelio secretor mantiene la estabilidad química del LCR. Los capilares que atraviesan el PC son libremente permeables a solutos de plasma. Sin embargo, existe una barrera a nivel de las células epiteliales sobre las que se encuentra el PC, esta barrera es responsable de acarrear, mediante un transporte activo solutos presentes en el plasma. La capacidad secretoria del PC es bidireccional, participa en la secreción de LCR y en el transporte activo de los metabolitos hacia la sangre.

Por otra parte se ha propuesto que el LCR permite una acción de tipo endocrino dentro del Sistema nervioso central (SNC) (Rodríguez, 1976). Es decir, que algunos polipéptidos originados en el parénquima, viajen por el LCR y pueden

alcanzar sus células blanco, ya sea en el cerebro o en la médula espinal (Ferguson et al. 1991 y Mufson et al. 1999).

En el parénquima cerebral, el movimiento de difusión de los polipéptidos es limitado, especialmente para las proteínas de alto peso molecular. A pesar de esta limitación muchos péptidos o proteínas pueden no necesitar viajar largas distancias para ejercer su efecto biológico. La acción de polipéptidos originados en LCR frecuentemente es mediada por otros sistemas centrales neuroendocrinos (Chodobski & Szmydynger 2001).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad existe una lista numerosa de sustancias endógenas, involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia, sin embargo, su participación en los procesos bioquímicos de la regulación del sueño se desconoce. La caracterización parcial de proteínas, liberadas durante la fase de sMOR y que participan en su regulación, desde los estudios realizados por Drucker-Colín y colaboradores en la década de los 80's, prácticamente se ha ignorado. Las proteínas participan en numerosos procesos bioquímicos, como componentes estructurales de membrana, citoesqueleto, como factores reguladores de la replicación, transcripción, traducción. Así como enzimas que participan en la catálisis de un sustrato o como reguladores de la función de las enzimas. Dada la diversidad de funciones que llevan a cabo las proteínas consideramos que es muy importante profundizar en el estudio de las proteínas y su participación en la regulación del sueño.

Así, en este proyecto nos propusimos aislar y caracterizar proteínas que se expresen diferencialmente en las fases del ciclo sueño-vigilia y que participen en la modulación del sueño MOR.

Además decidimos utilizar LCR, ya que en el se pueden localizar algunos péptidos, derivados del parénquima cerebral y que potencialmente actúan en el SNC. Además dada la relativa baja concentración de proteínas en este fluido nos sería más sencillo identificar a las proteínas que varíen su expresión con la privación de sMOR.

Consideramos que la caracterización de estas proteínas es de suma importancia para profundizar en los mecanismos neurobioquímicos del sueño.

HIPÓTESIS

El sMOR está regulado por proteínas.

La privación de sMOR incrementará su concentración en el LCR.

OBJETIVOS

1. Analizar la presencia de proteínas en LCR de ratas, durante la privación selectiva de sMOR y durante el periodo de rebote.
2. Identificar aquellas proteínas que cambie su concentración con la privación.
3. Analizar la variación en la concentración de estas proteínas durante las 24 horas del día.
4. Obtener secuencias parciales

MÉTODOS

Material biológico. En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 200 y 250 g. Se mantuvieron a un ciclo constante de luz/oscuridad 12/12 (luz encendida a partir de las 8:00 A.M.), con agua y comida *ad libitum*.

Privación selectiva de sMOR

Las ratas fueron distribuidas en tres grupos: control (C) privado (P) y rebote (R). El grupo C, se conformó por ratas que permanecieron en una caja de acrílico con aserrín y durmieron *ad libitum*. Las ratas del grupo de P tuvieron un periodo de privación selectiva de sMOR durante 48 hr por el método de "florero invertido" o pedestal, este periodo inició a las 09:00 y terminó 48 horas después. El grupo de R, estuvo constituido por ratas privadas selectivamente de sMOR por el método de "florero invertido" durante 46 hr y después se les permitió dormir por un periodo de 2 hr, el cual consistió en dejarlas en reposo en cajas separadas. A este periodo lo llamamos "rebote". Posteriormente al periodo de privación o rebote de sueño se procedió a la extracción de LCR de la manera que se describe a continuación.

Florero invertido

Privamos selectivamente de sMOR a las ratas, por el método de "florero invertido" o pedestal (Mendelson, 1974) (Fig. 4)

Dicho método consistió en colocar a la rata en una caja de acrílico con una plataforma en el centro, con un diámetro de 6 cm, apoyada sobre una columna de acrílico y rodeada de agua con una profundidad de 1 cm; con la finalidad que la rata no presente sMOR. Este método se basa en que una de las características tónicas de esta fase de sueño es la atonía muscular y la rata cae al agua ocasionando el despertar.

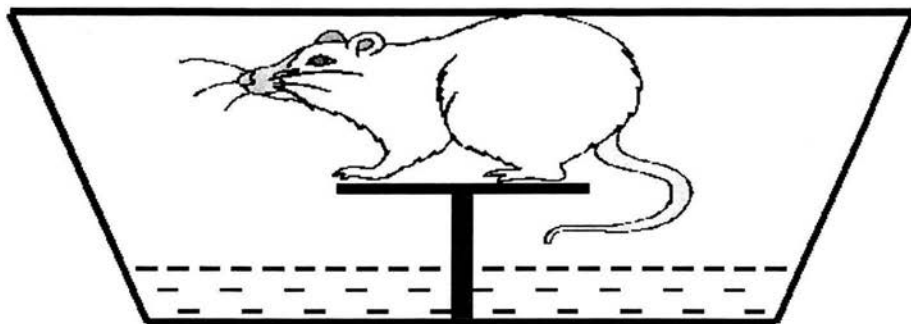


Fig. 4 Ilustración del método de privación selectiva de sMOR "Florero invertido"

Obtención de LCR. Las ratas de los grupos control y experimentales fueron anestesiadas con pentobarbital (30 mg/Kg administrado i.p.) y se les extrajo LCR por punción en la cisterna magna. El LCR fue centrifugado (centrífuga SORVALL SUPER T/21) durante 20 min. a 6 000 r.p.m. Posteriormente, el LCR fue guardado en congelación a -20°C hasta su uso.

A partir de mezclas de LCR obtenido de los sujetos en las distintas condiciones experimentales, se buscó la expresión diferencial de los posibles factores promotores de sueño de naturaleza proteica.

Variaciones diurnas.

Se obtuvo LCR de ratas control a diferentes horas del día 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas, el LCR que se obtuvo como se describió anteriormente.

Cuantificación proteica.

Se realizó la cuantificación proteica del LCR extraído de las ratas de los grupos C, P y R por el método de Lowry, el cual consiste en mezclar una alícuota del LCR con una solución alcalina que contiene sulfato cúprico (J.T. Baker), e

incubar a temperatura ambiente, posteriormente se le adiciona el reactivo de fenol (Folin ciocalteus SIGMA), se incuba nuevamente a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a una longitud de onda de 600 nm. Cabe mencionar que junto con las muestras de LCR se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina sérica de bovino (SIGMA). Los datos obtenidos fueron graficados y se realizó una regresión lineal simple.

Electroforesis.

El LCR sin tratamiento alguno, fue sometido a un ensayo electroforético en gel de poliacrilamida con las siguientes dimensiones 8.3 x 7.3 cm, adicionado con SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) al 17% en una cámara para electroforesis (Miniprotean III BIORAD) Se pusieron 15 µl de muestra de LCR, por carril. En todos los casos se utilizó un carril con proteínas marcadores de bajo peso molecular (In Vitro Gen). La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente de 100 Volts constante en el gel concentrador, mientras que en el gel separador se puso una corriente de 150 Volts constante durante 90 min.

Tinción de plata.

Posteriormente las proteínas en el gel, fueron fijadas con una solución de etanol y de ácido acético, el gel se incubó con metanol al 50% y se lavó con agua formaldehizada, se incubó con nitrato de plata (SIGMA) y se reveló con una solución de citrato de sodio y formaldehído. La reacción se detuvo con una solución de metanol y de ácido acético en agua.

Densitometría.

Se realizó un análisis densitométrico de los patrones electroforéticos de los tres grupos con el programa Quantity One (BIORAD), para identificar proteínas con expresión diferencial.

Obtención de secuencias parciales.

Una vez que se identificó una proteína con expresión diferencial, se procedió a realizar un ensayo electroforético adicional de LCR, de acuerdo a las instrucciones de WM Keck Foundation (<http://keck.med.yale.edu/prochem/stain.htm>). El LCR del grupo de privación selectiva de sMOR se empleó para este ensayo. La electroforesis se realizó en una cámara Hoefer Electrophoresis Unit (amersham pharmacia biotech) en un gel (18 x 16 cm) SDS-PAGE al 17%. Se utilizó un volumen de 1.2 ml de LCR equivalente a 271 microgramos de proteína total (aprox 130 picomoles de la proteína de 15 KDa). El LCR se liofilizó y se resuspendió en amortiguador para electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Coomassie (BIORAD), se cortó la banda proteica, previamente seleccionada (que presentaba variaciones en su concentración en los grupos de privación y rebote) y se mandó a secuenciar a la WH Keck Foundation, servicio que proporciona la Universidad de Yale en los Estados Unidos de América (U.S.A.). El proceso de secuenciación inició con una digestión de la banda proteica con tripsina. La tripsina es una enzima que realiza el corte en la cadena polipeptídica en el grupo carbono del residuo de aminoácido de Lys (K) y Arg (R) (Lehninger et al, 1993). Los péptidos obtenidos son sometidos a un campo magnético e identificados a través de su espectro de masas.

RESULTADOS

Concentración de proteínas totales en LCR.

El LCR extraído de ratas de los grupos control, privación y rebote fueron procesados como anteriormente se mencionó, y se procedió a la cuantificación de la concentración de proteínas por el método de Lowry. De este experimento se obtuvieron los siguientes resultados: La privación selectiva de sMOR induce un incremento en la concentración de proteínas totales presentes en el LCR, comparado con el grupo control, mientras que en el grupo de rebote hay una tendencia a disminuir la concentración de proteínas (figura 5).

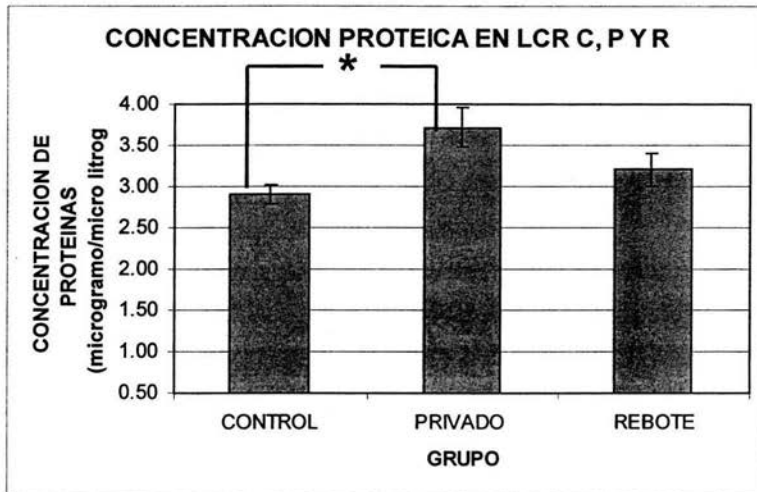


Fig. 5 Concentración de proteínas totales en LCR de ratas privadas selectivamente de sMOR por el método de "Florero invertido". Cada barra representa el promedio de proteínas totales \pm e.e. Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA de un solo factor y Tuckey HSD como post hoc. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa

Mezcla de LCR de C, P y R.

El ensayo electroforético en geles SDS-PAGE de mezclas de LCR de los diferentes grupos, se obtuvo el patrón de bandas proteicas (Fig. 6). Se puede apreciar que hay dos bandas proteicas de aproximadamente 12 y 15 Kda que incrementan su expresión tanto en privación como en rebote.

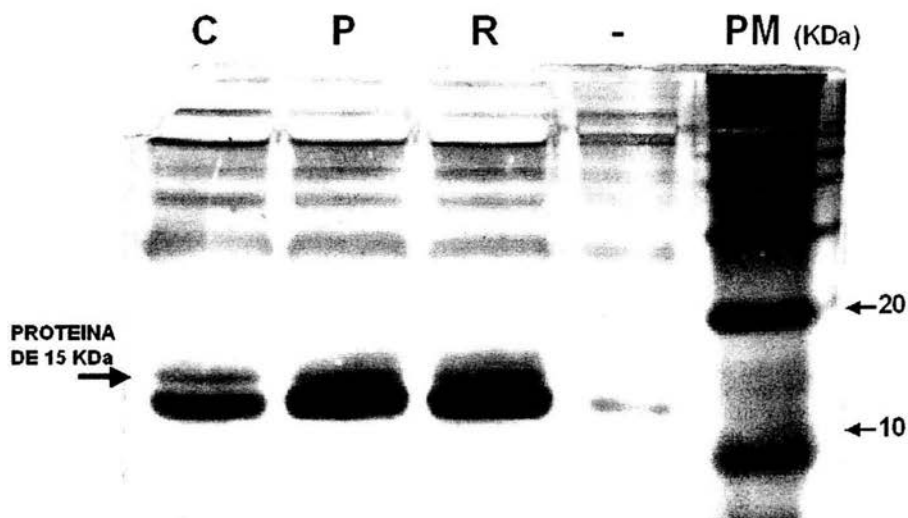


Fig. 6 Patrón electroforético de proteínas presentes en mezclas de LCR de ratas privadas selectivamente de sMOR. Nota: en el carril marcado con un guión (-) no se aplicó ninguna muestra, es el resultado de que del carril R se salió muestra que entro al carril -.

Análisis densitométrico de bandas proteicas de LCR.

Una vez, obtenido el patrón de bandas proteicas en mezclas de LCR de los diferentes grupos con $n = 15$, se obtuvo el patrón electroforético de LCR de manera individual (Fig. 6) Posteriormente se realizó la electroforesis de LCR de los distintos grupos obtenido de cada rata, sin mezclarlo y se obtuvo el patrón de proteínas (FIG. 7) y se analizaron las bandas proteicas marcadas con las letras A, B, C, D y E.

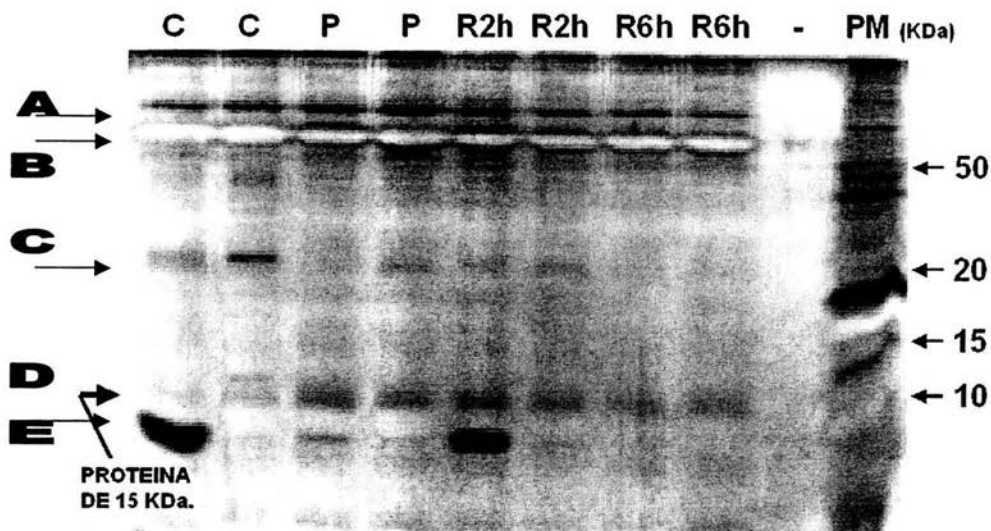


Fig. 7 Patrón electroforético de proteínas presentes en LCR individual de ratas privadas selectivamente de sMOR con 2 y 6 horas de rebote de sMOR.

Los datos obtenidos del análisis densitométrico de cada una de las bandas en las diferentes condiciones experimentales fueron graficados considerando los valores del grupo control como el 100% (**figuras. 8 a 12**) y se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba como post hoc. En todos los casos se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

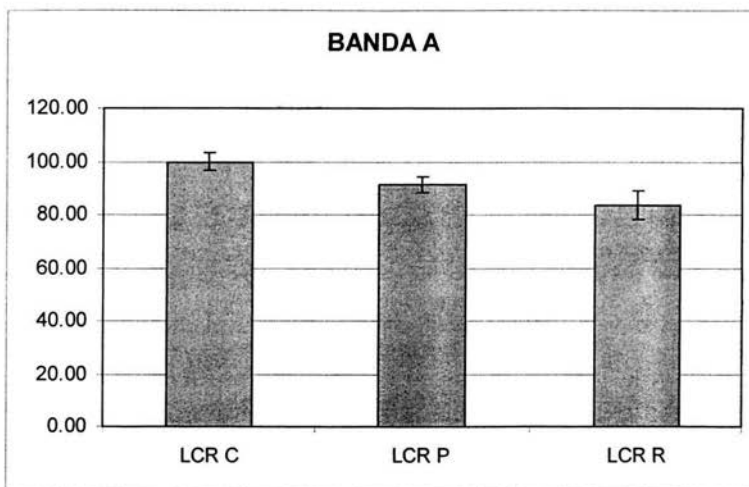


Fig. 8 Análisis densitométrico de la banda proteica A. Cada barra representa el promedio \pm ee del porcentaje de unidades de densitometría. Se consideraron los valores del grupo control como 100 %.

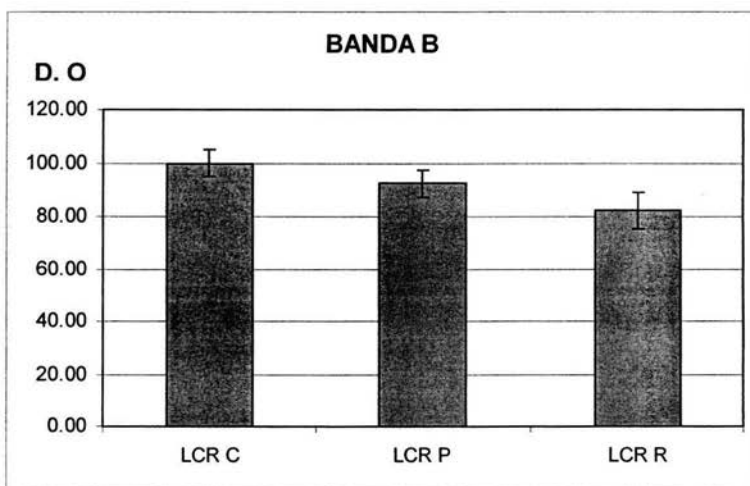


Fig. 9 Análisis densitométrico de la banda proteica B. Cada barra representa el promedio \pm ee del porcentaje de unidades de densitometría. Se consideraron los valores del grupo control como 100 %.

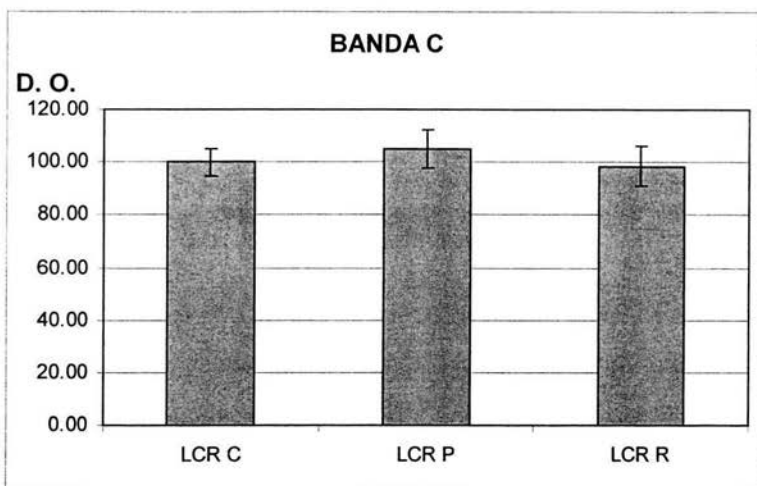


Fig. 10 Análisis densitométrico de la banda proteica C. Cada barra representa el promedio \pm ee del porcentaje de unidades de densitometría. Se consideraron los valores del grupo control como 100 %.

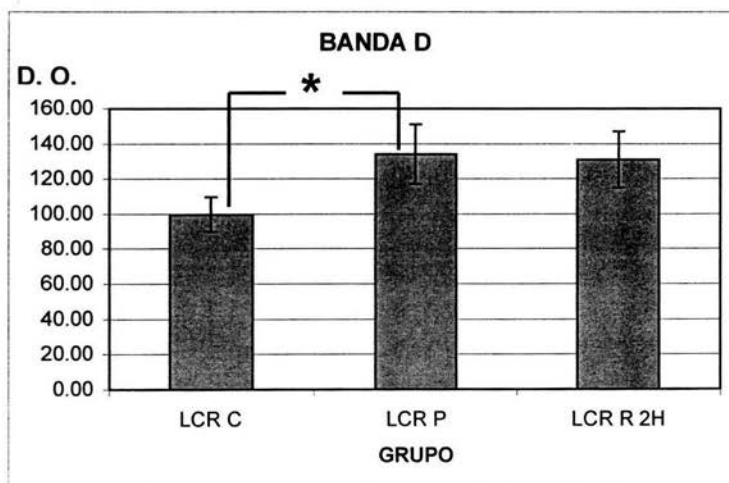


Fig. 11 Análisis densitométrico de la banda proteica D. Cada barra representa el promedio \pm ee del porcentaje de unidades de densitometría. Se consideraron los valores del grupo control como 100 %. * $p > 0.05$

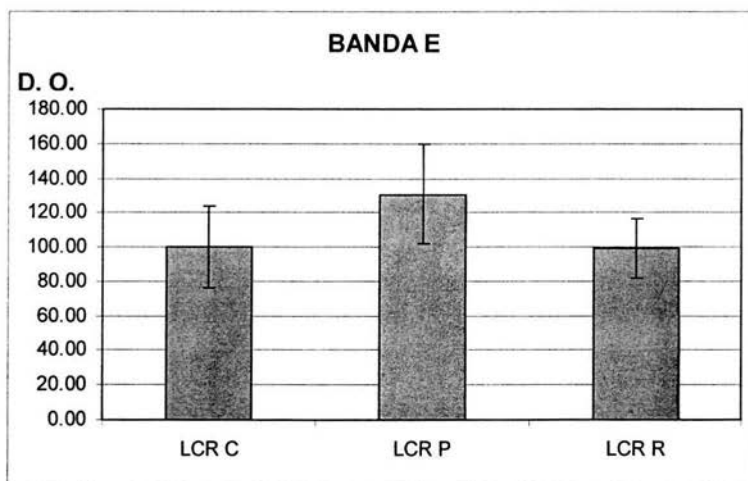


Fig. 12 Análisis densitométrico de la banda proteica E. Cada barra representa el promedio \pm ee del porcentaje de unidades de densitometría. Se consideraron los valores del grupo control como 100 %.

Las bandas proteicas A, B, C (**figuras. 8, 9 y 10**) no presentan variaciones significativas en su concentración en los diferentes grupos experimentales, por lo que estas bandas proteicas ya no se siguieron analizando en trabajos posteriores. La concentración de la banda proteica D (aproximadamente 15 KDa) (**Fig. 11**) se incrementa con la privación selectiva de sMOR, mientras que con el periodo de rebote tiende a disminuir. Es decir, presenta un comportamiento esperado en un factor inductor de sueño; esta banda proteica se continuó analizando. La banda proteica E (**Fig. 12**) presenta un comportamiento similar al de la banda D, sin embargo las diferencias entre los 3 grupos no son significativas ya que la dispersión es muy alta, por lo que ya no se siguió analizando.

Incremento del periodo de rebote de sMOR.

Observando que con un periodo de rebote de 2 horas no disminuía de manera importante la concentración de la banda proteica de 15 KDa, se procedió a prolongar este periodo durante 6 horas (Fig. 13).

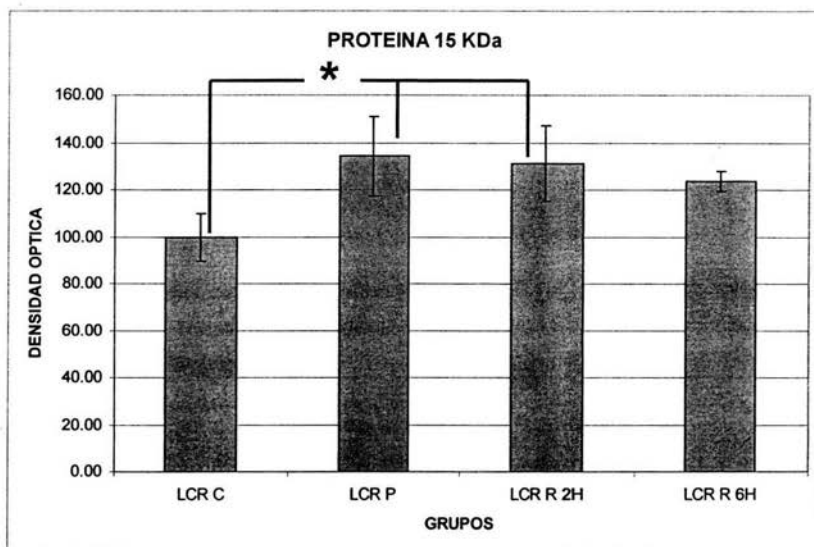


Fig. 13 Análisis densitométrico de la banda D (15 KDa) con 2 y 6 hr de rebote. Cada barra representa el promedio \pm ee del porcentaje de unidades de densitometría. Se consideraron los valores del grupo control como 100 %. * $p < 0.05$

En este experimento se observó que la concentración de la banda D se incrementa de manera significativa con la privación selectiva de sMOR y se mantiene elevada a las 2 horas de rebote. Con 6 horas de rebote hay una tendencia a disminuir; si bien no alcanza a ser significativamente diferente del grupo de privación, tampoco lo es del grupo control

Variación diurna de la proteína de 15 KDa.

Además nos interesaba analizar si la concentración de la banda de 15 KDa se modificaba con relación al fotoperiodo y al ciclo sueño-vigila espontáneo. Se exploró la variación de la concentración de esta proteína durante las 24 horas del día, para lo cual se extrajo LCR de ratas control a diferentes horas del día y se realizó un ensayo electroforético (Fig. 14).

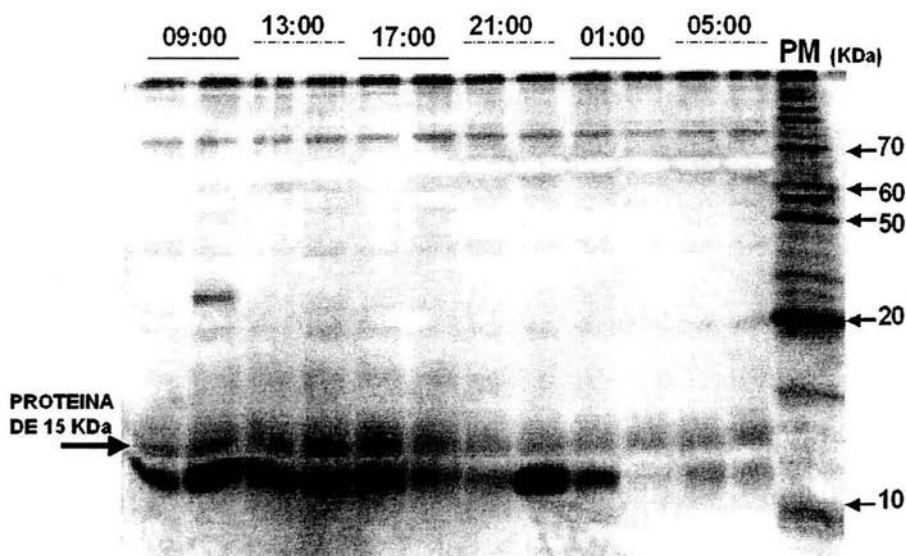


Fig. 14 Patrón electroforético del LCR de ratas privadas selectivamente de SMOR. Obtenido cada 4 horas durante las 24 horas del día.

La variación diurna de la concentración de esta proteína (Fig. 15) presenta un patrón cíclico y hay diferencias significativas en los grupos de las 13:00 y 17:00 hrs., comparados con el grupo de la 01:00 hr.

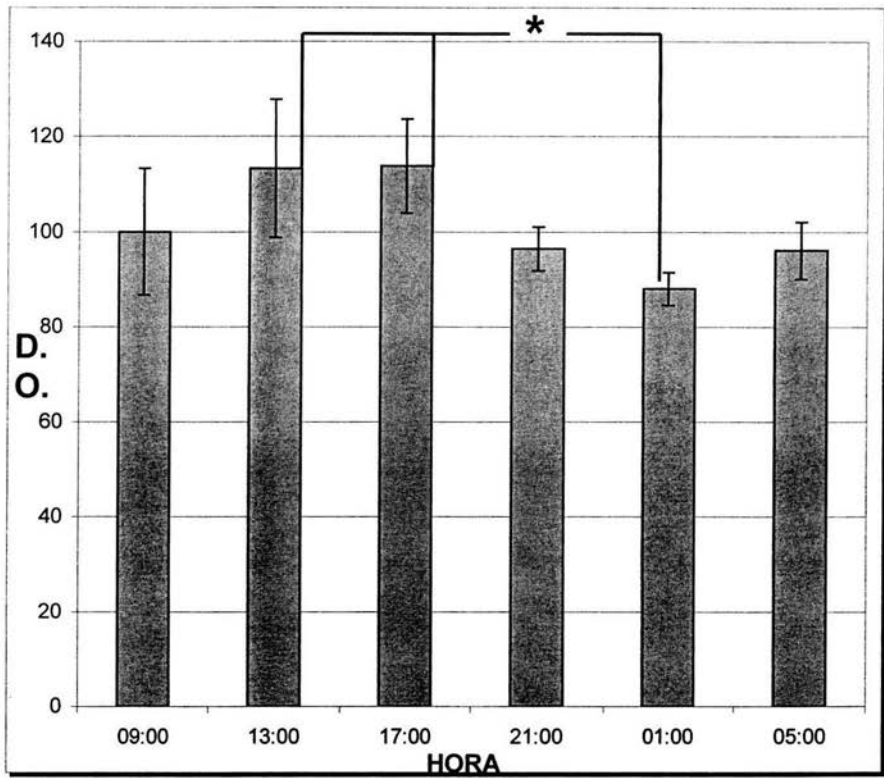


Fig. 15 Análisis densitométrico de la proteína de aproximadamente 15 KDa durante las 24 horas del día. Cada barra representa el promedio \pm ee del porcentaje de unidades de densitometría. Se consideraron los valores del grupo de las 09:00 horas como 100 %. * $p < 0.5$

Espectrometría de masas.

La proteína de 15 KDa, que se incrementa con la privación selectiva de SMOR, se envió a secuenciar a la Universidad de Yale, U.S.A. Los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina, fueron sometidos a un análisis de espectrometría de masas y presentan un espectro (Fig. 16) en el cual destacan cuatro picos de población de péptidos que corresponden uno a tripsina y tres a cistatina C (CC).

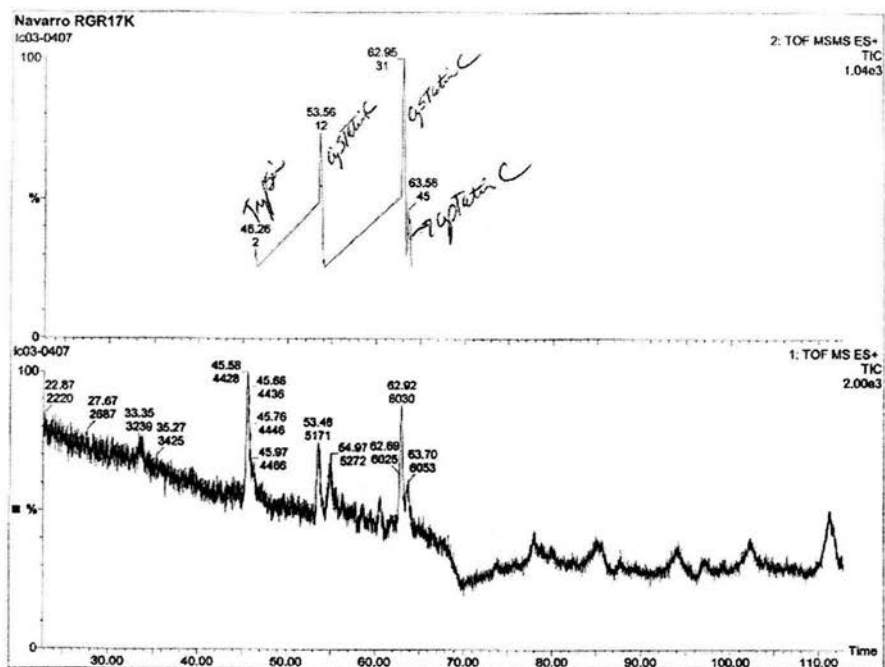


Fig. 16 Espectro de masas obtenido del análisis de la banda proteica D (aproximadamente 15 KDa).

Tabla de resultados

De este espectro se obtuvo la siguiente secuencia de los tres péptidos **LLGAPQEADASEEGVQR**, **ALDFAVSEYNKGSNDAYHSR** y **ALDFAVSEYNK** (Fig. 17), cada letra corresponde a la abreviación del nombre del residuo aminoácido de la proteína digerida y secuenciada. Comparando la secuencia de estos péptidos con las secuencias de proteínas que se encuentran en bases de datos, la proteína identificada con expresión diferencial en el LCR del grupo de privación y rebote, corresponde a la Cistatina C. (Fig. 17)

SUMMARY OF MS/MS SPECTRA						
Protein	MS/MS Spectra #	M	Mascot Match?	Protein ID	Sequence	Comments
RGR17K LC03-0407	0200002	1044.55	No	trypsin		enzyme used for digestion
	0200012	1768.91	Yes	cystatin C precursor rat	LLGAPQEADASEEGVQR	
	0200031	2243.06	Yes	cystatin C various including rat	ALDFAVSEYNKGSNDAYHSR	
	0200045	1255.59	Yes	cystatin C various including rat	ALDFAVSEYNK	
PROTEIN IDENTIFIED: SDS PAGE MW = 17K				cystatin C 15K in size		3 mascot matches

Fig. 17 Resumen del espectro de masas obtenido del análisis de la banda proteica D.

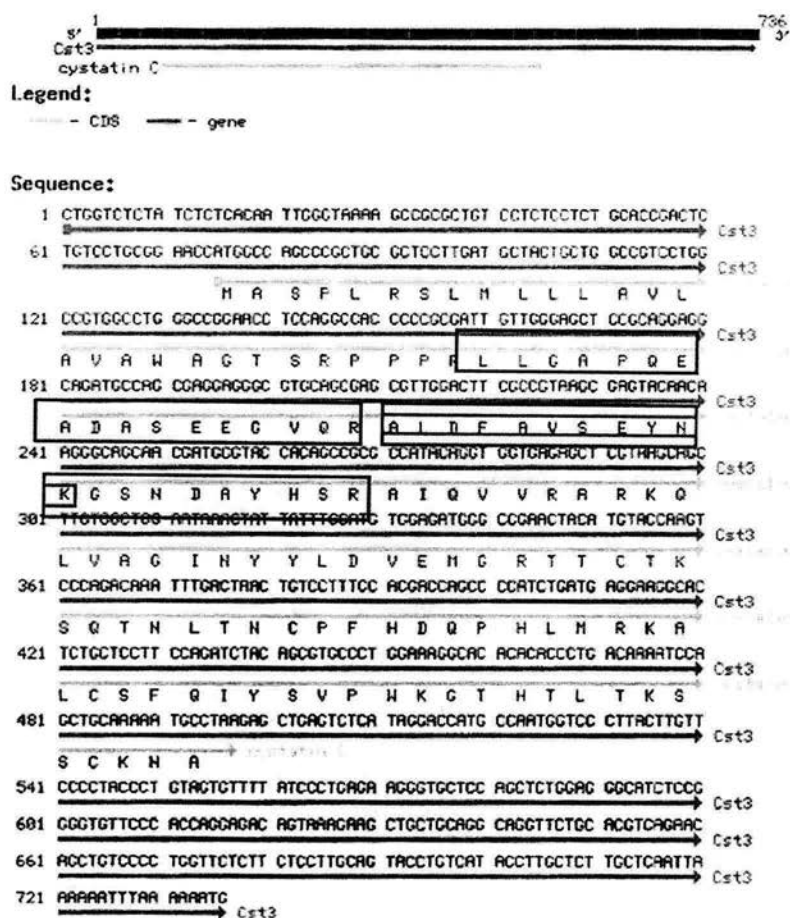


Fig. 18 Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la proteína Cistatina C de rata y la localización de los péptidos obtenidos del espectro de masas de la banda proteica D.

DISCUSIÓN

A la fecha se conocen diferentes moléculas como factores inductores de sueño. En la mayoría de ellos, su papel en la inducción o modulación del sueño se considera como una función alternativa, ya que inicialmente fueron identificados como participantes en otros procesos.

Como se originan estos factores inductores de sueño y como participan de manera orquestada para inducir el sueño, no se conoce en la actualidad, sin embargo es importante profundizar en la identificación de los procesos bioquímicos y las moléculas que están participando en la modulación del sueño y en particular del sMOR, ya que se ha postulado que durante esta fase de sueño se llevan a cabo las ensoñaciones y la consolidación de la memoria.

En este trabajo, se analizó el patrón electroforético del LCR de ratas control, con privación selectiva de sMOR y privación selectiva de sMOR más rebote, observándose que existen diferencias significativas en la concentración de proteínas totales entre el grupo de privación respecto al grupo control. Por lo tanto proponemos que en el LCR existen proteínas que se están comportando como factores inductores de sueño, ya que con la privación selectiva de sMOR se incrementa la concentración de proteínas totales, mientras que con el rebote de sueño (2 hr) existe una tendencia a disminuir la concentración de proteínas, sin que llegue a existir diferencias significativas entre el grupo de rebote respecto al grupo control y de privación.

Analizando el patrón electroforético de proteínas presentes en el LCR de ratas de los grupos control, privado y rebote LCR, se observó que se incrementa la concentración de una banda proteica de 15 KDa aproximadamente, en los grupos de privación y rebote (2 hr.) respecto al grupo control. Si el periodo de rebote se incrementa a 6 horas hay una tendencia a disminuir. En este sentido se comporta como un factor inductor de sueño, de acuerdo con la teoría de Pierón, en la cual él postula, que durante vigilia se acumula una sustancia en el LCR que induce

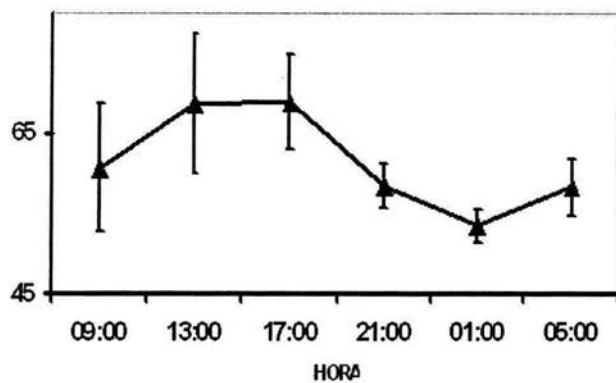
sueño, a la cual denominó hipnotoxina (Revisado en: Prospéro-García et al 1997); así mismo Borbély y Tobler (1989) propusieron que un factor inductor de sueño presentaría variaciones en su síntesis o recambio relacionados con los estados de vigilancia. Un ejemplo claro de este comportamiento lo constituye la adenosina. Porka-Heiskanen et al (1997) reportaron que la adenosina se incrementa en el cerebro basal anterior de la rata en la vigilia prolongada y tiende a disminuir con el rebote.

Considerando que las ratas son animales policíclicos nocturnos. Es decir que presentan varios periodos de vigilia-sueño durante las 24 horas del día y que cursan por el mayor periodo de sueño durante la fase de luz, decidimos explorar la expresión de esta proteína en LCR durante las 24 horas del día. La proteína presenta una expresión cíclica, existiendo una mayor concentración a las 13:00 y 17:00 hrs, mientras que presenta una menor concentración a la 01:00 hr. Este comportamiento coincide con el periodo que la rata pasa mas tiempo en sMOR (Méndez-Díaz 1999), mientras que los valores menores en concentración ocurren cuando la rata cursa menor tiempo en sMOR (**Fig. 19**), lo cual apoya que esta proteína posiblemente este participando en la regulación o mantenimiento del sMOR, posiblemente vía la inhibición de las enzimas cisteinaproteasas, impidiendo que se lleve a cabo la degradación del conjunto de proteínas que estén participando en la regulación del sMOR.

Podemos apreciar, que la concentración de esta proteína está influenciada tanto por el ciclo sueño vigilia como por el fotoperiodo. Cuando incrementamos, el periodo de rebote a 6 hr, aunque observamos que la concentración disminuye, aunque no alcanza a ser significativamente diferente del grupo de privación, posiblemente porque este influyendo el fotoperiodo, ya que a esta hora (13:00) es cuando hay naturalmente una mayor concentración de dicha proteína. En este sentido vale la pena recordar que se ha planteado que el sueño, al igual que otras variables fisiológicas presenta un comportamiento circádico y un componente homeostático (Borbély 1982). El componente homeostático estaría dado por la

presión ejercida por la privación selectiva de sMOR, mientras que el circádico por la hora del día.

PROTEÍNA 15 KDa



SUEÑO MOR

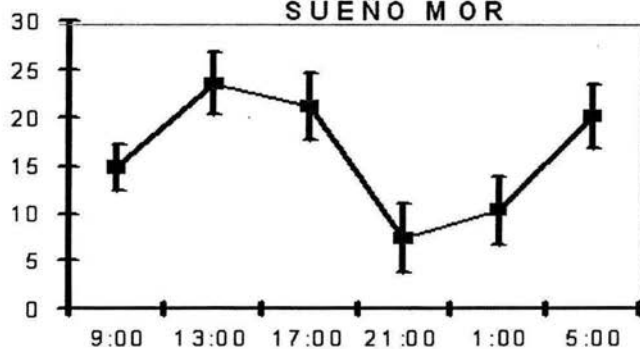


Fig. 19 Variación de la concentración de la banda proteica D y la prevalencia del sMOR durante las 24 horas del día

La proteína de 15 KDa se mandó a secuenciar y el resultado obtenido corresponde a una proteína denominada Cistatina C (CC). CC contiene dos enlaces disulfuro no glicosilados, actúa intracelular y extracelularmente. La CC de humano, contiene un péptido señal de 20 aminoácidos, lo cual sugiere que CC tiene una actividad extracelular. La CC se encuentra ampliamente distribuida en fluidos biológicos, hallándose en concentraciones mayores en: líquido seminal y LCR, y en concentraciones menores en lágrimas, líquido amniótico, saliva, leche y plasma. Además la CC se ha localizado en el PC, sitio secretor de LCR y en parénquima cerebral. La CC es inhibidora reversible de las catepsinas B, H, K, L y S, enzimas cisteína-proteasas (revisado en Gronka et al, 2001; Chapman et al 1997). La amplia distribución de la CC y su potencia inhibidora sugiere que es la principal inhibidora de las cisteína-proteasas.

Con relación a la participación de CC en el sueño, vale la pena señalar que en la literatura no hay datos al respecto. Con relación a las catepsinas, solo se encuentran dos reportes que señalan que el péptido inductor de sueño delta (DSIP) puede alterar la actividad de algunas catepsinas en la sangre y en el cerebro de la rata (Shmal'ko & Mikhaleva, 1988; Mendzheritskii et al, 1992)

Con relación a la participación de las proteínas en el sueño, en particular en el sMOR, trabajos realizados en la década de los 70's, por el grupo de Drucker Colín, señalan que la secreción de proteínas de los perfusados obtenidos durante el sMOR, tienen mayor concentración de proteínas respecto a los perfusados obtenidos durante la vigilia o el snMOR y que la aplicación de inhibidores de síntesis de proteínas ocasiona la disminución del sMOR

En cuanto, a la participación de peptidasas en la regulación del sueño, sólo hay un trabajo realizado por el grupo de Jouvet (Sastre et al, 1983) en el que administran bacitracina, (fármaco inhibidor de peptidasas) a gatos y observan incremento en el sMOR.

Todos estos datos sugieren que la participación de las proteínas en la regulación del sMOR es muy importante. Con la realización de este trabajo se abre otra perspectiva del estudio de la participación de las proteínas en la regulación del sMOR, la participación de proteasas inespecíficas (bacitracina) está documentado, con la realización de este trabajo se abren dos perspectivas en el estudio del sueño. Una a través de la participación de la Cistatina C en el sueño, ya que esta proteína inhibe reversiblemente a las catepsinas (cisteína-proteasas), potencialmente encargadas de degradar algunas proteínas que pudieran estar regulando o promoviendo el sMOR. La otra perspectiva es la participación de proteasas específicas como las catepsinas y su participación en la degradación de proteínas. Cabe mencionar que la participación de ambas moléculas en la regulación del sueño no se ha documentado y con la realización de este trabajo se está abriendo un nuevo enfoque en el estudio de los procesos bioquímicos que subyacen a la presencia del ciclo vigilia-sueño y en particular al sueño sMOR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antrobus J, et al. Basics of Sleep Behavior. Sleep Research Society. UCLA & SRS, 1993.

Basheer R, Mgnier M, McCarley RW and Shiromani PJ. (1998) REM sleep deprivation increase the levels of tyrosine hydroxylase and norhepinefrine transporter mRNA in the locus coeruleus. *Molecular Brain Research*. 57 pp. 235-240).

Benedito MAC and Camarín R. (2001) Rapid eye movement sleep deprivation induces an increase in acetylcholinesterase activity in discrete rat brain regions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34, 103-109

Borbély AA and Tobler I (1989). Endogenous sleep-promoting substances and Sleep regulation. *Physiol Rev*. 69: 605-670.

Borbély AA; Achermann P; Geering B and Tobler I. (1998) *Proceses Underlying Sleep Regulation* Watson SJ. (Ed.) *Psychopharmacology: The fourth Generation of Progress*. Versión No. 2, CD ROM. ACNP Inc., Lippincott-Raven, New York.

Cserr 1984 en Chodobski A. and Szmydynger CH. (2001) Choroid Plexus: Target for Polypeptides and Site of Their Synthesis. *Microscopy Res and Tech*. 52:65-82

Chodobski A. and Szmydynger CH. (2001) Choroid Plexus: Target for Polypeptides and Site of Their Synthesis. *Microscopy Res and Tech*. 52:65-82

Datta S. (2001) Evidence that REM sleep is controled by the activation of brain stem pedunculo pontine tegmental Kainate receptor. *J. Neurophysiol Apr*; 87 (4):1790-8

Datta S, Spoley EE, Mavanji VK and Patterson EH. (2002) A novel role of pedunculo pontine tegmental kainite receptors: A mechanism of rapid eye movement sleep generation in the rat. *Neuroscience Vol*. 114 (1): 157-64.

Deurveilher S and Hennevin E (2001) Lesions of the pedunculo pontine tegmental nucleus reduce paradoxical sleep (PS) propensity: evidence from a short-term PS deprivation study in rats. *European Journal of Neuroscience*, Vol 13, pp 1963-1976)

Drucker-Colín R. Gutiérrez M. C and Bernal-Pedraza J. G. (1980) Polypeptide regulation of REM sleep. *Front. Horm. Res*. 6:138-155

Drucker-Colín R. Spanis C. W, Cotman C. W and McGaugh J. L. (1975) Changes in protein levels in perfusates of freely moving cats: Relation to behavioural state. *Science vol* 187

Drucker-Colin R and Merchant-Nancy H. Evolution of Concepts of Mechanisms of Sleep En: Pharmacology of Sleep (ed) Kales A. Ed. Springer. Berlin Germany 1995.

Ferguson et al. 1991; en Chodobski A. and Szmydynger CH. (2001) Choroid Plexus: Target for Polypeptides and Site of Their Synthesis. Microscopy Res and Tech. 52:65-82

Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczek W, Wieczerek E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Jaskólski M, and Grubb A. (2001) Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. Acta Biochimica Polonica. Vol 48 (1): 1-20

Chapman HA, Riese RJ and Shi GP. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. Annu. Rev. Physiol. 59:63-88

Hugs M and Mignot E (2001) Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. BioEssays 23:397-408

Jones BE (2000) Basic Mechanisms of sleep-wake states en Kryeger M. H, Roth T and Dement W. C (2000). (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine. Third edition Ed. W. B. SAUNDERS COMPANY Philadelphia U.S.A.

Jouvet M (1994) Paradoxical sleep mechanism. Sleep Dec. 17 (8 Suppl): s77-83).

Kryeger M. H, Roth T and Dement W. C (2000). (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine. Third edition Ed. W. B. SAUNDERS COMPANY Philadelphia U.S.A.

Lattera J & Goldstein GW. Ventricular organization of cerebrospinal fluid: blood brain barrier, brain edema and hydrocephalus. Appendix B. En: Kandel RE, Schwartz HJ and Jessell MT (2000) Principles of Neural Science. Ed. McGraw-Hill.

Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM. 1993 Principles of Biochemistry Ed. Worth Publishers 33 Irving Place New York NY).

Leonard TO & Lydic R (1999) in Rapid eye movement sleep (eds Mallick, BN & Inoue S Marcel Dekker New York en Pace-Schott EF and Hobson JA (2002) The neurobiology of sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks Neuroscience Vol 3 August. Pag. 561-605.

Lin et al (1999) en Hugs M and Mignot E (2001) Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. BioEssays 23:397-408

Majumdar S and Mallick B.N (2003) Increased levels of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in locus coeruleus neurons after rapid eye movement sleep deprivation in rats. Neuroscience Letters 338 pp. 193-196)

Mallick BN, Kaur S and Saxena RN (2001) Interaction between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the Locus Coeruleus for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience* Vol. 104, No. 2, pp. 467-485)

Maloney KJ, Mainville L and Jones BE (2000) c-Fos Expresión in GABAergic, Serotonergic and Other Neurons of the Pontomedullary Reticular Formation and Raphe after Paradoxical Sleep Deprivation and Recovery. *The Journal of Neuroscience*, June 15, 20 (12): 4669-4679.

Méndez-Díaz M, Jimenez Anguiano A, Navarro L and Prospéro García O. (1999) Effects of diurnal variations of cortistatin sleep and memory. *Society for Neuroscience 29 st Annual Meeting*

Mendzheritskii AM, Lysenko AV, Mikhaleva II (1992) Influence of delta-sleep-inducing peptide on the activity of proteolytic enzymes in the rat brain under hypokinesia. *Ukr Biokhim Zh.* 64(5):37-42.

Monti JM and Monti D (2000) Role of dorsal raphe nucleus serotonin 5-HT_{1A} receptor in the regulation of REM sleep. *Life Sciences*, Vol. 66, No. 21, pp 1999-2012)

Mufson et al. 1999 en Chodobski A. and Szmydynger CH. (2001) Choroid Plexus: Target for Polypeptides and Site of Their Synthesis. *Microscopy Res and Tech.* 52:65-82

Navarro L, Murillo-Rodríguez E, García-Sierra Y, Guzmán Marín R, Martínez González D; Cisneros M y Martínez-Vargas M. (2000) La neuroquímica del sueño. En: *Tópicos en Psiquiatría Biológica* Editores Carlos Torner Aguilar y Javier Velázquez Moctezuma (2000) *Sociedad Mexicana de Psiquiatría Biológica Texto Conmemorativo XXX Aniversario*)

Ocampo-Garcés; Molina E; Rodríguez A and Vivaldi EA. (2000) Homeostasis of REM Sleep After Total and Selective Sleep Deprivation in the Rat. *J. Neurophysiology* Nov; 84 (5) 2699-702

Pace-Schott EF and Hobson JA (2002) The neurobiology of sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks *Neuroscience* Vol 3 August. Pag. 561-605).

Pace-Schott & Hobson (2002). *Basic Mechanisms of Sleep: New Evidence on the Neuroanatomy and Neuromodulation of the nREM-REM Cycle* en Davis KL, Charney D, Coyle JT and Nemeroff Ch. Editors *Neuropsychopharmacology The Fifth Generation of Progress* An official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology Ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Porka-Heiskanen T, Streckere RE, Thakkar M, Bjorkum AA; Greene RW and McCarley RW. (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*. May 23; 276 (5316):1265-8.

Prospero-García O and Drucker-Colín R (1996). Control neural del ciclo vigilia-sueño: mecanismos neurofisiológicos y neuroquímicos. Factores inductores de sueño. En: Ramos Platón MJ (ed) Sueño y procesos cognitivos Ed. SÍNTESIS Madrid.

Prospero-García O et al (1997). De la hipnotoxina a los neuropeptidos: a casi un siglo de progreso. En: Velázquez-Moctezuma J (ed) Medicina del Sueño: Aspectos Básicos y Clínicos. UAM, Soc. Mex. Sueño. México D.F.

Prospéro-García O; Jiménez Anguiano A; Navaro L; Murillo Rodríguez E, Sánchez Alavez M; Mendez Diaz M; Díaz Ruiz O, Drucker Colín R; Palomero Rivero M y Martínez González D. (2000) Neuroquímica del Sueño. En Trastornos del dormir (Eds) Valencia Flores M, Salín Pascual R y Pérez Padilla J. R.

Rechtschaffen A; Bergmann BM; Everson CA; Kushida CA and Guilleland MA. (1989) Sleep Deprivation in the Rat: X. Integration and Discussion of the findings. *Sleep* 12 (1): 68-87.

Rodriguez E.M. (1976) The Cerebrospinal fluid as a Pathway in Neuroendocrine Integration. *J. Endocr* 71,407-443.

Saper CB, Chou TC and Scammell TE (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *TRENDS in Neurosciences* Vol. 24 No. 12 pp. 726-731

Sastre JP, Sallanon M, Buda C, Jouvet M. (1983) Bacitracin, a peptidase inhibitor, increases paradoxical sep in the cat C R *Seances Acad Sci III*. 296 (20): 965-8

Segal MB. (2001) Homeostasis of the CNS. Transport of nutrient across the choroid plexus. *Microscopy Research and Technique* 52:38-48

Shmal'ko IuP & Mikhaleva II. (1998) Antimetastatic effect of the delta-sleep peptide during stress in mice with Lewis'lung carcinoma *Eksp Onkol* 10(2):57-60

Siegel & Rogawski, 1998 en Jouvet M (1994) Paradoxical sleep mechanism. *Sleep* Dec. 17 (8 Suppl): s77-83).

Smith 1991 revisado en Jones BE (2000) Basic Mechanisms of sleep-wake states en Kryeger M. H, Roth T and Dement W. C (2000). (eds). Principles and Practice of Sleep Medicine. Third edition Ed. W. B. SAUNDERS COMPANY Philadelphia U.S.A.

Spanis. C. W, Gutiérrez M. C and Drucker-Colín R. R. (1976). Neurohumoral correlates of sleep: further biochemical and physiological characterization of sleep perfusates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5: 165-173.

Timo-Iraria et al 1970 en Yoshimoto. M; Higuchi H; Kamata M; Yoshida K; Shimizu T and Hishikawa Y. (1999) The effects of benzodiazepine (triazolam), cyclopyrrolone (zopiclone) and imidazopyridine (zolpidem) hypnotics on the frequency of hippocampal theta activity and sleep structure in rats. *European Neuropsychopharmacology* 9, 29-35)

Toppila J, Niittymäki P, Porkka-Heiskanen and Stenberg D. (2000) Intracerebroventricular and locus coeruleus microinjections of somatostatin antagonist decrease REM sleep in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 66, No. 4, pp. 721-727)

Tortorolo P. (2002) Hipocretinas: neuropéptidos que regulan la actividad motora y el sueño. *Actas de Fisiología*, 8:71-88)

Yoshimoto. M; Higuchi H; Kamata M; Yoshida K; Shimizu T and Hishikawa Y. (1999) The effects of benzodiazepine (triazolam), cyclopyrrolone (zopiclone) and imidazopyridine (zolpidem) hypnotics on the frequency of hippocampal theta activity and sleep structure in rats. *European Neuropsychopharmacology* 9, 29-35)