

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“Sueño y Supervivencia Neuronal”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Presenta:

**Corinne Jennifer Montes Rodríguez**

Tutor principal:

**Dr. Oscar Próspero García**

Co-tutores:

**Dr. Julio Eduardo Moran Andrade  
Dr. Armando Isibasi Araujo**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS:

A mi familia, como siempre agradezco su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, como saben este trabajo es resultado de muchos años de empeño y ausencias; es a ustedes a los que dedico esta obra.

A mis padres Ofelia Rodríguez Martínez y Simón Montes Zarate que me han enseñado que luchar por los sueños y poner el corazón en cada hacer son las cosas que le dan significado a la vida. Gracias por ser grandes personas y no dejarme caer nunca.

A mi hermano Simmon Emmanuel Montes Rodríguez, gracias porque siempre me haces reír y por tu aliento. Siempre agradezco a la vida tu existencia y tus enseñanzas. Pienso que por personas como tú la humanidad tiene esperanza.

A mi amado Emiliano Urteaga Urías, esposo y camarada. Sabes que esta obra no hubiera sido posible sin tu escucha y sin las largas discusiones sobre el sueño y sus funciones. Agradezco tu apoyo en cada una de mis decisiones y tu presencia solidaria ante los embates de la vida. Gracias por permitirme compartir la vida contigo, por tu sensibilidad y amor. Salud por el éxito de uno de nuestros tantos proyectos.

A mis cuatro abuelas: Meche, Neto, Libe y Filo. Gracias por todas sus enseñanzas.

A las familias Urteaga y Urías agradezco su ánimo y buen humor. A Brenda, Maritza, Enedina, Casiana y Patricia. Augusto siempre te recordaremos con mucho, mucho cariño.

A mí querida familia extensa: Patricia Cruz, Luisa y Rómulo Pardo, Pavel Rueda, Edgar Soria, Liliana López, Juan Manuel y Fabiola Sánchez, Sandra, Ángel Lozano. Gracias por su impagable amistad y por todos nuestros momentos gratos, siempre recargan la energía de mi ser. Sus consejos siempre guían mi vida.

A nuestra máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, es un privilegio tener acceso a espacios de investigación y de formación académica que compiten a nivel mundial como los que nuestra universidad y su gente brindan al pueblo de México.

A los integrantes del Grupo de Neurociencias de la Facultad de Medicina agradezco su apoyo y enseñanzas, especialmente a Marina Cisneros. Marina, sin tu trabajo el laboratorio no podría caminar.

A mis queridos Pavel Rueda Orozco y a Edgar Soria Gómez por su amor a la ciencia, su incansable trabajo y sus grandes ideas. Compartir esa pasión por descubrir al cerebro y trabajar para que este país sea mejor, además de su inmejorable amistad, son las cosas que me permitieron terminar este trabajo a pesar del duro camino, sin ustedes nada hubiera sido igual. Éxito camaradas.

Agradezco a los revisores de este trabajo sus sugerencias y críticas:

Dr. René Raúl Drucker Colín,

Dr. Oscar Próspero García

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Dra. Selva Rivas Arancibia

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

A mi comité tutorial formado por el Dr. Oscar Próspero García, el Dr. Julio Morán Andrade y el Dr. Armando Isibasi Araujo, agradezco su guía en mi formación, sus críticas y sugerencias que siempre enriquecieron mi trabajo.

Al Dr. Oscar Próspero García le agradezco me permitiera formarme como científica durante varios años en su grupo de trabajo.

Al Dr. Raúl Aguilar Roblero agradezco sus críticas agudas a mi trabajo, han jugado un papel importante en mi formación.

Especialmente quiero agradecer al Dr. Silvestre Alavez, uno de mis primeros tutores académicos, aprender que en esto de la ciencia la paciencia es muy importante es una de tus máximas enseñanzas. Gracias por ser una excelente persona, pero sobretodo por tu amistad y ánimo.

Finalmente, a todos los buenos amigos y amigas con los que he compartido diversos momentos que siempre me han permitido crecer: Zeidy, Jana, Guadalupe, Beatriz, Paty Trejo, Dulce, Khalil, Gleen, Aida, Blanca, Alex, Marco, Steve, Alejandra, Rayo, Ari, Gisela, Xóchitl, Jorge Rojas, Karina, ... espero no olvidar a alguno.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la beca CONACyT para estudios de posgrado No. 176684 otorgada a CJMR y con el donativo DGAPA-UNAM No. IN230503 otorgado a OPG.

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	i
RESUMEN.....	v
CAPÍTULO 1. EL SUEÑO Y LA VIGILIA.....	1
1.1 El sueño como un estado de consciencia diferente a la vigilia.....	2
1.1.1 Clasificación electrofisiológica del sueño en mamíferos.....	4
1.2 Los fundadores de la neurobiología del sueño y la vigilia.....	7
1.2.1 Finales del siglo XIX. El sueño como un fenómeno natural.....	7
1.2.2 Principios del siglo XX. El cerebro como generador del sueño y de la vigilia... 9	
1.2.3 Localizando el centro del sueño.....	12
1.2.4 El sueño de Movimientos Oculares Rápidos.....	16
1.3 Neuroanatomía, neuroquímica y neurofisiología de los sistemas cerebrales del ciclo sueño-vigilia.....	18
1.3.1 La vigilia y el puente cerebral.....	19
1.3.1.1 La vigilia y el hipotálamo.....	24
1.3.2 Sueño sin movimientos oculares rápidos.....	29
1.3.3 Sueño de movimientos oculares rápidos (MOR).....	32
1.4 Una visión integrada del sistema ejecutor.....	37
1.5 Conclusiones.....	39
1.6 Referencias.....	40

CAPÍTULO 2. LA PRIVACIÓN DE SUEÑO COMO UNA APROXIMACIÓN METODOLÓGICA A LAS FUNCIONES DEL SUEÑO.....	47
2.1 La privación de sueño como una aproximación metodológica a las funciones del sueño.....	47
2.1.1 Privación de sueño total.....	50
2.2.2. Privación selectiva de sueño MOR.....	52
2.2 Problemas metodológicos de la privación de sueño.....	53
2.3 Efectos generales de la privación de sueño y del rebote de sueño.....	58
2.3.1 Privación de sueño.....	59
2.3.2 Rebote de sueño.....	61
2.3.3 Privación de sueño y Factores Inductores de Sueño.....	64
2.3 Niveles de análisis los efectos de la privación de sueño sobre el cerebro.....	68
2.4.1 Nivel de integridad celular del sistema nervioso.....	68
2.4.2 Nivel de actividad cerebral.....	69
2. 4. 3 Nivel de plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria.....	71
2.4 La privación de sueño como un cambio en la homeostasis del sistema cerebral.....	74
2.5 Conclusiones.....	77
2.6 Referencias.....	81
CAPÍTULO 3. SUEÑO Y SOBREVIVENCIA NEURONAL.....	86
3.1 Sobrevivencia Neuronal.....	86
3.1.1 Sobrevivencia Neuronal y Factores Tróficos.....	87
3.1.2 Factores Neurotróficos y sus funciones.....	89

3.1.3 Receptores con actividad de tirosina cinasa.....	90
3.2 Muerte celular.....	91
3.2.1 Apoptosis.....	92
3.2.2 Vía intrínseca.....	93
3.2.3 Vía extrínseca.....	96
3.3 Restauración Neuronal como una función del sueño.....	97
3.4 Sueño y Factores Neurotróficos.....	101
3.5 Privación de sueño e integridad celular del sistema nervioso.....	103
3.6 Conclusiones.....	106
3.7 Referencias.....	107
CAPÍTULO 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	110
4.1 Hipótesis.....	112
4.2 Tesis específicas.....	112
4.3 Objetivos.....	113
4.4 Método.....	114
4.4.1 Muerte celular espontánea.....	114
4.4.2 Variaciones diurnas de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax.....	115
4.4.3 Variaciones en los niveles de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax por las manipulaciones de sueño.....	117
4.4.4 Vulnerabilidad del cerebro.....	118
4.5 Técnicas.....	120

CAPÍTULO 5. RESULTADOS .....	125
5.1 Muerte celular espontánea.....	125
5.2 Variaciones diurnas de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax.....	126
5.3 Variaciones en los niveles de Bcl-2, Bax y Bcl2/Bax por las manipulaciones de sueño.....	133
5.4 Vulnerabilidad del cerebro.....	140
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	148
6.1 Contexto de origen de la teoría restauradora. ¿Por qué la <i>teoría restauradora</i> del sueño tuvo tanto auge?.....	149
6.2 Delimitación de los conceptos de <i>restauración</i> y <i>función</i> .....	150
6.3 Propuesta metodológica.....	152
6.4 Muerte celular espontanea en el cerebro adulto.....	155
6.5 Variaciones espontáneas y forzadas de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax.....	156
6.6 Proteína total.....	161
6.7 Vulnerabilidad celular.....	162
6.8 Conclusiones.....	165
6.9 Referencias.....	169
ANEXO.....	173

## INTRODUCCION

El sueño es un estado de reposo reversible, en donde el organismo deja de interactuar activamente con el ambiente externo; contrario a la vigilia periodo donde el organismo responde y modifica su entorno. El sueño está presente a lo largo de la escala filogenética. Los humanos por ejemplo, invertimos un tercio de nuestra vida en dormir, si vivimos 60 años pasamos 20 años dormidos.

De alguna manera todos conocemos la importancia del sueño, seguramente alguna vez nos hemos desvelado y sabemos que las consecuencias no son agradables; la vigilia del siguiente día no es normal, tenemos dificultades para concentrarnos o poner atención. Si el desvelo se prolonga por varios días, la somnolencia será mayor, consistiendo en pequeñas intromisiones de sueño en el día, aumento del malestar físico, y disminución sustancial de nuestras capacidades de respuesta a los estímulos ambientales. Por increíble que parezca, todo regresará a la normalidad si dormimos lo suficiente.

El periodo de sueño de alguna forma nos permite tener un buen desempeño durante la vigilia, sobre todo en lo referente a nuestras funciones cognoscitivas. El dormir es un estado tan necesario como comer o reproducirnos, en el sentido de que si no hacemos alguna de estas cosas la muerte es inminente, por lo que suponemos debe cumplir alguna función biológica importante.

A pesar de que diversos grupos de investigación han detallado la neuroanatomía y la neurotransmisión que ocurre en los centros promotores del sueño y de la vigilia, la función del sueño sigue siendo una incógnita.

Una de las teorías que más fuerza ha cobrado es la teoría restauradora del sueño, la cual dice que el sueño es un periodo donde el organismo se restaura del desgaste ocurrido durante la vigilia. Esta noción proviene de los trabajos clásicos de privación de sueño de Marie de Mancéine y Henri Piéron. Manaceine señala que dormir es más importante que comer; Piéron que durante la vigilia se acumulan toxinas que inducen sueño al llegar a cierta concentración. Ambos autores indican que no dormir afecta la integridad del lóbulo frontal. Diversos autores han propuesto hipótesis sobre como el sueño restaura al cerebro, sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario el sustento experimental y los mecanismos propuestos son tan específicos que resulta difícil creer que por alguno de ellos las neuronas se restauran. Por esta razón delimitamos restauración como el proceso celular básico por el cual las neuronas se restituyen; de esta manera, restauración se refiere a la homeostasis celular; los mecanismos son diversos, muchos de ellos pueden ser cualquiera de los mecanismos hipotetizados por otros autores. La variable que puede reflejar la salida final de la homeostasis es la viabilidad celular, el postulado es simple: las células más aptas sobrevivirán y las menos aptas morirán. Este trabajo plantea evaluar la restauración en la sobrevivencia celular y en los mecanismos que la regulan.

El objetivo de este trabajo fue aportar datos que nos permitieran saber si la restauración celular en el cerebro es una función del sueño. La hipótesis central fue que la viabilidad celular esta facilitada durante el sueño. Se realizaron experimentos que evaluaron la muerte celular espontánea en la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo lateral, el área preóptica y núcleos del puente cerebral de la rata adulta; en la fase luz y en la fase oscuridad. Además, se evaluó la vulnerabilidad celular a morir, en la corteza cerebral y en el hipocampo de la rata; durante la fase de luz y durante la fase de oscuridad. Se evaluó

también la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica Bax en condiciones espontáneas a lo largo del ciclo luz-oscuridad y después de manipulaciones de sueño. Se obtuvo el índice de sobrevivencia celular al dividir Bcl-2/Bax. Estas medidas se utilizaron como indicadores de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos no indican que la viabilidad celular este facilitada durante el sueño. Por el contrario, cada estructura presenta una viabilidad celular única en la vigilia o en el sueño, en la luz o en la oscuridad, o en respuesta a las manipulaciones de sueño. Estos datos muestran una vez más la complejidad y la plasticidad del cerebro.

Invito al lector a adentrarse en el mundo del sueño. En el Capítulo 1 se define sueño y vigilia, a continuación se hace un recorrido por la historia de la investigación del sueño, después se describe el sistema neuroquímico del sueño; el Capítulo 2 se adentra en la privación de sueño y en como los datos experimentales nos han informado sobre el sueño; el Capítulo 3 lleva el nombre de este trabajo *Sueño y Sobrevivencia celular*, y aborda la relación entre estos dos procesos. El Capítulo 4 es el planteamiento del problema, en el se indican los postulados del trabajo y los experimentos realizados; en el Capítulo 5 se reportan los resultados; el Capítulo 6 es la discusión y las conclusiones. Al final se encuentra un anexo con dos ilustraciones que apoyan los resultados y algunos de los artículos producidos durante la realización del doctorado. En la discusión propongo puntos necesarios para una teoría general sobre la función restauradora del sueño, a lo largo de los primeros cuatro capítulos se encontraran los elementos necesarios para la discusión teórica. Con los resultados obtenidos se debe descartar la hipótesis: la viabilidad celular no está facilitada durante el sueño.

Finalmente, la investigación apunta a que las funciones del sueño en los mamíferos no tienen que ver con la restauración celular, sino con otro nivel de organización del sistema nervioso central: las redes neuronales.

## RESUMEN

El sueño es un estado conductual de quietud de los organismos, donde no ocurre una interacción ambiente-conciencia como en la vigilia. Todos los mamíferos invierten una buena parte de su vida en dormir, por ejemplo, los humanos dormimos una tercera parte de nuestra vida. ¿Para qué invertir tanto tiempo en un estado donde la conciencia parece ausentarse?, ¿qué pasaría si no dormimos? Se ha mostrado que no dormir es incompatible con la vida, si una rata no duerme muere en 3 semanas. Con base en estos experimentos se ha sugerido que el sueño sirve para restaurar a los organismos del desgaste ocurrido durante la vigilia, y puesto que en humanos el no dormir lleva a un déficit cognitivo, se ha propuesto que el blanco principal de esta restauración es el cerebro. Existen diversas teorías que proponen que el sueño es un periodo de restitución, desintoxicación y restauración celular; sin embargo, los datos experimentales que podrían sustentarlas son muy gruesos y prácticamente inexistentes. Es urgente delinear una teoría general que explique como el sueño podría restaurar a las neuronas, así como generar datos experimentales al respecto. En este contexto, decidí estudiar a la restauración neuronal evaluando la sobrevivencia celular y sus mecanismos celulares reguladores en el cerebro de la rata adulta. En condiciones espontáneas (a lo largo del ciclo luz- oscuridad el cual está asociado al ciclo sueño-vigilia) y bajo condiciones forzadas (por manipulaciones de sueño o por la administración de un fármaco promotor de muerte celular). La hipótesis general del trabajo fue que la viabilidad celular en el cerebro de la rata esta facilitada durante el sueño en comparación con la vigilia.

Para probar la hipótesis se plantearon cuatro objetivos: 1) Evaluar si la muerte neuronal espontánea en el cerebro de la rata adulta es mayor en el periodo de oscuridad-vigilia, 2) Evaluar las variaciones diurnas de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica Bax en el cerebro de la rata adulta, para saber si la viabilidad celular evaluada por Bcl-2/Bax está facilitada durante el período de luz-sueño, 3) Evaluar los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica Bax en el cerebro de la rata adulta después de un periodo de privación de sueño total por 24 h o después de un período de rebote de sueño de 24 h para conocer su efecto sobre la viabilidad celular, 4) Evaluar si la administración intracerebroventricular de la glucoproteína 120 derivada del VIH (VIHgp120) induce mayor muerte celular durante el período de oscuridad-vigilia comparado con el periodo de luz-sueño en la corteza prefrontal y en el hipocampo de ratas adultas; además de evaluar los niveles de Bcl-2 y Bax en las mismas ratas. Se realizaron cuatro experimentos, uno por cada objetivo; para los cuales se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-350gr) bajo un ciclo de luz oscuridad 12:12, con agua y alimento *ad libitum*.

Apoptosis espontánea. Se sacrificaron ratas intactas en cuatro puntos del ciclo luz-oscuridad, al final se tuvieron dos grupos con cinco sujetos cada uno (uno para la fase de luz-sueño y otro para la fase de oscuridad-sueño). Se evaluó la apoptosis mediante la cuantificación de núcleos fragmentados por TUNEL y núcleos condensados por DAPI, en la corteza prefrontal y parietal, en el hipocampo, en el hipotálamo y en el puente cerebral.

Variaciones diurnas de Bcl-2 y Bax. Se sacrificaron seis ratas en seis puntos del ciclo luz-oscuridad (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 hrs), se extrajo la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, el puente cerebral y el estriado. Mediante la técnica de western-blot se cuantificó Bcl-2 y Bax, posteriormente se obtuvo el índice de viabilidad celular (Bcl-2/Bax).

Manipulaciones de sueño. Se hicieron tres grupos de nueve ratas cada uno, el

grupo al que se privo de sueño total por 24 h (PST); el grupo de rebote de sueño (REB), al cual se le permitió dormir 24 h después de la PST; y el grupo control que tuvo sus periodos de sueño y vigilia sin ninguna alteración. Al término de las manipulaciones las ratas fueron sacrificadas para extraer la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, el puente cerebral y el estriado. Posteriormente se analizaron mediante inmunoblots los niveles de Bcl-2 y Bax. Apoptosis forzada. Se implantó una cánula en el ventrículo lateral derecho de las ratas. Diez días después de la cirugía se administró PBS o VIHgp120(160ng/5µl); a las 13:00 y 1:00 horas. Se detectó la muerte neuronal en la corteza prefrontal y parietal y en CA3 y el giro dentado en el hipocampo, mediante la técnica de TUNEL. Además, se realizó inmunohistoquímica contra Bcl-2 y Bax. Los resultados fueron analizados con una prueba “t” en el caso de la apoptosis espontánea, para las variaciones diurnas de Bcl-2 y Bax y para las manipulaciones de sueño se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor; y, para la apoptosis forzada se utilizó una ANOVA de dos vías.

Los resultados indican que la apoptosis espontánea en el cerebro adulto es prácticamente ausente, no presenta variaciones diurnas, ni está asociada a una fase del ciclo luz-oscuridad en particular. Los niveles de Bcl-2 y Bax presentan variaciones diurnas particulares para cada estructura cerebral, de igual forma, las manipulaciones de sueño afectan de manera estructura específica los niveles de estas proteínas en el cerebro adulto. Poniendo de manifiesto la gran capacidad plástica del cerebro. En la corteza prefrontal la viabilidad celular esta facilidad durante la vigilia por el aumento de Bcl-2 durante la oscuridad y después de la PST; nuestros datos sustentan que esta estructura es sumamente sensible a la privación de sueño, ya que el índice de viabilidad celular (Bcl-2/Bax) disminuyó por la PST y el periodo de REB no permitió que regresara a niveles basales. El

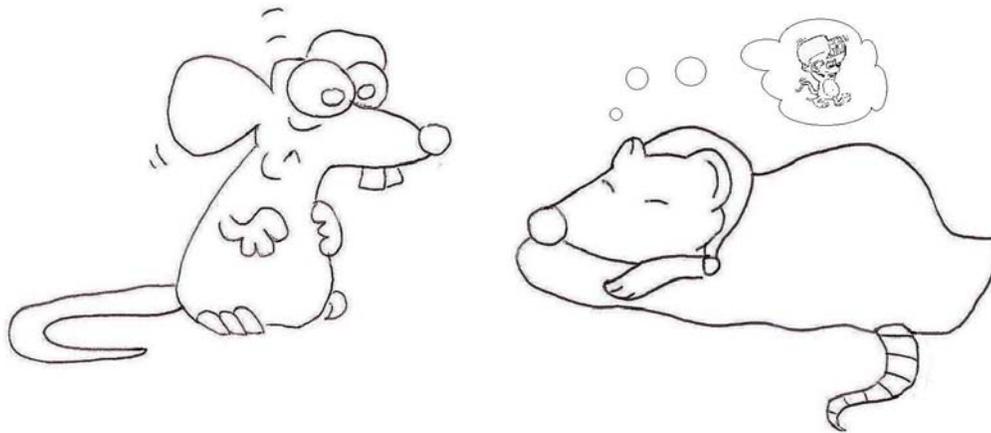
hipocampo fue la única estructura que se benefició del dormir, ya que después del REB el índice de viabilidad celular aumentó. El hipotálamo presentó variaciones diurnas para Bcl-2 y Bax, sin embargo esto no se reflejó en el índice de viabilidad celular. Bax presentó variaciones diurnas en el puente cerebral que tampoco se reflejaron en el índice de viabilidad celular, la privación de sueño disminuyó el índice de viabilidad celular en esta estructura y el período de rebote de sueño no fue suficiente para recuperarse. En el estriado los niveles de Bcl-2 y Bax fueron reactivos al ciclo luz-oscuridad pero no a las manipulaciones de sueño, durante la luz se observó un aumento en el índice de viabilidad celular. En el experimento cuatro, no se observaron diferencias por el ciclo luz-oscuridad en la apoptosis inducida por la VIHgp120, en la corteza prefrontal y parietal y en el hipocampo. Sin embargo, las células inmunoreactivas a Bax aumentaron significativamente solo en la fase de la oscuridad en la corteza parietal y el hipocampo (CA3 y el giro dentado). Estos trabajos no mostraron que la vulnerabilidad celular a morir sea mayor en la vigilia de la rata.

En conclusión, este trabajo se diseñó con el fin de probar que el sueño facilita la viabilidad celular; sin embargo, ni los estudios sobre apoptosis ni los estudios sobre la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la pro-apoptótica Bax indicaron que el sueño facilite la sobrevivencia celular. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para asegurar esto. Más allá de nuestra hipótesis original, la regulación de la sobrevivencia celular resultó ser particular a cada estructura cerebral, al parecer para responder de forma más eficaz ante cada reto del ambiente.

## CAPITULO 1. EL SUEÑO Y LA VIGILIA

El ciclo sueño-vigilia, se considera un ritmo biológico que por presentarse cada 24 horas se le denomina circadiano (alrededor del día). Este ritmo como todos los otros ritmos biológicos es resultado de la adaptación del organismo a las variaciones cíclicas del ambiente, y es controlado por el núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ está localizado en la parte ventral del hipotálamo anterior y dorsal al quiasma óptico (Gruart et al., 2002). El sueño y la vigilia se sincronizan con las señales ambientales de luz y oscuridad. En humanos, generalmente durante la fase de oscuridad se presenta el sueño y durante la fase de luz la vigilia (está relación se invierte en los roedores, como las ratas).

El sueño se ha definido clásicamente como un *estado conductual* de quietud de los organismos, acompañado de una postura de inmovilidad o reposo (especie-específica), con una disminución en la capacidad para responder consciente y voluntariamente a los estímulos externos, diferente al coma o a la muerte pues es reversible (Fig. 1). En la vigilia en cambio existe una clara interacción con el ambiente externo (Astrobus et al, 1993).



**Figura 1. El sueño y la vigilia pueden evaluarse por indicadores conductuales, durante la vigilia hay una interacción activa con el medio externo (izquierda) mientras que en el sueño esta interacción no ocurre (derecha).**

## 1.1 El sueño como un estado de consciencia diferente a la vigilia

El sueño debe definirse tomando en cuenta a la vigilia, juntos forman el ciclo sueño-vigilia; por lo que el estudio apropiado de sus funciones debe realizarse con respecto a la vigilia y viceversa. Las características definitorias del sueño adquieren significado siempre en contraste con la vigilia. Cuando estamos despiertos percibimos e interpretamos los estímulos del medio ambiente, por lo que decimos que somos *conscientes* del mundo externo, ya que interactuamos con él, le respondemos y lo modificamos. Por el contrario, la esencia fundamental del sueño es retirarnos de esta interacción *consciente* con el ambiente. Esto implica que la interacción *ambiente-cerebro consciente* ocurre durante la vigilia y no durante el sueño; presentándose un estado de *inconsciencia* durante el sueño, en donde la interacción *ambiente-cerebro* si ocurre pero la interacción *ambiente-conciencia* no<sup>1</sup>.

Los estados de alertamiento, *conciencia* y vigilia, así como el de *inconsciencia* y sueño ocurren por la actividad coordinada de grupos neuronales específicos modulados por neurotransmisores, los cuales forman redes neuronales. Desde esta perspectiva, algunos grupos neuronales se activan para producir nuestra conciencia mientras que simultáneamente otros se inhiben, estos últimos se pondrán en marcha cuando dormimos con la simultánea inactivación de los sistemas que estuvieron activos durante la vigilia<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup>Conciencia se define en su sentido más amplio como *el darse cuenta* de lo que ocurre alrededor, se refiere a un proceso mental en donde el sujeto crea una imagen integrada de sus experiencias. Por lo que, cuando un sujeto interactúa con su medio externo podemos decir que esta conciente.

<sup>2</sup> Es importante mencionar que la actividad onírica en humanos durante el sueño se ha considerado como un tercer estado de conciencia. A pesar de que durante las ensoñaciones no somos *conscientes* del mundo externo como en la vigilia (no ocurre una interacción del organismo con el ambiente en tiempo real) se presenta una actividad cerebral que permite generar imágenes mentales con significado. Esta representación interna es el argumento de varios autores para proponer que las ensoñaciones son un tercer estado de *conciencia* (para un

Dicho de otra forma, cuando el sujeto duerme el sistema neuronal del sueño se activa y el de la vigilia es inhibido; cuando estamos despiertos ocurre lo contrario. Esto plantea la existencia de dos cerebros en el mismo individuo, desde el punto de vista funcional, uno que duerme, mientras el otro permanece despierto, el cerebro dormido y el cerebro despierto (Montes-Rodríguez et al., 2006).

El sueño es un estado generalizado del organismo que afecta diferentes variables fisiológicas, desde la frecuencia cardiaca hasta el nivel de conciencia en los humanos. Por lo que debemos diferenciar los mecanismos y las estructuras cerebrales que regulan directamente la instalación y el mantenimiento del sueño (sistemas ejecutores), los que se benefician del dormir o de estar despiertos (sistema beneficiario) y los que se activan o se inhiben como consecuencia del dormir sin una función específica (epifenómenos).

Al final de este capítulo revisaré a detalle los sistemas cerebrales *ejecutores* del sueño, la red neuronal de la vigilia incluye a la formación reticular mesencefálica y pontina, al tálamo, al hipotálamo lateral y posterior; mientras que la red neuronal del sueño incluye al tálamo, al hipotálamo anterior y al lateral, al puente cerebral y algunas neuronas del cerebro basal anterior. En el capítulo dos revisaré los sistemas cerebrales *beneficiarios* del dormir, siendo en este nivel donde nuestra pregunta de investigación toma fuerza. También revisaré en el capítulo dos a las moléculas que señalizan la necesidad del dormir, los factores inductores de sueño. Finalmente, aunque no detallaré todos los cambios fisiológicos que ocurren como consecuencia del sueño y la vigilia, es importante tener presente que prácticamente todas las variables fisiológicas cambian durante el sueño.

---

análisis de esto revisar Flanagan, 2003; Hobson, 2004). De hecho, como veremos en el apartado 1.3 en las ensoñaciones se activan una red neuronal específica que incluye a la red para iniciar y mantener el sueño y a una parte de la red de la vigilia. Es probable que durante las ensoñaciones en los humanos se manifieste el mundo de lo imaginario en su expresión más pura, y esto implique un tercer estado de conciencia; sin embargo este tópico no es un punto de discusión para este trabajo.

### **1.1.1 Clasificación electrofisiológica del sueño en mamíferos**

El registro de la actividad eléctrica del cerebro mediante electrodos y amplificadores ha permitido realizar una clasificación de los estados de vigilancia en mamífero con base en la frecuencia y la amplitud de la actividad cerebral. El sueño se divide en dos grandes fases: la fase de sueño sin Movimientos Oculares Rápidos (NMOR) y la fase de sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR); el otro estado de vigilancia es la vigilia (Fig.2).

El sueño NMOR se caracteriza por una disminución en la velocidad de la actividad eléctrica cerebral, llegando a ser lenta y de gran amplitud, por lo que se le conoce también como Sueño de Ondas Lentas (SOL). Hay presencia de tono muscular, pero de menor actividad que el observado durante la vigilia y ausencia de movimientos oculares rápidos. El SOL se divide en tres etapas en el humano y dos en la mayoría de los mamíferos registrados; la fase 1 y 2 del humano corresponde a la fase 1 en los demás mamíferos y la fase 3 a la fase 2 respectivamente (Fig. 2).

La fase 1 en el humano se refiere a la somnolencia y se presenta cuando el sujeto va a dormir, la actividad del EEG se vuelve más lenta que la observada durante la vigilia. En la fase 2 se presentan los husos de sueño y los complejos K. Los husos tiene una frecuencia de 12-14 Hz y se presentan en salvas de 0.5 – 2 s de duración; mientras que los complejos K son ondas lentas de gran amplitud (duración mayor a 0.5 s) y presentan un componente negativo seguido por uno positivo. Durante la fase 3 se presenta el ritmo delta con una frecuencia de 0.5 -4 Hz (Astrobus et al, 1993; Carskadon y Dement en Kryger et al., 2000).

El sueño MOR se caracteriza por una actividad eléctrica cerebral rápida y de bajo voltaje, con ausencia de tono muscular y presencia de movimientos oculares rápidos (Fig.2).

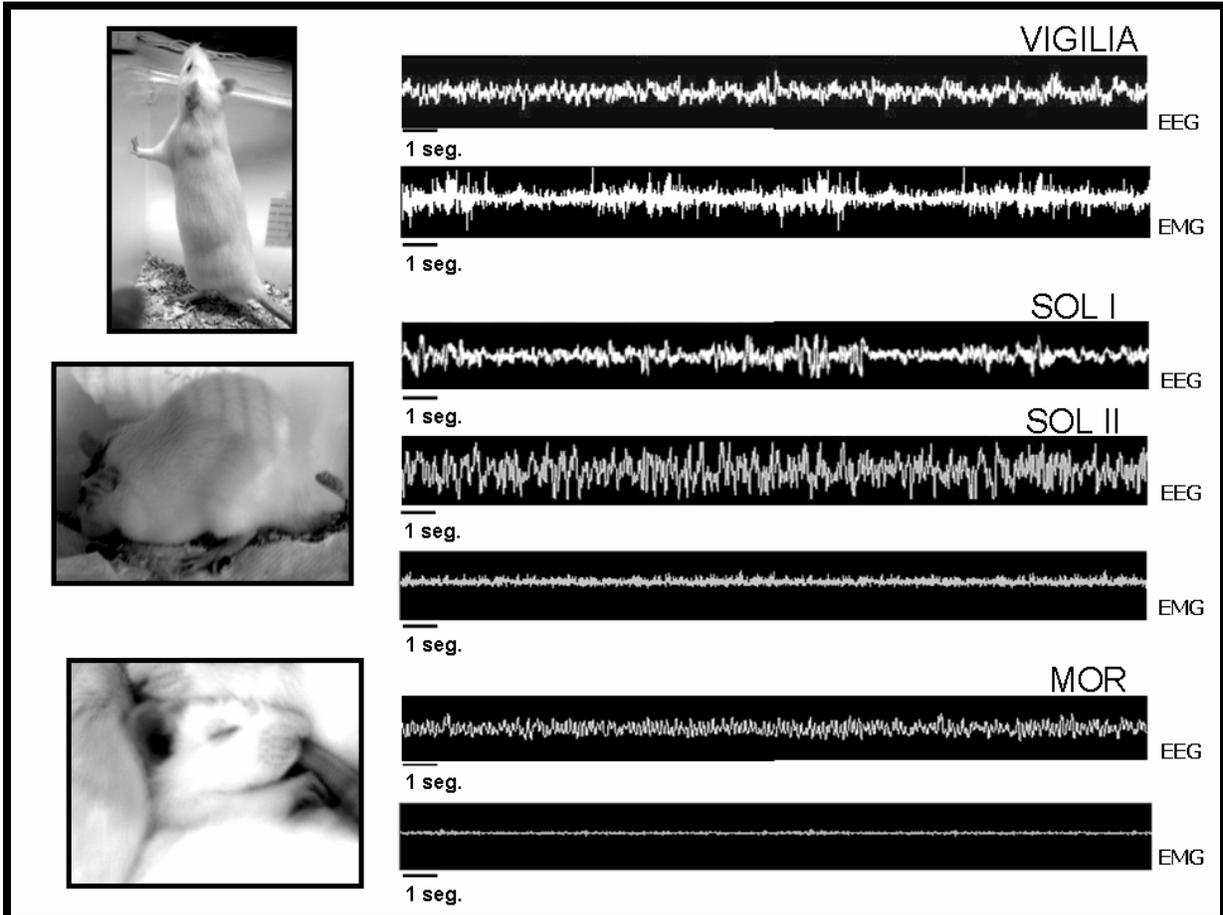


Figura 2. Actividad cerebral de la rata en los distintos estados de vigilancia. Durante la vigilia se presenta una actividad eléctrica rápida y de baja amplitud; en el sueño no MOR o sueño de ondas lentas (SOL) se presenta una actividad lenta y de gran amplitud, el tono muscular disminuye; en el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) se presenta una actividad de EEG similar a la vigilia pero con ausencia de tono muscular. EEG, electroencefalograma; EMG, electromiograma.

En humanos las ensoñaciones se presentan durante la fase de sueño MOR, el EEG presenta ritmos tan rápidos como el gamma de 40Hz y el beta de 14 a 25 Hz y ritmos lentos con una frecuencia de 4-8 Hz; mientras que en la rata se presenta el ritmo theta con una frecuencia de 8-12 Hz (Astrobus et al, 1993; Carskadon y Dement en Kryger et al., 2000; Llinás y Ribary, 2001; Siegel, 2004). Se piensa que la ausencia de tono muscular es

una adquisición evolutiva que evita que actuemos nuestros sueños. La lesión del peri-locus coeruleus- $\alpha$  en gatos (zona localizada en el puente cerebral) inhibe la inhibición del tono muscular durante el sueño MOR y como resultado el gato despliega conductas de ataque y defensa, ¿nos atreveríamos a decir que está soñando? Como la actividad del EEG durante el sueño MOR es parecida a la vigilia se le denominó sueño paradójico por el grupo de Michel Jouvet en Lyon, Francia en los años 50's (Sakai et al., 1979; Siegel en Kryeger et al., 2000).

La vigilia (V) se caracteriza por un ritmo de actividad eléctrica cerebral rápida y de bajo voltaje, con presencia de movimientos oculares. Sin embargo, a diferencia del sueño MOR se observa la presencia de tono muscular y una clara interacción del sujeto con su medio externo (Fig.2). En el EEG de humanos predominan 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); este último ritmo aparece cuando cerramos los ojos (Astrobus et al, 1993; Carskadon y Dement en Kryger et al., 2000).

El sueño presenta una arquitectura particular. Por ejemplo, la mayor cantidad de sueño NMOR en humanos se presenta en la primera mitad de la noche mientras el sueño MOR se presenta hacia la segunda mitad de la noche. El sueño NMOR se alterna con el MOR durante el dormir, normalmente el sueño inicia con la fase NMOR y es seguido por el MOR. En el humano, la alternancia NMOR-MOR ocurre de 4 a 6 veces a lo largo de una noche, esto es, cada 90 m en promedio (Aserinsky y Kleitman, 1953; Astrobus et al, 1993; Carskadon y Dement en Kryger et al., 2000). Si la arquitectura del sueño esta alterada se considera que existe una patología del sueño, por ejemplo, un sujeto que se encuentra en

vigilia y que repentinamente entra en un periodo de sueño MOR sin presentar previamente sueño NMOR se cataloga como narcoléptico.

## **1.2 Los fundadores de la neurobiología del sueño y la vigilia**

A finales del siglo XIX el sonambulismo y la hipnosis eran considerados estados mentales sobrenaturales que le conferían al sujeto poderes especiales como leer el pensamiento o comunicarse con los espíritus. El estudio de estos fenómenos era lo más cercano al estudio científico del sueño. En esta época el sueño tenía una connotación mística, espiritual o sobrenatural; el sueño como objeto de estudio estaba muy lejos de la forma en que ahora lo investigamos. De hecho, lo primero que se debía hacer aunque nos parezca increíble era ubicar al sueño como un fenómeno biológico susceptible de ser estudiado por el método experimental. El estudio científico del sueño fue iniciado muy probablemente a finales del siglo XIX por la rusa Maria Michailovna Manasseina (Marie de Manacéïne su nombre en francés).

### **1.2.1 Finales del siglo XIX. El sueño como un fenómeno natural**

Marie de Manacéïne publicó en 1897 un libro titulado “La fisiología, patología, higiene y psicología del sueño”, donde presenta diversos datos experimentales sobre el sueño y la vigilia, desde el cambio en la temperatura corporal hasta las consecuencias de varios días de privación de sueño en cachorros (De Manacèïne, 1897). Realizando una

sistematización de datos experimentales sobre el sueño y la vigilia desarrollados a finales del siglo XIX.

A lo largo de su libro *De Manacéine* desmitifica al sueño y lo coloca como un fenómeno biológico que forma parte de la fisiología normal; por lo que muy probablemente sea ella la fundadora del estudio moderno del sueño. Su pensamiento se puede ilustrar en el siguiente párrafo:

Es difícil de encontrar un aspecto de la vida en el que haya habido mayor injusticia e ingratitud que en el sueño, no sólo porque disfrutamos continuamente de todos sus beneficios, a veces incluso abusando de ellos. Aún no prestamos atención a sus fenómenos, y no los hemos incluido entre las cuestiones merecedoras de estudios serios. Marie de Manacéine, 1897.

Para De Manacéine el estudio del sueño significa entenderlo como una función biológica normal, así como la respiración o la circulación de la sangre. Gracias a sus observaciones sobre privación de sueño (PS) en cachorros propone que el sueño y el sistema nervioso central están relacionados, (Manacéine, 1897).

Los italianos Lamberto Daddi en 1898 y Tarozzi en 1899 inspirados en los trabajos de Manacéine realizaron experimentos de privación de sueño en perros. Ellos reportan cambios degenerativos en neuronas de los núcleos de la base, del cerebelo y de la corteza cerebral, principalmente en “el lóbulo anterior” (revisado en Bentivoglio y Grassi-Zucconi, 1997). Daddi interpreta que el exceso de estimulación durante la vigilia es lo que provoca los daños de la privación de sueño.

En 1900 el libro “La interpretación de los sueños” escrito por Sigmund Freud tuvo un gran impacto en la investigación del sueño, principalmente en su cuestionamiento acerca de la función de los sueños. A partir de muchos estudios de casos muestra a las

ensoñaciones como un estado mental y plantea que la psique de la vigilia es diferente a la del sueño. Genera un modelo teórico de la mente donde aborda procesos mentales como la memoria, la imaginación o la significación, y su relación con las ensoñaciones (Freud, 1992). Freud describe a las ensoñaciones como manifestaciones del *inconsciente*, por vez primera se concibe al sueño como un estado de conciencia dentro de una teoría formal.

Plantear que el sueño es un proceso fisiológico que se puede abordar mediante métodos experimentales fue un paso crucial en la investigación moderna del sueño. Las obras de Manacéine en 1897 y de Freud en 1900 ubican al sueño como un fenómeno fisiológico y psicológico, íntimamente relacionado con el cerebro.

En 1890 Mauther un oftalmólogo vienés reporta que el área que rodea al núcleo oculo-motor es importante en la regulación del sueño, esto gracias a sus observaciones en pacientes con la enfermedad de “nona” o de Wernicke (revisado en Nauta, 1946). La búsqueda del centro cerebral del sueño y la vigilia inicia.

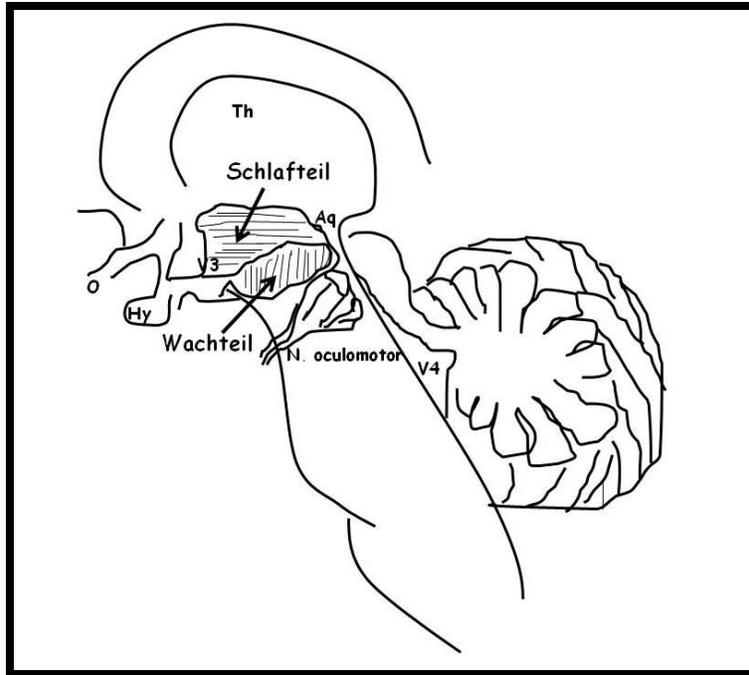
### **1.2.2 Principios del siglo XX. El cerebro como generador del sueño y de la vigilia**

A principios del siglo XX inicia el estudio del sueño y sus sustratos neuronales estimulado por el desarrollo de nuevos métodos experimentales, como el registro de la actividad cerebral o la administración de fármacos en regiones puntuales del cerebro.

En 1913 Henri Piéron publicó su libro “Le problème physiologique du Sommeil”, donde reporta varios experimentos de privación de sueño en perros y propone que durante el periodo de actividad de un organismo se acumulan sustancias en la sangre por la fatiga

ocurrida en la vigilia; estas sustancias tienen un efecto narcótico sobre el cerebro. Piéron las llamó hipnotoxinas porque cuando alcanzaban concentraciones “altas” inducían sueño; al dormir las hipnotoxinas podían ser excretadas por el cuerpo y el estado de vigilia regresaba (Legendre y Piéron, 1912; revisado en Howell, 1913; y en Ranson, 1934). Estos trabajos inician la tradición de la investigación humoral del sueño (ver Factores Inductores de Sueño en el Capítulo 2, Apartado 2.3.3).

Constantin Von Economo un médico vienés presenta en 1917 su primer reporte escrito sobre la etiología y la patología experimental de la encefalitis letárgica. Reporta que además de fiebre, delirios, ataxia y parálisis de las extremidades (entre otros síntomas); los pacientes presentaban serias alteraciones de sueño. El análisis post-mortem reveló que los pacientes presentaban una lesión en la parte rostral al núcleo oculo-motor cerca del acueducto cerebral y la región infundibular. Von Economo postuló la existencia de un centro regulador del sueño (“*Schlafsteuerungszentrum*”); el cual separó en dos áreas, la parte del sueño (*Schlafteil*) y la parte de vigilia (*Wachteil*); (Fig.3). Esta clasificación la realizó al observar que los pacientes que presentaban hipersomnia tenían lesiones en el hipotálamo posterior; mientras que aquellos que al morir presentaban insomnio tenían dañado el hipotálamo anterior. Economo concluyó que el hipotálamo anterior facilita el sueño y el posterior facilita la vigilia. (Triarhou, 2006a; 2006b). Sus estudios confirmaron que el sueño y la vigilia son estados producidos por el cerebro.



**Figura 3.** Esquema realizado por *Economo* donde muestra al *Schlafsteuerungszentrum* o centro regulador del sueño localizado en el hipotálamo. Lo divide en la parte del sueño o *Schlafteil*; y en *Wachteil* o parte de la vigilia. *Aq*, acueducto; *Hy*, hipófisis; *O*, quiasma óptico; *Th*, tálamo óptico; *V3*, tercer ventrículo; *V4*, cuarto ventrículo. Imagen modificada de *Triarhou*, 2006a.

Otro hecho crucial en la investigación de sueño es el desarrollo del electroencefalograma (EEG). En 1929 Hans Berger publica un artículo titulado “Human electroencephalogram” donde reporta que es posible registrar la actividad cerebral en humanos. Berger estaba interesado en mostrar la relación entre la mente y su sustrato material, el cerebro y desarrolló la técnica precisa para hacerlo: el EEG. Realizó registros de superficie pero también con electrodos intracraneales y mostró que la actividad eléctrica cerebral es diferente en el sueño con respecto a la actividad cerebral de la vigilia, describió el ritmo alfa y mostró cambios drásticos en la actividad cerebral de pacientes epilépticos (Gloor, 1971). Sin embargo, su trabajo fue mostrado a la comunidad científica hasta 1934 en el congreso de la sociedad psicológica de Cambridge, donde E. D. Adrian realizó una demostración del trabajo de Berger (Adrian, 1971).

### 1.2.3 Localizando el centro del sueño

En la primera mitad del siglo XX muchos grupos de investigación exploran el *Schlafsteuerungszentrum* o centro del sueño descrito por Von Economo mediante lesiones o estimulación eléctrica. Todos buscan saber si existe un centro de la vigilia que se apaga en el sueño o un centro del sueño que activamente inhibe al centro de la vigilia e induce sueño.

Bremer en la década de los 30's desarrolló dos preparaciones cerebrales en gatos, a una la llamo encéfalo aislado (*encéphale isolé*) y a la otra, cerebro aislado (*cerveu isolé*). En la preparación del *cerveu isolé* hizo un corte a nivel mesencefálico en el surco intercolicular, observó que los gatos presentaban una actividad cerebral eléctrica de frecuencias lentas y gran amplitud, además sus pupilas permanecían mióticas. Bremer interpretó que los gatos dormían. En la preparación del *encéphale isolé* hizo un corte a nivel de la medula espinal en su unión con el puente cerebral, en estos gatos el EEG mostraba una alternancia entre un ritmo cerebral lento que corresponde al sueño y una rápido que corresponde a la vigilia. Bremer propuso que en la preparación de *cerveu isolé* los animales se dormían por que las entradas sensoriales habían quedado prácticamente suprimidas, mientras que, cuando la información sensorial aumentaba como en la preparación del *encéphale isolé* el animal podía despertar. Esto lo interpreto porque la deaferentación sensorial es mayor en la preparación del *cerveu isolé* que en la del *encéphale isolé*, ya que se corta la información sensorial que el nervio trigémino lleva. Bremer concluye que el sueño ocurre por la ausencia de estimulación sensorial, apoyando así a la teoría pasiva del sueño (Bremer, 1935).

La teoría pasiva del sueño prevaleció a finales del siglo XIX y principios del XX. Esta teoría postulaba que el sueño ocurre por una desconexión del mundo, resultado de una

disminución de la estimulación ambiental. Sin embargo, varios científicos estaban en desacuerdo con esta teoría; por ejemplo, von Economo postulaba la existencia de un centro del sueño capaz de inhibir partes del sistema nervioso, dando al sueño una connotación de proceso activo. Además, argumentaba que sus pacientes que morían hipersomnes no presentaban síntomas de sensibilidad reducida (Revisado en Nauta, 1946).

Afortunadamente diversos grupos en el mundo estaban interesados en conocer los mecanismos fisiológicos del sueño. La discusión gira en torno a la existencia de los centros reguladores de la vigilia, los defensores de la teoría pasiva proponía un centro de la vigilia que se “apaga” cuando el organismo duerme; los defensores de la teoría activa buscaban demostrar la existencia de un centro cerebral subcortical que activamente produce sueño al inhibir a la corteza cerebral. En el contexto de esta discusión se generaron varios estudios para explorar la participación del hipotálamo y del tálamo en la regulación del sueño-vigilia.

En 1934, Ranson observó que lesiones electrolíticas del hipotálamo posterior de gatos y monos provocaban sueño por días y hasta por semanas. Esta lesión corresponde al centro del sueño de Economo (Ranson, 1934). Además, Gagel, en 1936, reportó que la estimulación mecánica de la parte posterior del hipotálamo produce sueño, dicha estimulación ocurría debido a la presencia de un tumor en el tercer ventrículo (revisado en Harrison, 1940). Harrison reporta que la destrucción del hipotálamo lateral produce somnolencia; además, si la lesión se extiende a la parte medial y caudal se produce catalepsia (Harrison, 1940).

Finalmente, los estudios de estimulación y lesión en el hipotálamo de ratas realizados por Nauta en 1946 muestran que la división del Schlafsteuerungszentrum

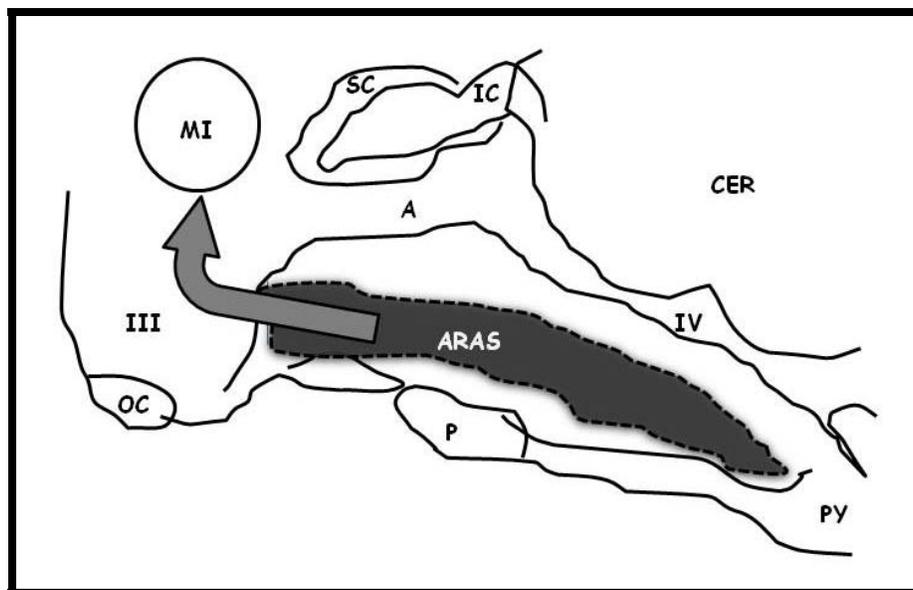
propuesta por Economo es correcta. Nauta observó que la lesión del hipotálamo interfiere con el sueño; la parte caudal del hipotálamo y adyacente al tegmentum del cerebro medio corresponden al centro de vigilia, mientras que el área preóptica corresponde al centro del sueño (Nauta, 1946).

En 1932, Hess mostró que la estimulación del cerebro medio y el cerebro basal anterior provoca sueño en gatos, específicamente en la zona entre el tálamo y el subtálamo (revisado en Nauta, 1946). Además, la estimulación de la masa intermedia del tálamo en gatos inducía sueño. Los trabajos de Hess sitúan al tálamo como una estructura importante en el sueño (Revisado en Prospero García, 1996).

La participación del tálamo en el sueño era sugerido por otros autores, por ejemplo, Trömer en 1928 propone que el tálamo es la única estructura con una ubicación anatómica que le permite ser el centro del sueño, ya que este influye sobre los centros hipotalámicos; Rowe en 1935 decía que la alteración de la cadena cortico-talámica-periventricular-hipotalámica-mesencefálica provoca sueño; Hirsch en 1924 y Spiegel e Inaba en 1927 muestran que la lesión del tálamo resulta en hipersomnia (revisado en Harrison, 1940). Finalmente, Monnier confirmó la participación del tálamo en el sueño al mostrar que la estimulación eléctrica de baja frecuencia en los núcleos intralaminares talámicos provoca la sincronización de la actividad cerebral, como ocurre en el sueño. A este fenómeno que llamo sueño delta ortodoxo (Monnier, 1960).

En 1949, el trabajo de Moruzzi y Magoun muestra la existencia del sistema reticular activador ascendente (SRAA) localizado en la formación reticular pontina y mesencefálica (Figura 4). Utilizando la preparación del “encéphale isolé” de Bremer estimularon la formación reticular en distintos niveles de gatos anestesiados y provocaron una

desincronización del ritmo cerebral (con una frecuencia alta de bajo voltaje parecida al ritmo cerebral de la vigilia), a esto le llamaron despertar electroencefalográfico. La desincronización del EEG se obtenía también con diferentes estímulos sensoriales auditivos o mecánicos, indicando que la estimulación sensorial requiere de la acción del SRAA. Moruzzi y Magoun afirman que la vigilia requiere de un sistema que la promueva, el cual está ubicado en la formación reticular. Además muestran la relación de este sistema y el tálamo, ya que la sincronización cortical inducida por la estimulación del tálamo a altas frecuencia (5 V, 300 Hz) era abolida por la estimulación del SRAA (Moruzzi y Magoun, 1949).



**Figura 4. Sistema reticular ascendente activador (SRAA).** Esquema realizado por Moruzzi y Magoun de una vista sagital de cerebro de gato en donde representan el SRAA en gris oscuro. A, acueducto; ARAS, sistema reticular activador ascendente; CER, cerebelo; IC, colículo inferior; MI, masa intermedia; OC, quiasma óptico; P, puente, PY cruce piramidal; SC, colículo superior; III, tercer ventrículo; IV, cuarto ventrículo. Imagen modificada de Moruzzi y Magoun, 1949.

En la década de los 40'se formaba un consenso de gran importancia entre la comunidad científica acerca de la participación del hipotálamo, del tálamo y del sistema reticular ascendente activador como reguladores del sueño y de la vigilia. Como mencione

antes, la existencia de actividad cerebral durante el sueño le otorga a este una connotación de proceso activo, ya que los registros no mostraban que la actividad cerebral estuviera ausente durante el sueño, sino más bien se observó una actividad cerebral diferente a la de la vigilia. Al parecer el debate entre la teoría pasiva y la teoría activa del sueño terminaría, el sueño como un proceso activo se iba develando.

#### **1.2.4 El sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR)**

A finales del siglo XIX se inducían estados de “sueño” por el paso de electricidad a lo largo del cuerpo, el estado provocado era llamado por algunos como “*electronarcosis*” (revisado en Harrison, 1940). La exploración de la biología utilizando electricidad comenzaba. A principios del siglo XX la mayoría de los investigadores estaban interesados en los reflejos y el funcionamiento de las fibras nerviosas, la exploración del cerebro estaba olvidada. Los trabajos de Berger, Hess, Ranson, Nauta, entre otros, impulsaron el estudio electrofisiológico de regiones cerebrales.

La posibilidad de registrar toda la actividad del cerebro mediante el EEG llevó a varios grupos de investigación a trabajar en una clasificación de los ritmos cerebrales. El propio Berger describe la ocurrencia del ritmo alfa en humanos, el cual aparece como ya mencionamos cuando cerramos los ojos y presenta una frecuencia de 4-8 Hz (Gloor, 1971). Los trabajos de Lomis, Harvey y Hobard permiten una clasificación inicial de las etapas de sueño, por ejemplo, describen la presencia de señales eléctricas características como los usos de sueño con una frecuencia de 9-10 Hz (Loomis et al., 1935a; Loomis et al., 1935b; Davis et al., 1937).

Hasta los años 50's se pensaba que durante el sueño ocurría un solo tipo de actividad cerebral, lenta de gran amplitud y sincronizada. En 1953 Aserinski y Kleitman reportan la existencia del sueño MOR en humanos. Este tipo de sueño presenta una actividad electroencefalográfica rápida y de baja amplitud, presencia de movimientos oculares rápidos y está asociado a la presencia de ensoñaciones. También describen que ocurren varios episodios durante la noche y que su duración aumenta hacia el despertar. Ellos indican muy acertadamente que la duración de los sueños MOR puede ser un indicador de la duración de las ensoñaciones (Aserinsky y Kleitman, 1953).

Fue un grupo francés a cargo del Dr. Michael Jouvet quien desenmarañó los mecanismos cerebrales responsables del sueño MOR. Jouvet trabajó con gatos intactos, gatos descerebrados y con las preparaciones de Bremer. Registraba la actividad cortical de estos gatos después de estimular eléctricamente y/o lesionar ciertas áreas cerebrales. Con estas preparaciones mostró la existencia de dos formas de sueño que son relativamente independientes y tienen un sustrato cerebral distinto; el sueño lento y el sueño rápido. En el primero el EEG es lento y con amplitud grande, lo llamó sueño telencefálico porque necesita de la presencia de la corteza cerebral para que se presente, además dijo que este sueño se adquiere durante la telencefalización por lo que le llamó también neo-sueño. Al sueño rápido (EEG de amplitud corta y frecuencia rápida) lo llamó paradójico (porque la actividad cerebral presente es como la de vigilia) o sueño romboencefálico ya que su ocurrencia depende de las estructuras cerebrales localizadas en la formación reticular pontina. También lo llamó "arqui-sueño" por estar en estructuras cerebrales más profundas y mostró que el umbral para despertar aumenta comparándolo con el sueño telencefálico (Jouvet, 1961).

El descubrimiento del sueño MOR muestra casi irrefutablemente que el sueño es un proceso activo y que en él se generan estados cognitivos muy complejos. La existencia de este tipo de actividad plantea la necesidad de re-conceptualizar el fenómeno del sueño y de la vigilia. El sueño empieza a despertar curiosidad en la comunidad científica, conocer los mecanismos del sueño de alguna manera tienen que ver con conocer los mecanismos de la conciencia. Considero que hasta este momento termina una época donde se obtuvo una definición consensada de sueño y de vigilia; lo que le resta a la historia es conocer los mecanismos específicos por los que ocurre, así como la función que cumple.

En el siguiente apartado revisaremos los mecanismos neuronales responsables de la instalación y el mantenimiento del sueño y de la vigilia; y, en el capítulo 2 discutiré las propuestas contemporáneas sobre la función del sueño.

### **1.3 Neuroanatomía, neuroquímica y neurofisiología de los sistemas cerebrales del ciclo sueño-vigilia**

Los trabajos de Moruzzi y Magoun mostraron la existencia de un sistema cerebral necesario para la vigilia, ubicado en la formación reticular mesencéfala y pontina (Fig. 4). La formación reticular envía sus axones al tálamo, al cerebro basal anterior, a la amígdala, al hipotálamo y a la corteza cerebral; es decir inerva a prácticamente todo el cerebro anterior. Al estimular a la formación reticular, promueve un estado de alertamiento del sujeto, donde el sujeto parece atento a su contexto. También provoca la desincronización del EEG, por lo que se le denominó en los 50's sistema reticular activador ascendente

(Moruzzi y Magoun, 1949). Estudios realizados por Baghdoyan en la década de los 80, han mostrado que la formación reticular pontina produce sueño MOR; mientras que la formación reticular mesencefálica produce vigilia (Baghdoyan et al., 1984).

Los estudios de lesiones y estimulación indicaban que el hipotálamo posterior facilitaba la vigilia e inhibía el sueño; mientras que el área preóptica en el hipotálamo anterior, el cerebro basal anterior y el tálamo promueven sueño. Finalmente, en el puente cerebral se encuentran los núcleos que regulan al sueño MOR. Revisaremos a detalle la neuroanatomía y la neuroquímica del sueño NMOR, el sueño MOR y de la vigilia.

### **1.3.1 La vigilia y el puente cerebral**

Como ya mencionamos la estimulación de la formación reticular mesencefálica y pontina promueven el despertar electroencefalográfico (Moruzzi y Magoun, 1949). La formación reticular envía sus axones rostralmente para estimular al tálamo y este a su vez estimula a la corteza cerebral, provocando la generación de la actividad eléctrica desincronizada y rápida asociada con la vigilia y el sueño MOR (Figura 5). Por otro lado, estos axones facilitan el tono muscular a través de proyecciones que envía caudalmente a motoneuronas de la médula espinal (revisado en Jones B, 2005; Saper et al., 2005). Los trabajos de Chase y Morales mostraron que el tono muscular presente en la vigilia está regulado la despolarización de motoneuronas de la medula espinal; mientras que la atonía muscular presente en el sueño MOR ocurre por su hiperpolarización (Chase y Morales; 1982a, 1982b).

Varios núcleos neuronales del tallo cerebral que son considerados promotores de la vigilia envían sus proyecciones a la formación reticular. El locus coeruleus (LC) contiene neuronas noradrenérgicas, el rafe dorsal (RD) tiene neuronas serotoninérgicas, el núcleo latero-dorsal tegmental (LDT) y el pedúnculo pontino tegmental (PPT) realizan una transmisión colinérgica; en todos los núcleos se realiza también una transmisión GABAérgica, generalmente mediada por interneuronas, las cuales están bastante activas durante el sueño MOR (Figura 5).

La transmisión noradrenérgica está asociada a estados de alertamiento y estrés, la transmisión serotoninérgica a estados de atención y focalización; la transmisión colinérgica con procesos de aprendizaje y memoria. Como se puede observar, estos tres sistemas facilitan aunque en diferentes grados, el aprendizaje, la memoria, la atención y en general los procesos cognoscitivos. Además, como hemos mencionado facilitan la vigilia y modulan el sueño MOR. Revisemos cada uno de ellos.

### **Noradrenalina**

La noradrenalina (NA) del cerebro es producida en el núcleo LC, localizado en el puente cerebral (Figura 5). Fuxe et al., (1968) mostró que el LC envía proyecciones difusas a casi todo el manto cerebral. Además, la destrucción del LC disminuye la concentración de NA en la corteza prefrontal, sensorio-motora, cingulada, auditiva y visual; en un rango de 76 a 94%, indicando que la NA presente en la corteza cerebral proviene del LC (Levitt y Moore, 1978). La inervación cortical noradrenérgica es a través de tres vías, una que pasa por la cápsula interna, otra por la cápsula externa y otra a través del Septum (Tohyana *et al.*, 1974). Además, el LC inerva varias estructuras subcorticales como el hipotálamo, el área subtalámica, los núcleos de la base, el hipocampo, el septum, la

amígdala; caudalmente proyecta a la medula espinal y a otros núcleos del tallo cerebral (Jones et al., 1977; Berridge, 2008). Como podemos observar las neuronas noradrenérgicas inervan prácticamente a todo el cerebro, tal vez este sea un elemento imprescindible para que la vigilia ocurra.

La tasa de disparo de las neuronas noradrenérgicas es alta durante la vigilia, muy baja en el sueño NMOR y ausente en el sueño MOR (Aston-Jones y Bloom, 1981). La administración de agonistas colinérgicos en el LC de ratas anestesiadas induce un aumento en la actividad de las neuronas noradrenérgicas que consecuentemente desincroniza el EEG e induce vigilia; además, la administración i.c.v. de NA induce vigilia (revisado en Berridge, 2008). La inducción de vigilia conductual y la desincronización del EEG por la NA esta mediada por los receptores  $\beta$ - adrenérgicos localizados en el cerebro basal anterior (Berridge y Foote, 1996). Dentro del cerebro basal anterior se ha mostrado que es en el área preóptica medial y en el septum medial donde la NA tiene efectos promotores de la vigilia a través de los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$ ; además, la estimulación de ambos receptores tiene efectos aditivos sobre la promoción de la vigilia; es probable que esto ocurra normalmente cuando el LC se activa y libera NA en el cerebro basal anterior (Berridge et al., 2003).

Además, Gallopin et al. (2000) mostraron que la NA induce vigilia al inhibir a las neuronas promotoras de sueño localizadas en el área preóptica medial y ventrolateral; en este sentido se ha sugerido que debe hacerlo vía los receptores  $\alpha_2$  que activan a una proteína  $G_i$  (revisado en Berridge, 2008).

### **Serotonina**

Los núcleos del rafe están localizados en el tallo cerebral y sintetizan la serotonina cerebral (Figura 5). Se considera que la mayor cantidad de neuronas serotoninérgicas que

inervan la corteza cerebral están localizadas en el núcleo del rafe dorsal (RD), (Holmes et al., 1994). El núcleo del rafe magno, el rafe pálido y el rafe oscuro envían proyecciones descendentes a la médula espinal a la parte caudal del tallo cerebral. El núcleo del rafe pontino, el rafe mediano y el rafe dorsal envían proyecciones ascendentes que llegan a la parte superior del tallo cerebral, al hipotálamo, al tálamo y a todo el manto cerebral.

La tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas del rafe, cambian durante al ciclo sueño-vigilia. La tasa de disparo más alta ocurre en la vigilia activa (5 Hz), disminuye en la vigilia quieta; durante el sueño NMOR la tasa de disparo disminuye a menos del 50% (1Hz); mientras que, durante el sueño MOR los disparos desaparecen (Jacobs y Fornal, 1991). Este patrón de disparo es típico de las neuronas del rafe dorsal; sin embargo, también se observa en el rafe central superior y en el rafe magno (Jacobs y Fornal, 1991).

Por estudios de microdiálisis se ha observado que los niveles extracelulares de serotonina en el rafe dorsal son más altos durante la vigilia de la rata, disminuyen a un 69% en el sueño NMOR y durante el sueño MOR llegan al 39%. Este patrón de liberación se observa también en la corteza prefrontal, la cual recibe una gran cantidad de aferencias serotoninérgicas (Portas et al., 1998).

Como se puede observar, la actividad de las neuronas serotoninérgicas depende claramente del estado de vigilancia del sujeto, la mayor tasa de disparo ocurre en la vigilia activa, de hecho ocurre una sincronización entre los disparos de las neuronas del rafe dorsal y el ritmo  $\theta$  del hipocampo, el cual se presenta cuando la rata esta activa (Kocsis y Vertes, 1992). Esto indica que cuando un sujeto explora el mundo se necesita la sincronía del RD y el hipocampo; el primero impone un tono de alertamiento al sujeto y el segundo le permite almacenar la información nueva. También es clara la supresión de la actividad del RD en el

sueño MOR, mostrando su papel permisivo para el sueño. Esta característica la comparte con las demás monoaminas que revisaremos adelante.

### **Acetilcolina**

Los núcleos colinérgicos PPT y LDT están localizados a nivel del mesencéfalo y el puente cerebral, envían sus proyecciones rostralmente al tálamo y caudalmente a la médula espinal. Por otro lado, el septum medial, la banda diagonal de Broca y el núcleo de Meynert están localizados en el cerebro anterior y envían sus proyecciones a la corteza cerebral, al hipocampo y a la amígdala (Figura 5).

La transmisión colinérgica se ha asociado con la desincronización del EEG que se presenta en la vigilia y en el sueño MOR. La activación de los núcleos colinérgicos del tallo cerebral, estimula a núcleos talámicos que promueven la desincronización cortical (revisado en Jones B, 2005). El núcleo reticularis talámico (RT), recibe proyecciones colinérgicas tanto de PPT como del cerebro basal anterior. El RT modula la ocurrencia del sueño de ondas lentas, punto que revisaremos adelante en detalle (revisado en McCormick, 1989). La ACh inhibe a las neuronas GABAérgicas del RT, por lo que al haber una inhibición de la inhibición sobre la corteza cerebral se produce la actividad cortical desincronizada que se observa en la vigilia y en el sueño MOR. Se ha mostrado también que la ACh aumenta la frecuencia de disparo de células piramidales de la corteza cerebral (Steriade et al., 1993; McCormick, 1989).

La actividad de neuronas de PPT/LDT es alta durante la vigilia, disminuye en el sueño NMOR y aumenta en el sueño MOR (revisado en Jones B, 2005). Además, la liberación de ACh evaluada por microdiálisis en el núcleo de PPT de gatos es alta en la vigilia y en el sueño MOR, mientras que disminuye en el sueño NMOR (Kodama y Honda,

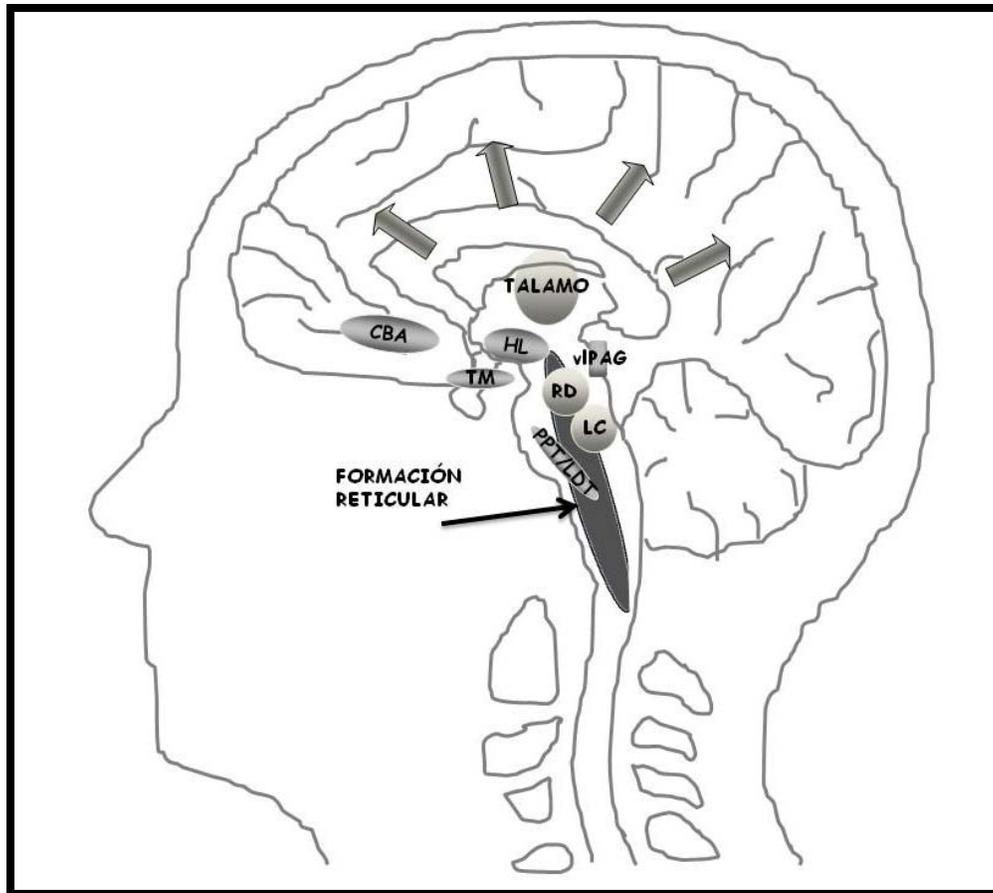
1999). Tal vez la primer evidencia de la modulación colinérgica sobre los estados de vigilancia fue obtenida por Hernández Peón quien reportó que la administración de agentes colinérgicos en algunas estructuras cerebrales induce alertamiento (Hernández-Peón et al., 1963). Algunas de estas estructuras como el área perifornical, la formación reticular mesencefálica y la sustancia gris periacueductal han sido estudiadas como facilitadoras de vigilia o de sueño MOR.

La administración de un agonista colinérgico en PPT y en el núcleo pontis oralis facilita el ritmo theta hipocampal, este ritmo se presenta en la rata cuando esta explorando y se esta moviendo o bien durante el sueño MOR. Indicando que la transmisión colinérgica modula los ritmos cerebrales de la vigilia y el sueño MOR (Vertes et al., 1993).

Las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior también presentan su tasa de disparo más alta durante la vigilia y el sueño MOR del sujeto, además su tasa de disparo máxima correlaciona con la presencia de frecuencias gamma y theta, sugiriendo su papel en el alertamiento cortical (Lee et al., 2005).

### **1.3.1.1 La vigilia y el hipotálamo**

La *Wachtei* o centro de la vigilia delimitada por Economo a principios del siglo XIX corresponde al hipotálamo posterior, el cual contiene varios centros promotores de la vigilia. El núcleo tuberomamilar (TM) contiene neuronas histaminérgicas y el hipotálamo lateral neuronas orexinérgicas; la tasa de disparo de estas neuronas es alta durante la vigilia (Figura 5).



**Figura 5. Red neuronal de la vigilia...**

### **Orexinas**

Las orexinas también llamadas hipocretinas son péptidos que se sintetizan en el hipotálamo lateral y en el área perifornical (Figura 5). Fueron descritos en 1998 por diferentes grupos de investigación, el grupo de Yanagisawa quien las llamó orexinas y el grupo de De Lecea quien las denominó hipocretinas (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al, 1998). Existen dos tipos de orexinas la A y la B (ORXA, ORXB) y dos tipos de receptores, el receptor a orexinas 1 (ORX1R) y el 2 (ORX2R); el primero promueve que la célula se despolarice mientras que el segundo hiperpolariza a la célula. El ORX1R es de alta afinidad

para la ORXA y de muy baja afinidad para la B (100-1000 veces menos que la A); el ORX2R tiene alta afinidad para ambas orexinas la A y la B (De Lecea y Sutcliffe; 2005).

Las neuronas orexinérgicas envían proyecciones a todo el hipotálamo, al tálamo, al núcleo subtalámico, a la zona incerta, al núcleo septal, a la sustancia negra, a la formación reticular medular, al área parabraquial, al núcleo del tracto solitario y a varios núcleos del tallo cerebral promotores de la vigilia como el LC y el RD (Peyron et al., 1998).

La tasa de disparo de las células orexinérgicas es mayor en la vigilia que en el sueño. De hecho es durante la vigilia activa cuando se registra la tasa de disp. aro más alta (Lee et al., 2005a). Se ha mostrado que su mayor tasa de actividad ocurre bajo procesamiento de tipo emocional y sensorio-motor (Mileykovskiy et al., 2005). Podemos observar que la transmisión orexinérgica se ha asociado con la vigilia activa y el control motor.

Además, los niveles de ORX-A en el líquido cefalorraquídeo de gatos son mayores en la vigilia activa que en la quieta; mientras que en el hipotálamo y el cerebro basal anterior, los niveles máximos de ORX-A se observaron en el sueño MOR y en la vigilia activa comparados con el sueño NMOR (Kiyashchenko et al., 2002).

Se ha mostrado que la excitación de neuronas orexinérgicas aumenta las transiciones del estado de sueño (MOR o NMOR) al estado de vigilia y disminuye la latencia del despertar (transición sueño NMOR-Vigilia); mientras que su antagonismo aumenta la latencia al despertar (Adamantidis et al., 2007).

Su papel como regulador de las transiciones entre los estados de vigilancia queda de manifiesto en los pacientes con narcolepsia; quienes presentan repentinos episodios de

sueño MOR cuando están despiertos y su sistema orexinérgico disminuido. Se ha visto que estos pacientes tienen niveles bajos de ORX en el líquido cefalorraquídeo y las neuronas orexinérgicas están prácticamente ausentes. Finalmente, los modelos de narcolepsia se obtienen con dobles mutantes para los dos receptores a ORX (de Lecea y Sutcliffe, 2005). Se cree que las células orexinérgicas mueren por un mecanismo autoinmune (de Lecea y Sutcliffe, 2005). Esta idea correlaciona con que muchos pacientes desarrollan narcolepsia en la edad adulta. Es posible que al paso del tiempo las células orexinérgicas mueran hasta un punto en que la producción de orexinas es insuficiente para mantener la vigilia; entonces los episodios de narcolepsia ocurren.

En resumen, las neuronas orexinérgicas envían proyecciones excitadoras a prácticamente todos los núcleos promotores de la vigilia, mientras que establecen una proyección inhibitoria sobre el hipotálamo anterior que contiene núcleos promotores del sueño. De esta forma cuando estamos despiertos activa a los núcleos promotores de la vigilia e inhibe a los núcleos promotores del sueño.

### **Histamina**

Las neuronas histaminérgicas están localizadas en el núcleo tuberomamilar en el hipotálamo posterior (Figura 5), reciben aferencias de la corteza prefrontal, el área preóptica medial y el septum. Envían proyecciones a casi todo el cerebro: al hipotálamo, al septum, al tálamo, a la corteza cerebral, a los núcleos de la base, al complejo amigdalino, al colículo inferior y superior, al bulbo olfatorio, al hipocampo, al tegmento de la médula oblongada, al cerebelo, a la médula espinal, al núcleo LDT, al locus coeruleus y al peri locus coeruleus (Wada et al., 1991; Lin et al., 1996).

La actividad de las neuronas histaminérgicas es alta en la vigilia; presentan su máxima tasa de disparo en la vigilia y permanecen silentes durante el sueño (Vanni-Mercier et al., 2003; Takahashi et al., 2006). Las vigilia específicas son dependientes de la calidad de vigilia ya que su tasa de disparo es mayor en la vigilia activa que en la quieta y mayor que cuando se da un estímulo auditivo el cual provoca un proceso de atención. Parecen tener un papel en la regulación de las transiciones del ciclo sueño-vigilia ya que disparan antes de la transición NMOR-vigilia y dejan de disparar antes de entrar al sueño NMOR (Takahashi et al., 2006). Además, la liberación de histamina en la corteza prefrontal del ratas es 3.8 veces mayor durante la vigilia (Chu et al., 2004).

Finalmente estudios farmacológicos han mostrado que la administración de muscimol, un agonista GABérgico, en el hipotálamo posterior de gatos induce sueño y disminuye la latencia para que el animal se quede dormido, sugiriendo que la inhibición de este núcleo es necesaria para que el sueño ocurra (Lin et al., 1989). Estos hechos adicionalmente vienen a sustentar un poco más la importancia del hipotálamo posterior en la generación de la vigilia. Por otro lado, la administración de agonistas para el receptor a histamina 1 en el tegmento meso-pontino suprime la actividad lenta del EEG y aumenta la vigilia; mientras que un antagonista induce sueño NMOR y disminuye la vigilia (Lin et al., 1996). En este mismo sentido, la inhibición de la síntesis de histamina aumenta la cantidad de sueño NMOR y la inhibición de la degradación facilita la vigilia por periodos muy largos (revisado en Lin et al., 1996). En ratones knockouts para la histidina descarboxilasa se observa un patrón de sueño-vigilia alterado con mayor número de episodios de vigilia de menor duración comparado con el silvestre pero con la misma cantidad de vigilia. Los

animales presentaban dificultades para permanecer despiertos, por ejemplo en un ambiente novedoso se dormían fácilmente (Parmentier et al., 2002).

### **1.3.2 Sueño sin movimientos oculares rápidos**

#### **El hipotálamo**

Sterman y Clemente observan en 1962 que la estimulación del área preóptica y el cerebro basal anterior promueven sueño en gatos. Esta zona era conocida como *área de sincronización del cerebro basal anterior* (Sterman y Clemente 1962a, b). Por el contrario, la lesión del área preóptica suprime el sueño hasta por tres semanas en gatos. Este efecto es revertido por la administración de muscimol en el hipotálamo posterior (Sallanon et al., 1989). Además, la actividad del área preóptica ventrolateral (vlPOA) y medial (mPOA) evaluada mediante el registro de actividad unitaria y por la cantidad de células inmunoreactivas a c-FOS es mayor durante el sueño no MOR, disminuye durante el MOR y es casi ausente en la vigilia (Sherin et al., 1996; Szymusiak et al., 1998; Suntsova et al., 2002; Gong et al., 2004).

Las neuronas del mPOA se han relacionado con la señalización de la necesidad del dormir; es decir, con el componente homeostático del sueño, ya que su mayor activación se observa después de un periodo de privación de sueño mientras que las del vlPOA presentan su mayor activación después del dormir o del rebote de sueño. Estas neuronas son de tipo GABAérgicas (Gong et al., 2004; Gvilia et al., 2006). El núcleo preóptico mediano (MnPOA) envía proyecciones a el vlPOA, al HL, al núcleo supraóptico, a la banda diagonal de Broca y al área preóptica lateral, al LC, al RD, al LDT y a la vlPAG (Uschakov et al.,

2007). De hecho, la estimulación del MnPOA provoca la inhibición de neuronas relacionadas a la vigilia (orexinérgicas) y la excitación de neuronas relacionada al sueño (probablemente MCHérgicas) del HL; mientras que la inhibición del MnPOA tiene el efecto contrario (Suntsova et al., 2007).

El núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) localizado en el hipotálamo anterior es el principal promotor de sueño, tal como von Economo lo postuló (Figura 6). El VLPO contiene neuronas GABAérgicas y envían proyecciones a los núcleos promotores de la vigilia en el tallo cerebral como el PPT, LDT, LC y el RD. En el hipotálamo al núcleo tuberomamilar y el hipotálamo lateral (Chou et al., 2002; Sherin et al., 1998). Sugiriendo que cuando el VLPO se activa los núcleos promotores de la vigilia son inhibidos (Figura 6). Por otro lado, estudios invitado han mostrado que las neuronas del VLPO son inhibidas por acetilcolina, noradrenalina y serotonina (Gallopín et al., 2000).

La idea general es que el área preóptica tiene una salida inhibitoria sobre neuronas promotoras de vigilia y una excitadora sobre neuronas promotoras de sueño. Cuando se activa la transmisión GABAérgica, inhibe la actividad de los núcleos promotores de la vigilia y el sujeto se duerme. Por el contrario, cuando el sujeto está despierto dicha inhibición se ausenta, teniendo un papel permisivo en la actividad de los núcleos promotores de la vigilia (para una revisión más extensa sobre la interacción del VLPO con los núcleos promotores de vigilia ver Saper et al., 2005).

### **El tálamo**

Como ya lo mostraban los trabajos de lesiones y estimulación que revisamos al inicio del capítulo, el tálamo juega un papel importante en el sueño no MOR.

La participación del núcleo reticularis talámico (RT) en el sueño no MOR fue ampliamente estudiada por Mircea Steriade. Describió que esta fase presenta 3 oscilaciones principalmente: los usos de sueño, las oscilaciones lentas y el ritmo delta (Glenn y Steriade, 1982; Steriade, 2006). Steriade mostró que el RT es determinante en la generación de los usos del sueño, ya que su ablación o su desconexión de otras estructuras elimina dichos usos de sueño. Además, el polo rostral talámico y el complejo reticular pueden generar este ritmo aun después de su desconexión con otros núcleos del tálamo y de la corteza cerebral.

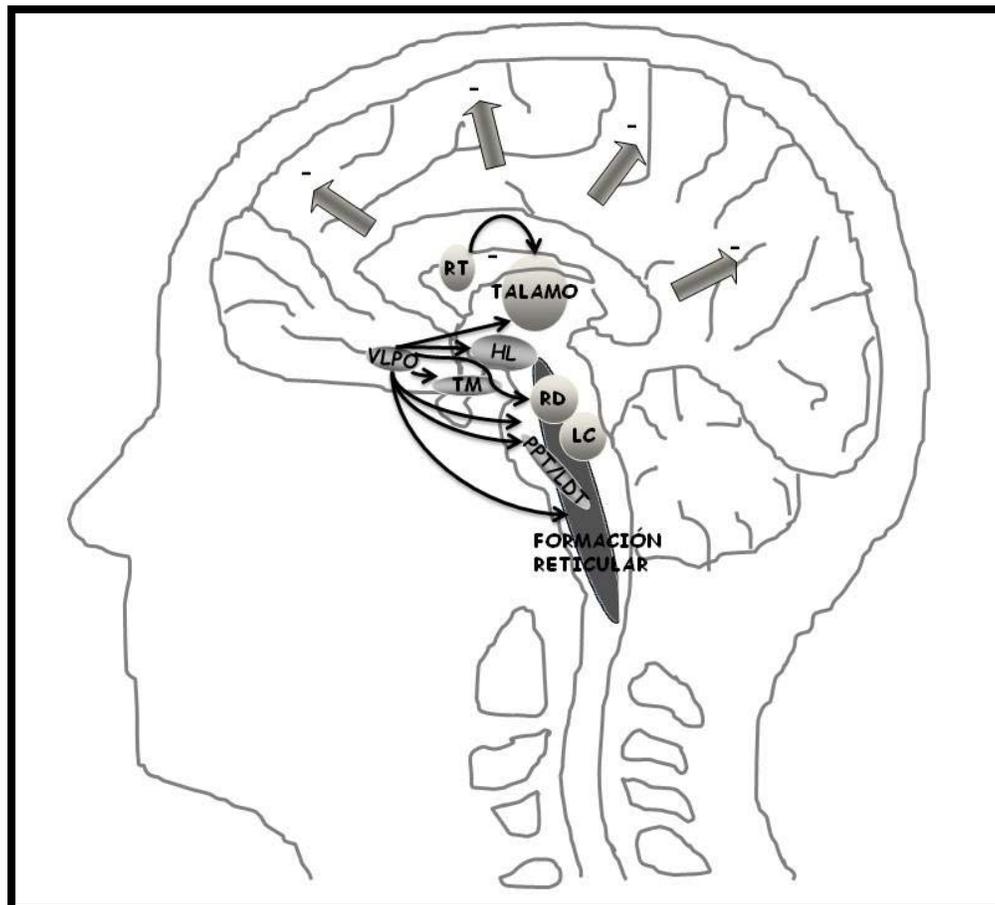


Figura 6. Red neuronal del sueño no MOR

Los husos de sueño son ondas de 7 a 14 Hz en secuencias de 1 a 2 segundos de duración que se repiten con una frecuencia lenta de 0.1 a 0.3 Hz. Este ritmo fue previamente descrito por Berger (Gloor, 1971). Los usos de sueño se producen por el disparo en salvas de las neuronas GABAérgicas del núcleo reticularis talámico, estas neuronas modulan la actividad de otras neuronas del tálamo y estas a su vez a las de la corteza cerebral; provocando finalmente la sincronización cortical que se puede registrar durante el sueño NMOR.

La inhibición de la entrada sensorial durante el sueño ocurre a nivel del tálamo, el núcleo VLPO envía proyecciones al núcleo dorsomedial del tálamo y aparentemente lo inhibe (Velayos y Reinoso-Suarez, 1985).

En resumen, durante el sueño NMOR las células GABAérgicas del VLPO se activan e inhiben a los núcleos promotores de la vigilia; adm el núcleo reticularis talamico promueve la desincronización cortical también por una transmisión GABAérgica. Gran parte de la neurotransmisión durante el sueño es GABAérgica, muchos fármacos que funcionan como anestésicos, ansiolíticos e inductores de sueño facilitan este tipo de transmisión.

### **1.3.3 Sueño de movimientos oculares rápidos (MOR)**

Durante el sueño MOR además de la inhibición del VLPO ocurre una regulación interesante a nivel del puente cerebral. La regulación colinérgica del sueño fue sugerida por los trabajos de Hernández Peón quien observó que la estimulación colinérgica del cerebro basal anterior, algunos núcleos hipotalámicos como el hipotálamo lateral y del mesencéfalo

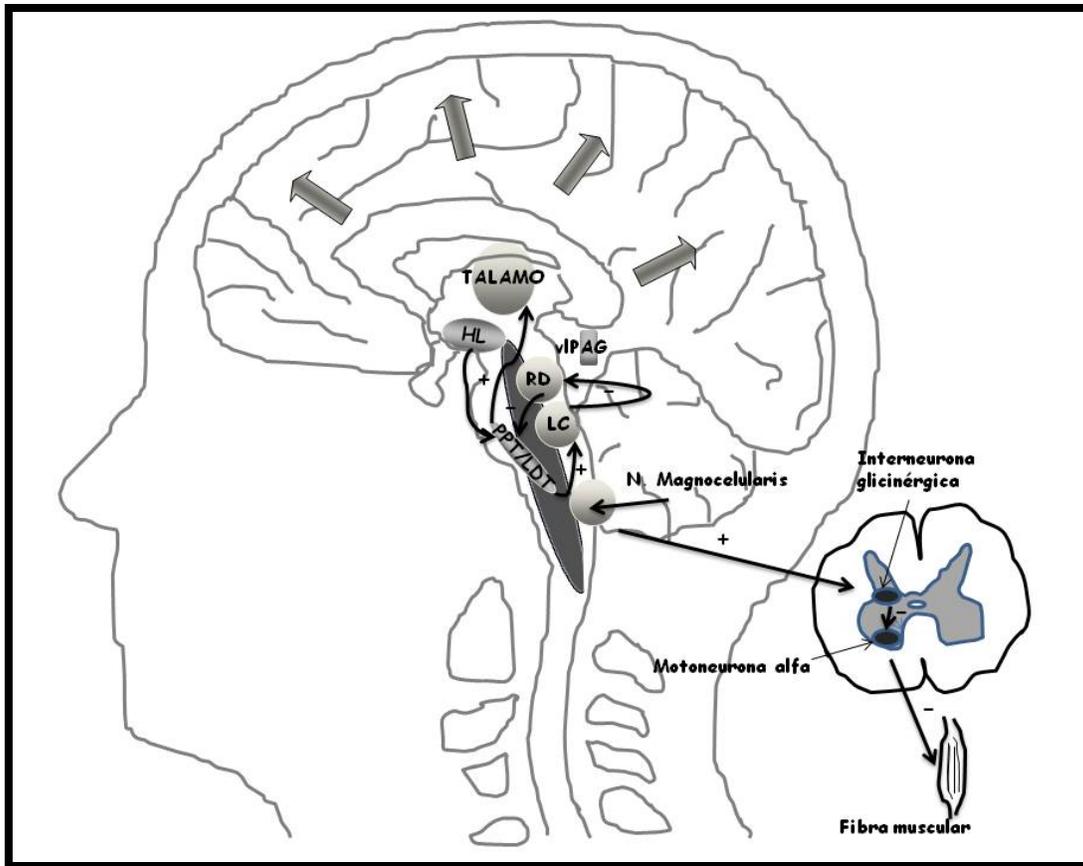
induce sueño en gatos (Hernández-Peón et al., 1963). Desde entonces diversos trabajos han mostrado que el sueño MOR tiene un componente colinérgico determinante. Por ejemplo, la inhibición de la degradación de la Ach en la formación reticular pontica pontina decimos los sueñólogos de gatos induce sueño MOR hasta en un 500% (Baghdoyan et al; 1984). Además, como revisamos en el apartado de vigilia, tanto las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior como las pontinas presentan una frecuencia alta de disparo durante el sueño MOR y la vigilia (Lee et al., 2005; Steriade et al., 1990).

La desincronización del EEG que se observa durante el sueño MOR se debe a que los núcleos colinérgicos disparan a frecuencias altas, estimulando al tálamo y finalmente a la corteza cerebral (McCormick, 1989; Steriade et al. 1990; Steriade et al., 1993). Además, durante el sueño MOR las neuronas del LC y del RD están acalladas (Hobson y McCarley, 1975; Jacobs y Fornal, 1991). La inhibición de estos núcleos esta mediado en parte por un aumento en la transmisión GABAérgica local (Nitz y Siegel, 1997). Ver figura 7.

Hobson y McCarley (1975) propusieron el modelo de la interacción recíproca para explicar la alternancia del sueño NMOR-MOR, ellos observaron en gatos que las neuronas colinoceptivas del FTG aumentan su tasa de disparo durante el sueño MOR mientras que las neuronas noradrenérgicas del LC se acallan. El modelo plantea una interacción recíproca entre los núcleos colinérgicos (PPT/LDT) y monoaminérgicos (LC, RD). Las neuronas colinérgicas inervan a las neuronas monoaminérgicas, enviando señales excitadoras. Los núcleos monoaminérgicos tienen conexiones inhibitorias con las neuronas colinérgicas, pero también tienen axones colaterales que las autoinhiben. De tal forma que, cuando un sujeto esta en sueño MOR las neuronas colinérgicas se activan y estimulan a las monoaminérgicas; después de un tiempo estas se activan inhibiendo a las colinérgicas,

entonces la fase de sueño MOR termina; instalándose el sueño NMOR. Las monoaminérgicas se autoinhiben después de un tiempo de estar activas, por lo tanto la inhibición que ejercían sobre las colinérgicas desaparece. Las neuronas colinérgicas disparan nuevamente y el sujeto presenta sueño MOR. El ciclo inicia hasta el despertar (Hobson y McCarley, 1975). Este modelo ha sido confirmado por varios experimentos. Por ejemplo, la administración de un agonista colinérgico, el carbacol en el FTG de gatos aumenta la cantidad de sueño MOR, por el contrario en el LC lo reduce (Amatruda et al., 1975). Además, la administración de 8-OH-DPAT, un agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (el cual inhibe la excitabilidad celular) en el RD de gatos disminuye la liberación de serotonina en un 50%; y aumenta en la cantidad de sueño MOR hasta en un 30%, en gatos (Portas et al., 1996).

Por otro lado, se ha propuesto que la atonía muscular está mediada por una proyección excitadora de los núcleos PPT y LDT al núcleo magnocelularis y paramediano del bulbo raquídeo; los cuales estimulan a interneuronas glicinérgicas de la medula espinal que a su vez inhiben a las motoneuronas alfa; impidiendo así la salida motora (Rechtschaffen y Siegel en Kandel et al., 2000). Al parecer, la hiperpolarización de la motoneurona es el mecanismo que permite la atonía muscular durante el sueño MOR (Chase y Morales; 1982a, 1982b). Sin embargo, Brooks y Peever (2008) muestran que el bloqueo de la transmisión GABAérgica y glicinérgica no previene la atonía muscular observada en el sueño MOR (Brooks y Peever, 2008); lo que ha generado una discusión con varios grupos de investigación (Chase, 2008; Soja, 2008).



**Figura 7. Red neuronal del sueño MOR.**

El grupo francés a cargo de Jouvet describió que la región del periLC- $\alpha$  esta relacionada con la atonía muscular durante el sueño MOR, ya que su destrucción provoca un sueño MOR con tono muscular (Sakai et al., 1979; Siegel en Kryeger et al., 2000). Esto debe estar modulado por las monoaminas pues la administración de NE, E y DA en el periLC- $\alpha$  caudal inhibe la atonía del sueño MOR; mientras que la NE y la E en el periLC- $\alpha$  rostral no tiene este efecto (Crochet y Sakai, 1999). El área del periLC- $\alpha$  caudal, es el equivalente a la región subladerodorsal (SLD) y la parte rostral el equivalente al precoeruleus (PC) que recientemente han sido descritas como zonas REM-on por el grupo de Saper en Harvard (Lu et al., 2006). Sin embargo, el trabajo de Crochet y Sakai, (1999)

indicaban ya esto al observar que la administración de NE y E en el área del periLC- $\alpha$  suprime el sueño MOR; mientras que, la administración de ACh aumenta el sueño MOR. También se ha mostrado que la DA administrada en el periLC $\alpha$  inhibe de forma dosis dependiente el sueño MOR (Crochet et al., 2003). Lu et al. (2006) confirman que la región del pre-coeruleus afecta el componente electroencefalográfico del sueño MOR y el tegmento mesencefálico afecta al componente motor (Lu et al., 2006). Además, muestran que la vIPAG y el tegmento pontino lateral (LPT) contienen neuronas REM-off, ya que su lesión provoca un aumento de sueño MOR (Lu et al., 2006). Esta noción había sido sugerida por Sastre et al. (1996), quien mostró que la administración de muscimol (agonista del receptor GABA<sub>A</sub>) en la vIPAG aumenta el sueño MOR hasta un 100%. Complementariamente, la administración de bicuculina (antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>) disminuye la cantidad de sueño MOR en gatos (Sastre et al., 1996). De igual forma, Crochet et al., (2006) mostró que la administración de muscimol en la región dorsocaudal del campo tegmental central de gatos aumenta la cantidad de sueño MOR (esta región sería equivalente a LPT). Por el contrario la administración de ácido kaínico y NMDA disminuye la cantidad de sueño no MOR y MOR (Crochet et al., 2006).

## 1.4 Una visión integrada del sistema ejecutor

Todos los datos revisados en el apartado 1.3 dibujan un modelo de las redes neuronales que producen el sueño y la vigilia. Revisémoslo.

La red neuronal de la vigilia está formada por neuronas del cerebro basal anterior (CBA), del hipotálamo lateral (HL), del núcleo tuberomamilar (TM), del rafe dorsal (RD), del locus coeruleus (LC), y de los núcleos latero-dorsal tegmental y pedúnculo pontino tegmenta. Las proyecciones de estos núcleos forman el sistema reticular activador ascendente (SRAA) descrito por Moruzzi y Magoun; durante la vigilia los núcleos del puente estimulan al tálamo a través del SRAA, el tálamo a su vez envía proyecciones excitadoras a la corteza cerebral donde se integra la información interna y externa del sujeto. La activación de las células de la corteza cerebral por la activación del SRAA se puede registrar en un EEG desincronizado y es lo que llamamos vigilia.

La red neuronal del sueño la forma el área preóptica (AP) y el núcleo reticularis talámico, (RT) así como algunos núcleos del puente y del mesencéfalo que participan en el sueño MOR como PPT, LDT, el área sublaterodorsal (SLD), la sustancia gris periacueductal ventrolateral (vlPAG) y el peri-coeruleus (PC). El sueño se inicia con la activación del AP que contiene neuronas GABAérgicas, sus proyecciones inhibitoras apagan a la red neuronal de la vigilia formada por el HL, el TM, el RD, el LC y el PPT/LDT. El RT promueve la actividad cortical sincronizada que se puede registrar como ondas lentas en el EEG.

El sueño y la vigilia resultan de la interacción recíproca entre la red neuronal de la vigilia y la del sueño; durante la vigilia los núcleos promotores de la vigilia inhiben activamente al AP y durante el sueño estos núcleos son inhibidos por el AP.

El sueño MOR ocurre también por una interacción recíproca entre núcleos promotores e inhibidores del sueño MOR localizado a nivel proto-mesencefálico (Hobson y McCarley, 1975). Cuando el sueño MOR se presenta, los núcleos promotores del sueño MOR como el PPT-LDT, el SLD y la PC se activan; mientras que los núcleos inhibidores del sueño MOR como el LC, el RD y el vIPAG se acallan. No se debe olvidar que al mismo tiempo el AP esta inhibiendo a los otros núcleos promotores de vigilia como el HL.

Estas redes neuronales forman el sistema ejecutor del sueño y la vigilia. Le denomino sistema ejecutor porque como revisamos a lo largo del apartado 1.3 cada núcleo cerebral de este sistema es necesario para que el sueño o la vigilia ocurran. Finalmente, debemos concluir que el sueño y la vigilia son producto de redes neuronales que interactúan recíprocamente, poniendo de manifiesto la entidad que forman.

## 1.5 Conclusiones

El sueño y la vigilia son estados de conciencia generados por la actividad coordinada de grupos neuronales específicos que forman sistemas neuronales.

La investigación científica del sueño inició al colocarlo como un fenómeno fisiológico susceptible de ser estudiado por la fisiología. Durante todo el siglo XX múltiples grupos de investigación se dedicaron a localizar el centro del sueño y la vigilia.

Los descubrimientos de Economo, Berger, Bremer, Hess, entre otros, permitieron el estudio de la neurobiología de moderna del sueño y la vigilia.

Cuando un sujeto duerme el sistema neuronal del sueño se activa y el de la vigilia es inhibido; cuando estamos despiertos ocurre lo contrario. Desde un punto de vista funcional, existe al mismo tiempo un cerebro que duerme, mientras que otro permanece despierto. Esto es decir, que cuando un sujeto duerme, hay un “cerebro” que activamente (despierto) hace dormir al otro. Este otro es el que está activo (despierto) durante la vigilia conductual y que activamente hace dormir (inactiva) al primero (Montes-Rodríguez y cols., 2006). Esto queda de manifiesto en la inhibición de los núcleos promotores de la vigilia por acción del AP durante el sueño; y la inhibición del AP por los neurotransmisores de la vigilia (REF).

El tálamo, el hipotálamo y el puente cerebral forman el sistema neuronal ejecutor del sueño y la vigilia.

## 1.6 Referencias

- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*. 2007 Nov 15;450(7168):420-4.
- Adrian ED (1971) The discovery of Berger. En *Handbook of electroencephalography and clinical neurophysiology*. A. Rémond (Ed.). Vol. 1, Part A. Evolution of Clinical Neurophysiology since Hans Berger. W.A. Cobb (Ed.); Amsterdam : Elsevier
- Amatruda TT III, Black DA, McKenna TM, McCarley RW, Hobson JA (1975) Sleep cycle control and cholinergic mechanisms: differential effects of carbachol injections at pontine brain stem sites. *Brain Res* 98: 501-15.
- Aserinsky E, Kleitman N (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-4.
- Aston-Jones G, Bloom FE (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1:876-86.
- Astrobis J, Balter M, Battles J, Berger R, Bliwise D, Carskadon M, et al. (1993) *Basics of Sleep Behavior*. USA: Sleep Research Society.
- Baghdoyan HA, Monaco AP, Rodrigo-Angulo ML, Assens F, McCarley RW, Hobson JA (1984) Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs. *J Pharmacol Exp* 231:173-80.
- Bentivoglio M, Grassi-Zucconi G (1997) The pioneering experimental studies on sleep deprivation. *Sleep* 20: 570-6.
- Berridge CW (2008) Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev* 58:1-17.
- Berridge CW, Foote SL (1996) Enhancement of behavioral and electroencephalographic indices of waking following stimulation of noradrenergic beta-receptors within the medial septal region of the basal forebrain. *J Neurosci* 16:6999-7009.
- Berridge CW, Isaac SO, España RA (2003) Additive wake-promoting actions of medial basal forebrain noradrenergic alpha1- and beta-receptor stimulation. *Behav Neurosci* 117:350-9.
- Bremer F (1935) Cerveau 'isolé' et physiologie du sommeil. *Société de Biologie (Paris)* 118: 123541.
- Brooks PL, Peever JH (2008) Glycinergic and GABA(A)-mediated inhibition of somatic motoneurons does not mediate rapid eye movement sleep motor atonia. *J Neurosci* 28:3535-45.

- Chase MH (2008) Confirmation of the consensus that glycinergic postsynaptic inhibition is responsible for the atonia of REM sleep. *Sleep* 31:1487-91; discussion 1492-7
- Chase MH, Morales FR (1982a) Phasic changes in motoneuron membrane potential during REM periods of active sleep. *Neurosci Lett* 34:177-82.
- Chase MH, Morales FR (1982b) Repetitive synaptic potentials responsible for inhibition of spinal cord motoneurons during active sleep. *Exp Neurol* 78: 471-6.
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB (2002) Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 22:977-90.
- Crochet S, Onoe H, Sakai K (2006) A potent non-monoaminergic paradoxical sleep inhibitory system: a reverse microdialysis and single-unit recording study. *Eur J Neurosci*. Sep;24(5):1404-12
- Crochet S, Sakai K (1999) Effects of microdialysis application of monoamines on the EEG and behavioural states in the cat mesopontine tegmentum. *Eur J Neurosci* 1: 3738-52.
- Crochet S, Sakai K (2003) Dopaminergic modulation of behavioral states in mesopontine tegmentum: a reverse microdialysis study in freely moving cats. *Sleep* 26:801-6
- Davis PA, Loomis AL, Harvey EN, Hobart G (1937) Changes in human potentials during the onset of sleep. *Science* 86: 148-50.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-7.
- De Lecea L, Sutcliffe JG (2005) The hypocretins and sleep. *FEBS J* 272:5675-88.
- Flanagan O (2003) *Almas que sueñan. Dormir, soñar y la evolución del pensamiento consciente.* México: Oxford University Press.
- Fornal CA, Litto WJ, Metzler CW, Marrosu F, Tada K, Jacobs BL (1994) Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT<sub>1A</sub> agonist and antagonist drug administration in behaving cats. *J Pharmacol Exp Ther* 270:1345-58.
- Freud S (1992) *La interpretación de los sueños.* México: Alianza Editorial.
- Fuxe K, Hamberger B, Hökfelt T (1968) Distribution of noradrenaline nerve terminals in cortical areas of the rat. *Brain Res* 8:125-31
- Gallopin T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Mühlethaler M, Serafin M. (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404:992-5.
- Gallopin T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Mühlethaler M, Serafin M (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404:992-5.

- Glenn LL, Steriade M (1982) Discharge rate and excitability of cortically projecting intralaminar thalamic neurons during waking and sleep states. *J Neurosci* 2:1387-404.
- Gloor P (1971) The work of Hans Berger. En *Handbook of electroencephalography and clinical neurophysiology: A. Rémond (Ed.), Vol. 1, Part A. Evolution of Clinical Neurophysiology since Hans Berger . W.A. Cobb (Ed.). Amsterdam : Elsevier*
- Gong H, McGinty D, Guzman-Marin R, Chew KT, Stewart D, Szymusiak R (2004) Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *Physiol* 556:935-46.
- Gruart A, Delgado JA, Escobar C, Aguilar Roblero R (2002) Los relojes que gobiernan la vida. México: Fondo de Cultura Económica. Pp. 45-78.
- Gvilia I, Xu F, McGinty D, Szymusiak R (2006) Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *J Neurosci* 26:9426-33.
- Hernández-Peón T, Chávez-Ibarra P, Morgan PJ, Timo-Iaria C (1963) Limbic Cholinergic Pathways Involved in Sleep and Emotional Behavior. *Exp Neurol* 8: 93-111.
- Hobson A (2004) Los sueños como delirio. Cómo perder el cerebro pierde el juicio. México: Fondo de Cultura Económica.
- Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189: 58-60.
- Holmes CJ, Mainville LS, Jones BE (1994) Distribution of cholinergic, GABAergic and serotonergic neurons in the medial medullary reticular formation and their projections studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience* 62:1155-78.
- Howell W H (1913) Le problème physiologique du Sommeil by Henri Piéron. *Science* 1913; 525-26.
- Jacobs BL, Fornal CA (1991) Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev* 43: 563-78.
- Jones BE (2005) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci* 26:578-86.
- Jones BE, Halaris AE, McIlhany M, Moore RY (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res* 127:1-21.
- Jouvet M (1961) "Telencephalic and rhombencephalic sleep in the cat". *The Nature of Sleep Ciba Foundation Symposium.*
- Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science.* USA: McGraw-Hill.

- Kiyashchenko LI, Mileykovskiy BY, Maidment N, Lam HA, Wu MF, John J, Peever J, Siegel JM (2002) Release of hypocretin (orexin) during waking and sleep states. *J Neurosci* 22:5282-6.
- Kocsis B, Vertes RP (1992) Dorsal Raphe Neurons: Synchronous discharge with theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat. *J Neurophysiol* 68: 1463-66.
- Kodama, Honda (1999) Acetylcholine and glutamate release during sleep-wakefulness in the pedunculopontine tegmental nucleus and norepinephrine changes regulated by nitric oxide. *Psychiatry Clin Neurosci* 53:109-11.
- Kryger MH, Rith T, Dement WC (2000) *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 3rd Edition. U.S.A.: W.B. Saunders Company.
- Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE (2005a) Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 25:4365-9.
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE (2005b) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25:6716-20.
- Legendre R, Piéron H (1912) De la propriété hypnotoxique des humeurs développée au cours d'une veille prolongée C.R. *Société de Biologie de Paris* 70: 210-2
- Levitt P, Moore RY (1978) Noradrenaline neuron innervation of the neocortex in the rat. *Brain Res* 139:219-31.
- Lin JS, Hou Y, Sakai K, Jouvet M (1996) Histaminergic descending inputs to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat. *J Neurosci* 16:1523-37.
- Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M (1989). A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res* 479:225-40.
- Llinás R, Ribary U (2001) *Consciousness and the Brain. The thalamocortical dialogue in health and disease.* *Ann N Y Acad Sci* 929:166-175
- Loomis AL, Harvey EN, Hobart G (1935a) Potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science* 81: 597-8.
- Loomis AL, Harvey EN, Hobart G (1935b) Further Observations on the Potential Rhythms of the Cerebral Cortex during Sleep. *Science* 82: 198-200.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441: 589-94.
- Manacéine M (1897) "Sleep: Its physiology, pathology, hygiene and psychology". London: Walter Scott Pub Co Ltd.

- McCormick DA (1989) Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci* 12:215-21.
- Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*. Jun 2;46(5):787-98.
- Monnier M, Kalberer M, Krupp P (1960) Functional antagonist between diffuse reticular and intralaminary recruiting projections in the medial thalamus. *Exp Neurol* 2: 271-89.
- Montes-Rodríguez CJ, Rueda-Orozco PE, Urteaga-Urías E, Aguilar-Roblero R, Prospero-García O (2006) De la restauración neuronal a la reorganización de los circuitos cerebrales. *Rev Neurol* 43:409-15.
- Moruzzi G, Mogoun HW (1949) Brain Steam Reticular Formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:455-73.
- Nauta W J H (1946) Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J Neurophysiol* 9: 285-316.
- Parmentier R, Ohtsu H, Djebbara-Hannas Z, Valatx JL, Watanabe T, Lin JS (2002) Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *J Neurosci* 22:7695-711
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015
- Portas CM, Bjorvatn B, Fagerland S, Grønli J, Mundal V, Sørensen E, Ursin R (1998) On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat. *Neuroscience* 83: 807–814.
- Portas CM, Thakkar M, Rainnie D, McCarley RW (1996) Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. *J Neurosci* 16:2820-8.
- Prospero-García O, Drucker-Colín R (1996) Control Neural del Ciclo Vigilia-Sueño: Mecanismos Neurofisiológicos y Neuroquímicos. Factores Inductores del Sueño. En Ramos Platón JM (Ed.) *Sueño y Procesos Cognitivos*. Madrid, España: Síntesis Psicología.
- Ranson S W (1934) Sleep. *The scientific monthly* 38: 473-476.
- Sakai K, Sastre JP, Salvert D, Touret M, Tohyama M, Jouvet M (1979) Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study. *Brain Res* 176:233-54

- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-85.
- Sallanon M, Denoyer M, Kitahama K, Aubert C, Gay N, Jouvet M (1989) Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. *Neuroscience* 32: 669-83.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437:1257-63.
- Sastre JP, Buda C, Kitahama K, Jouvet M (1996) Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience* 74:415-26.
- Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB (1998) Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 18:4705-21.
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216-9.
- Siegel J (2004) Brain mechanisms that control sleep and waking. *Naturwissenschaften* 91:355-65.
- Soja PJ (2008) Glycine-mediated postsynaptic inhibition is responsible for REM sleep atonia. *Sleep* 31(11):1483-6; discussion 1492-7.
- Steriade M (2006) Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137:1087-106.
- Steriade M, Datta S, Paré D, Oakson G, Curró Dossi RC (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10:2541-59.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-85.
- Sterman MB, Clemente CD (1962a) Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. *Exp Neurol* 6:91-102.
- Sterman MB, Clemente CD (1962b) Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Exp Neurol* 6:103-17.

- Suntsova N, Guzman-Marin R, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D (2007) The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *J Neurosci* 27:1616-30.
- Suntsova N, Szymusiak R, Alam MN, Guzman-Marin R, McGinty D (2002) Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol* 543:665-77.
- Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 803:178-88.
- Takahashi K, Lin JS, Sakai K (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci*. 26:10292-8.
- Tohyama M, Maeda T, Shimizu N (1974) Detailed noradrenaline pathways of locus coeruleus neuron to the cerebral cortex with use of 6-hydroxydopa. *Brain Res* 79: 139-144
- Triarhou L C (2006a) The percipient observations of Constantin von Economo on encephalitis lethargica and sleep disruption and their lasting impact on contemporary sleep research. *Brain Res Bull* 2006 69: 244-58
- Triarhour L C (2006b) The signalling contributions of Constantin von Economo to basic, clinical and evolutionary neuroscience. *Brain Res Bull* 69:223-43
- Uschakov A, Gong H, McGinty D, Szymusiak R (2007) Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience* 150:104-20.
- Vanni-Mercier G, Gigout S, Debilly G, Lin JS (2003) Waking selective neurons in the posterior hypothalamus and their response to histamine H3-receptor ligands: an electrophysiological study in freely moving cats. *Behav Brain Res* 144:227-41.
- Velayos JL, Reinoso-Suarez F (1982) Topographic organization of the brainstem afferents to the mediodorsal thalamic nucleus. *J Comp Neurol* 206:17-27.
- Velayos JL, Reinoso-Suárez F (1985) Prosencephalic afferents to the mediodorsal thalamic nucleus. *J Comp Neurol* 242:161-81.
- Vertes RP (1979) Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat. *J Neurophysiol* 42:214-28.
- Vertes RP, Colom LV, Fortin WJ, Bland BH (1993) Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res* 96:419-29.
- Wada H, Inagaki N, Itowi N, Yamatodani A (1991) Histaminergic neuron system in the brain: distribution and possible functions. *Brain Res Bull* 27:367-70.

## **CAPITULO 2. LA PRIVACIÓN DE SUEÑO COMO UNA APROXIMACIÓN METODOLÓGICA A LAS FUNCIONES DEL SUEÑO**

La preservación de ciclo sueño-vigilia entre especies sugiere que el dormir debe cumplir con funciones biológicas para la sobrevivencia de los organismos. Se ha propuesto que el sueño tiene una función importante en el desarrollo neuronal, en la restauración celular, en el balance energético, en la excitabilidad neuronal, en la optimización de los procesos cognitivos y en la consolidación de la memoria (Reimund,1994; Benington y Heller, 1995; Akersted y Nilsson, 2003; Benington y Frank, 2003; Morrissey et al., 2004; Siegel, 2005; Stickgold, 2005; Sculze, 2004) . Sin embargo, aunque existe evidencia a favor de muchas de estas teorías, aún no contamos con una imagen integrada de cómo beneficia el sueño a los organismos, pues hacen falta esfuerzos por agrupar los abundantes datos experimentales.

### **2.1 La privación de sueño como una aproximación metodológica a las funciones del sueño**

Dentro de la tradición fisiológica, el estudio de las funciones biológicas se hace básicamente mediante dos aproximaciones experimentales: la estimulación, o la ablación del sistema y el registro de lo que ocurre. El estudio del sueño no es una excepción. Como veremos en este capítulo, muchos de los datos acerca de la neurofisiología del sueño y

sobre todo, aquellos que pretenden elucidar sus funciones, se han producido al estudiar los efectos que la privación del sueño (PS) tiene sobre diversas variables fisiológicas. Las preguntas científicas generales que le hemos hecho a la PS siguen intuiciones humanas básicas: ¿Qué pasa si no dormimos?, ¿Por cuánto tiempo podemos permanecer despiertos?, ¿Dormimos más después de una vigilia prolongada? Y, a pesar de que muchos grupos de investigación han trabajado por mucho tiempo en responder estas preguntas, aún hace falta establecer los mecanismos cerebrales específicos que son afectados por la PS.

Las estrategias experimentales de la PS tienen dos limitaciones generales que deben considerarse para la interpretación de los datos experimentales:

a) La cantidad de datos generados con la manipulación de PS es enorme, y hasta ahora no hemos realizado el esfuerzo suficiente para organizarlos y construir a partir de ellos una explicación integrada del beneficio del dormir para los organismos.

b) En términos del ciclo sueño-vigilia, la PS es un estado de vigilia prolongada; es decir, una alteración del ritmo biológico que suspende temporalmente la expresión de la neurofisiología normal del sueño. En este contexto, la conducta del sujeto, así como su fisiología implican la activación de acciones fisiológicas compensadoras (ver apartado sobre PS y homeostasis del sistema). Esto plantea problemas de interpretación que son propios de la investigación fisiológica, consistentes en utilizar evidencias de un sistema alterado para explicar las funciones normales. En este contexto, los efectos observados después de la PS pueden deberse a la ausencia de sueño o a la intromisión de otras variables debidas a la vigilia prolongada, como es el caso del estrés inherente a la manipulación.

A pesar de estos problemas metodológicos, el panorama es prometedor. La PS, como manipulación experimental para entender la(s) función(es) del sueño ha sido primordial en la historia del estudio científico del sueño. La PS ha sido una fuente generosa del conocimiento que hoy tenemos y representa, junto con las técnicas moleculares y electrofisiológicas que se han utilizado para evaluar sus efectos, una de nuestras más poderosas herramientas en la búsqueda de las funciones del sueño.

Planteo dos consideraciones importantes para hacerle frente a las limitaciones de la manipulación de PS mencionadas arriba, con el objetivo de utilizar y comprender adecuadamente los datos generados a partir de dicha manipulación:

a) Reconsiderar a la PS como una alteración sistémica implica considerar nuevos conceptos teóricos que permitan integrar los datos de la PS en sistemas funcionales. Un ejemplo es el concepto de alostasis (ver apartado sobre PS y homeostasis del sistema).

b) Es necesarios distinguir los diferentes niveles empíricos que podemos abordar en las manipulaciones de privación de sueño y que obviamente están relacionados con distintos niveles biológicos de explicación. Para esto, propongo tres niveles: 1) el celular-estructural, 2) el celular-funcional, y 3) el sistémico-conductual (ver apartado 2. 4).

En resumen, en este capítulo revisaré lo que es la manipulación de PS y los problemas metodológicos que presenta; los datos sobre PS en términos generales y en cada uno de los niveles arriba mencionados (el nivel celular-estructural será detallado en el capítulo 3). Los estudios que integran estos niveles de análisis incluyen procesos de transducción y transcripción celular, sobrevivencia neuronal, estrés oxidante, excitabilidad neuronal, así como de aprendizaje y memoria. Todos evaluados bajo diferentes condiciones de PS.

Finalmente, daré un panorama global de los datos más sólidos sobre PS y como contestan las preguntas acerca de las funciones del sueño.

### **2.1.1 La privación de sueño**

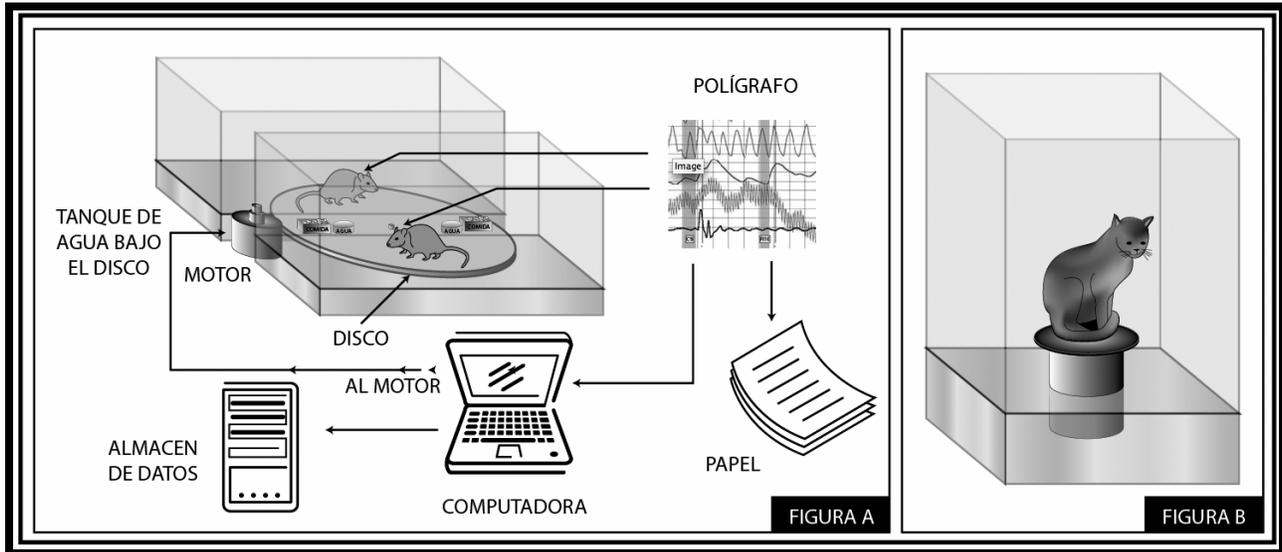
La privación de sueño (PS) es una manipulación experimental donde se evita que un sujeto duerma. Se puede privar de sueño en forma total o de forma selectiva a la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) o la fase de sueño sin movimientos oculares rápidos (NMOR). La PS se puede hacer en forma aguda o crónica. Los modelos animales más utilizados son ratas, ratones y gatos; aunque algunos grupos de investigación utilizan también conejos.

La privación selectiva de sueño NMOR (PSNMOR) metodológicamente es difícil, pues como sabemos para que un sujeto llegue a sueño MOR antes debe pasar por NMOR otra (a menos que sea un paciente con narcolepsia). Además, la fase de sueño NMOR ocupa casi el 80% del sueño total y el MOR el otro 20%. A pesar de esto se ha intentado privar selectivamente de sueño NMOR pero los resultados muestran una privación de sueño casi total. La privación selectiva de sueño MOR (PSMOR) y la privación de sueño total (PST) son las manipulaciones más empleadas. Revisemos los métodos que se han diseñado (Ramos-Platón, 2006 en Ramos-Platón, 2006).

### **2.2.1 Privación de sueño total**

La privación de sueño total (PST) por largos periodos, por ejemplo semanas, se hace generalmente con un sistema automatizado, diseñado por el grupo de Rechtschaffen (Rechtschaffen y cols., 1983; Bergmann y cols., 1989). En este sistema registra la actividad

cerebral del sujeto, y, en el momento en que se presenta la actividad lenta en el EEG (lo cual indica somnolencia) se activa un sistema que hace girar el disco sobre el cual está el sujeto. Este giro hace que el sujeto caiga dentro de un recipiente con agua, impidiendo que el sujeto duerma (Fig. 1a). Este sistema tiene la ventaja de poder utilizar una rata “control”, la cual comparte el disco. Cuando la rata experimental se duerme, ambas ratas caen al agua, pero si la experimental no se duerme, entonces la rata control puede dormir todo el tiempo. Esto permite tener a una rata en exactas mismas condiciones experimentales que la privada de sueño, pero que puede dormir y tratar de recuperar su débito de sueño.



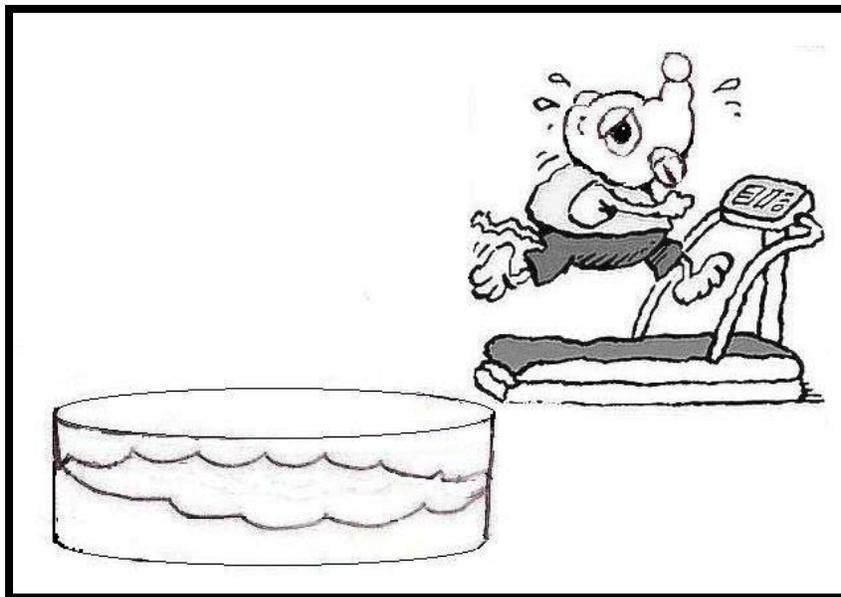
**Figura 1. Aparatos utilizados para privar de sueño. A) Privador de sueño desarrollado por el grupo de Rechtschaffen, el sujeto está conectado a un sistema automatizado que cuando detecta actividad lenta en el EEG mueve un disco que esta sobre un tanque de agua, así el sujeto no puede dormir. B) Método de la isleta, utilizado para privar selectivamente de sueño MOR, el sujeto esto colocado sobre una plataforma rodeada de agua, cada que se presenta un episodio de sueño MOR pierde el tono muscular y cae al agua.**

La PST puede hacerse también por el método de la manipulación gentil. el cual consiste en estimular al animal, tocándolo, introduciendo objetos novedosos en su jaula o cambiándolo de ambiente cada que presenta indicios de somnolencia. La dificultad de este método es el alto gasto energético humano en privaciones de largos periodos de sueño, por

lo que se utiliza generalmente para periodos cortos. La mayoría de los estudios reportan tiempos máximos de 12 y hasta 24 h en animales; en humanos se reportan hasta 72 h. Algunos trabajos utilizan la banda sin fin, que consiste en una banda que rota constantemente. La banda giratoria obliga al animal a moverse, ya que de no hacerlo cae en un pequeño tanque de agua (Fig. 2).

### 2.2.2 Privación selectiva de sueño MOR

La técnica de florero o plataforma invertida es la más utilizada para privar selectivamente de sueño MOR. Desde su diseño en 1964 se ha producido una extensa literatura que utiliza esta técnica (Jouvet, 1964; revisado en Coenen y cols., 1985). Esto puede deberse a que este método es de bajo costo, muy práctico y muy eficiente.



**Figura 2.** La banda sin fin es otro método utilizado para privar de sueño. Se coloca al sujeto sobre una banda giratoria que al final tiene un recipiente con agua, si el sujeto se duerme puede caer al agua.

A este método se le conoce también como el método de la isla, ya que consiste en colocar al sujeto experimental en una plataforma rodeada de agua (Fig. 1b). Debido a que

durante el sueño MOR hay pérdida de tono muscular, cuando el animal presenta esta fase de sueño puede caer al agua. La plataforma debe ser muy pequeña (la medida más utilizada es de 6.2 cm para ratas) para que el sujeto no pueda acostarse sobre ella. De esta forma, el sujeto presenta periodos de sueño NMOR pero no de sueño MOR. También se puede privar de sueño MOR por el método automatizado. Como es de esperarse el disco en donde se encuentra la rata se moverá cada vez que el sujeto intente dormir en esta fase.

Otra variante del método de la isla son las llamadas plataformas múltiples, consiste en colocar al sujeto en una caja con varias isletas en lugar de una sola, sigue el mismo principio de plataformas chicas para la privación selectiva de sueño MOR y grandes para los controles de la privación. Las plataformas permiten que el animal se desplace sin tocar el agua, pero están suficientemente separadas como para que no permitan que el animal se acueste. Esta variante se ha usado buscando disminuir el estrés que confiere el propio método, pues el animal se puede mover con más libertad y existe una interacción social entre los sujetos.

## **2.2 Problemas metodológicos de la privación de sueño**

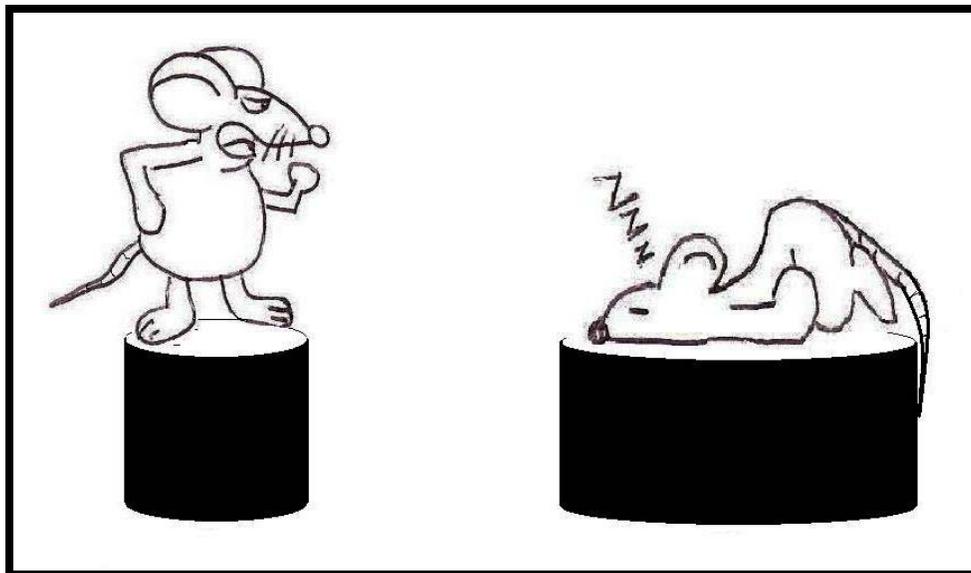
Los métodos de PS presentan una dificultad experimental inherente a la manipulación. Al alterarse el ciclo sueño-vigilia el organismo se encuentra en una situación atípica, que implica una demanda adicional para sus sistemas neurofisiológicos. En ese sentido, la principal limitación de la PS es que está inherentemente acompañada de un componente de estrés provocado por la manipulación y las características de los aparatos (Coenen, 2001). Por ejemplo, en el método de la isla, el estar rodeado de agua y la relativa

inmovilización del animal pueden considerarse como estresores adicionales a la manipulación de PSMOR. En algunos laboratorios, como el nuestro, hemos hecho una pequeña modificación al método de la isla, que consiste en poner solo una pequeña cantidad de agua rodeando la plataforma, por ejemplo, 2 cm de profundidad. De tal forma que las ratas pueden bajarse de la plataforma y desplazarse. De esta manera, el componente de restricción motora se reduce. Con todo, aun nos quedan diversos componentes que *per se* pueden provocar estrés. La solución que se ha dado a este problema es el incluir en las investigaciones grupos controles de estrés. Estos grupos están bajo las mismas condiciones estresantes de la manipulación (por ejemplo, humedad e inmovilización en el caso de sueño MOR) excepto que estos sujetos pueden dormir libremente. De esta forma, para poder hablar de un efecto por la PS, se espera que las modificaciones observadas en los grupos bajo PS sean diferentes a los controles de estrés, y los controles no sean diferentes a los controles de caja (CC). Llamamos así a los CC porque han permanecido en condiciones de bioterio, sin estresores diferentes a los que habitualmente reciben y creemos que son muy pocos. Si el control de estrés y el grupo bajo PS presentan las mismas modificaciones, muy probablemente estemos hablando de cambios inducidos por el estrés y no por la ausencia de sueño. En este sentido, creemos que el sistema desarrollado por Rechtschaffen y sus colaboradores es un excelente sistema. Curiosamente su utilización no ha dado más información sobre las funciones del sueño que la que ofrecen los otros métodos.

El control de estrés para la PSMOR consiste en una plataforma grande (12.8 cm) rodeada de agua. Es decir, el sujeto esta bajo los mismas condiciones de temperatura e inmovilización (aunque ya dijimos que nosotros reducimos la inmovilización al reducir la profundidad del agua) pero puede dormir en sueño MOR, pues el tamaño de la plataforma lo permite (Fig. 3). Los niveles de corticosterona en plasma de ratas bajo esta

manipulación están elevados después de 72 h de PSMOR en la misma proporción que el control de plataforma grande, indicando que presentan los mismos niveles de estrés (Coenen y VanLuijelaar , 1985).

En el caso de la PST por el método automatizado (donde la rata debe caminar cada que el sistema rota el disco o se cae al agua) se utiliza una rata control, como ya mencionamos arriba, que también va a caminar cada que la rata experimental intente dormir, pero la rata control puede dormir en los periodos en que la rata experimental no se duerma (Fig. 1a). En este caso se ha detectado que hay un incremento en los niveles de corticosterona en las ratas bajo PS con respecto a sus controles; sin embargo, los niveles de ACTH no cambian (Rechtschaffen y cols., 1989).



**Figura 3. Control de estrés para la privación selectiva de sueño MOR. El método de de la isleta incluye una plataforma pequeña que evita al sujeto recargarse y dormir (izquierda), el control de estrés de este método tiene una plataforma suficientemente grande para que el sujeto duerma (derecha).**

Algunos trabajos utilizan la banda sin fin (Fig. 2). El control de estrés de esta manipulación es un control de ejercicio. Esto se debe a que la principal crítica de esta manipulación es que el animal se fatiga después de caminar durante largos periodos de

tiempo y los efectos observados serían debido al ejercicio. Debe quedar claro, sin embargo, que la banda sin fin se mueve a una velocidad muy lenta. Esto en realidad permite que el animal duerma por algunos segundos, que son los que tarda en que la banda lo desplace desde un extremo del aparato al otro. Por ejemplo, un gato sobre una banda sin fin que mide 2 metros de longitud y que se mueve a 120 m/h, puede dormir por un minuto si se relaja en el extremo inicial (no hay tanque de agua) y se despierta en el extremo final (en donde está el tanque de agua). Es pertinente mencionar que el nivel de agua en el tanque es de un máximo de 5 cm, por lo que queda claro que lo que se persigue es darle al gato un estímulo aversivo que lo alerte. También es pertinente mencionar que los animales aprenden a calcular el tiempo que tardan en llegar al extremo final, por lo que después de una corto tiempo (10-15 min), ya no vuelven a tocar el agua. Se ha observado que esta manipulación promueve que los niveles de corticosterona y ACTH en plasma de ratas aumenten al compararlo con el control. El aumento se estabiliza desde las 12 h y hasta las 48 h permanece arriba con los mismos niveles. Además, la PST aguda (48 h) y crónica (7 días) modifican la respuesta del sistema de estrés (evaluado por ACTH y corticosterona) ante un estresor (en este caso estrés por inmovilización). Indicando que la PS altera al sistema de estrés (Merlo et al., 2002).

Coenen y Van Luijtelaaar (1985) mostraron que el estrés inducido por 72 h de PSMOR en ratas adultas puede considerarse de tipo mediano, al compararlo con indicadores de estrés de animales bajo privación de alimento por 72 h. Ellos mostraron que la privación de alimento aumenta el peso de las glándulas adrenales, disminuye el del timo y el peso corporal; asimismo hay presencia de úlceras estomacales. Por el contrario, ratas bajo PSMOR por 72 h presentan una pequeña reducción en el peso del timo y no se observaron úlceras.

Los estudios sobre el estrés presente durante la PS demuestran que el estrés sobre el organismo es parte de las consecuencias del no dormir. La PS es un estresor *per se* y debe distinguirse el efecto específico de cada tipo de manipulación. De hecho podríamos decir que estresar al sistema es uno de los efectos de la PS. El estrés inherente a la PS debe ser de forma específica al tipo de privación (total o de sueño MOR) y a la duración de la privación (aguda o crónica). Así lo sugiere el trabajo de Suchecki et al. (1998), en donde observan que la PSMOR por 1 día incrementa los niveles de corticosterona en plasma solo en aquellas ratas que fueron privadas de sueño MOR utilizando plataformas múltiples pero no en aquellas que fueron privadas usando una sola plataforma o en sus respectivos controles de privación. Sin embargo, si la PSMOR se mantiene hasta por 4 días, los niveles de corticosterona aumentan en todos los grupos; aquellos privados con una sola plataforma o con varias, así como en los controles de privación.

Además, se ha mostrado que la PST por 6 horas en ratas adrenalectomizadas induce un rebote de sueño cuando se les permite dormir, como en los animales normales; sugiriendo que el sistema homeostático del sueño no está siendo afectado por el estrés (Brandbury y cols., 1998).

En este contexto, los efectos del estrés no invalidan los resultados de la PS, más bien nos permiten afinar el control de variables y sobre todo, nos alertan sobre la sobresimplificación de los procesos complejos y multifuncionales del ciclo sueño-vigilia. Indican también que el estrés es una condición de la vigilia; por lo que, podría decirse que el sueño aparte de suprimir a la vigilia, suprime a los sistemas moduladores de estrés, por lo que una de las funciones del sueño es suprimir el estrés.

Debe tomarse en cuenta también, que la PS nunca se evalúa como un estado independiente del organismo, como veremos a continuación. Es difícil mantener a los

sujetos despiertos, y prácticamente imposible mantenerlos dormidos. La PS se interpreta siempre en relación tanto a la vigilia como al sueño, para lo cual los métodos se complementan con diferentes tipos de controles como los que hemos revisado en este apartado y con la manipulación de rebote de sueño. Revisaremos a continuación los datos obtenidos de experimentos sobre PS y rebote de sueño.

### **2.3 Efectos generales de la privación de sueño y del rebote de sueño**

El primer reporte científico de PS en animales no humanos del que tenemos noticia fue realizado por Marie de Manacéine en 1894. Ella observó que la privación de sueño total (PST) en cachorros provoca su muerte en un plazo de 4 a 5 días. Los sujetos presentaban una apariencia en general debilitada; con lesiones en el organismo, menor cuenta de glóbulos rojos y blancos (presentando sangre “delgada”); y, disminución de la temperatura corporal. Entre más pequeños eran los cachorros más rápidamente morían, a pesar de que se les permitiera dormir después de la PS (Manacéine, 1894). Además, comparó el efecto de la PS con la privación de alimento, y observó que la PS por 4 o 5 días deterioraba la apariencia de los cachorros mucho más que la privación de alimento por 15 días. Los sujetos bajo privación de alimento pueden recuperarse mientras que los sujetos bajo PS mueren a pesar de que se les permita dormir libremente. Manacéine concluyó que la PS afecta al cerebro y la privación de alimento al cuerpo. Una aportación de Manacéine que perdura hasta nuestros días es utilizar la PS para evaluar los efectos del no dormir en modelos animales con el propósito de inferir las funciones del sueño (Manacéine, 1897).

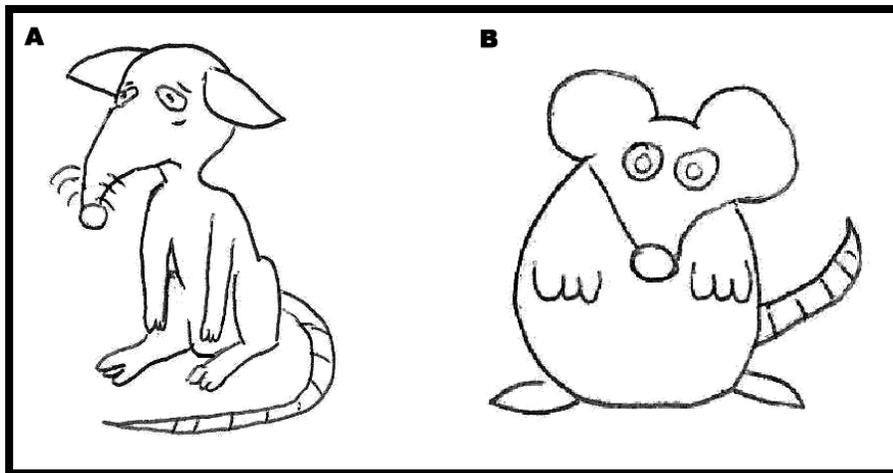
### 2.3.1 Privación de sueño

En la década de los 80's el grupo de Rechtschaffen evaluó las consecuencias del no dormir en forma crónica en una serie de experimentos en ratas, (Rechtschaffen y cols., 1983; Everson y cols., 1989a). Los datos revelaron que la PS provoca la muerte inminente de las ratas en un promedio de 3 semanas. Además, las ratas presentan un cuadro de 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 ingestión de alimento acompañada de una pérdida de peso considerable e incremento en la energía gastada (Fig. 4). Durante las 24 h previas a su muerte, algunas ratas cursaron con disminución drástica de la temperatura corporal (Rechtschaffen y cols., 1983; Everson y cols., 1989a). Este cuadro ha sido replicado por diversos grupos de investigación (por claras razones éticas, sin llegar al punto en que los sujetos mueren). El aumento en la ingestión de alimento acompañado de la disminución en el peso y el aumento de la temperatura corporal se consideran efectos característicos del cuadro inducido por la PS (Rechtschaffen y Bergmann, 2002).

La PSMOR continua lleva también a los sujetos a la muerte, pero es necesario un periodo más largo de privación (4 a 5 semanas), el cuadro descrito para la PST también se presenta en estos animales (Kushida y cols., 1989).

El mismo grupo de Rechtschaffen describió que este cuadro producido por la PS podía revertirse cuando a los sujetos se les permite dormir, siempre que la PS no pasara de un punto crítico a partir del cual ya era imposible evitar la muerte. Este momento depende de cada sujeto y estaría asociado a una disminución drástica de la temperatura corporal. A este punto hipotético lo llamaron *punto de no retorno*. Por ejemplo, una rata bajo un

período de PST durante 12 días, otra por 22 días y una con PSMOR por 29 días murieron en un período de 2 a 6 días después de que se les dio un periodo de recuperación en donde los sujetos podían dormir libremente. Estas ratas presentaron una disminución en la temperatura de 3 °C aproximadamente. Mientras que las ratas que no murieron (presumiblemente porque no rebasaron el punto de no retorno) se recuperaron totalmente de todos los síntomas del cuadro inducido por la PS después 15 días. La caída de la temperatura corporal y el aumento de noreadrenalina (NA) en plasma (Este aumento de norepinefrina también se observó en las ratas sometidas a PST) se estabilizaron en el primer día de recuperación de sueño; y, la energía gastada se reguló dentro de los 3 primeros días (Everson y cols. 1989b). Cabe señalar que Manacéine había ya sugerido este punto de no retorno. Ella observó que los cachorros morían a pesar de que les proporcionara cuidados exacerbados durante la manipulación de PS y/o durante el periodo de recuperación (Manacéine, 1894; Manacéine, 1897).



**Figura 4. La privación de sueño crónica provoca un síndrome metabólico que es evidente en la reducción del peso corporal a pesar de aumentar la ingesta de alimento (A), esto comparado con un control de la privación (B).**

En general se ha mostrado que la PS en forma aguda altera en primer lugar la integridad de procesos cognoscitivos como atención, aprendizaje y memoria (para más detalles ver apartado 2.4.3) pero no parecer afectar el metabolismo corporal de la misma forma que la PS crónica. De hecho, los efectos característicos de la PS en forma crónica (Fig. 4) indican alteraciones en el metabolismo de los sujetos. Se ha mostrado que la PS crónica aumenta la concentración de catecolaminas en plasma, sugiriendo una activación simpática. Las hormonas tiroideas disminuyen su concentración en plasma, lo que correlaciona con la hipotermia observada y disminuye la resistencia a infecciones; esto se puede asociar con la mortalidad. Al parecer el sistema inmune está suprimido durante la PS, ya que la temperatura no aumenta y no se observan tejidos dañados por inflamación (Evenson, 1995). La hiperfagia inducida por la PS está relacionada con un aumento en la expresión de NPY, un péptido orexigénico, y con la disminución de la expresión de la proopiomelancortina (POMC). Como sabemos, la POMC es precursora de la  $\alpha$ -MSH, la cual disminuye la ingestión de alimento. Ambos péptidos fueron evaluados en el hipotálamo de ratas bajo PSMOR por 20 días, las modificaciones se observan desde el día 5 y se mantienen hasta el 20 (Koban y cols. 2006).

### **2.3.2 Rebote de sueño**

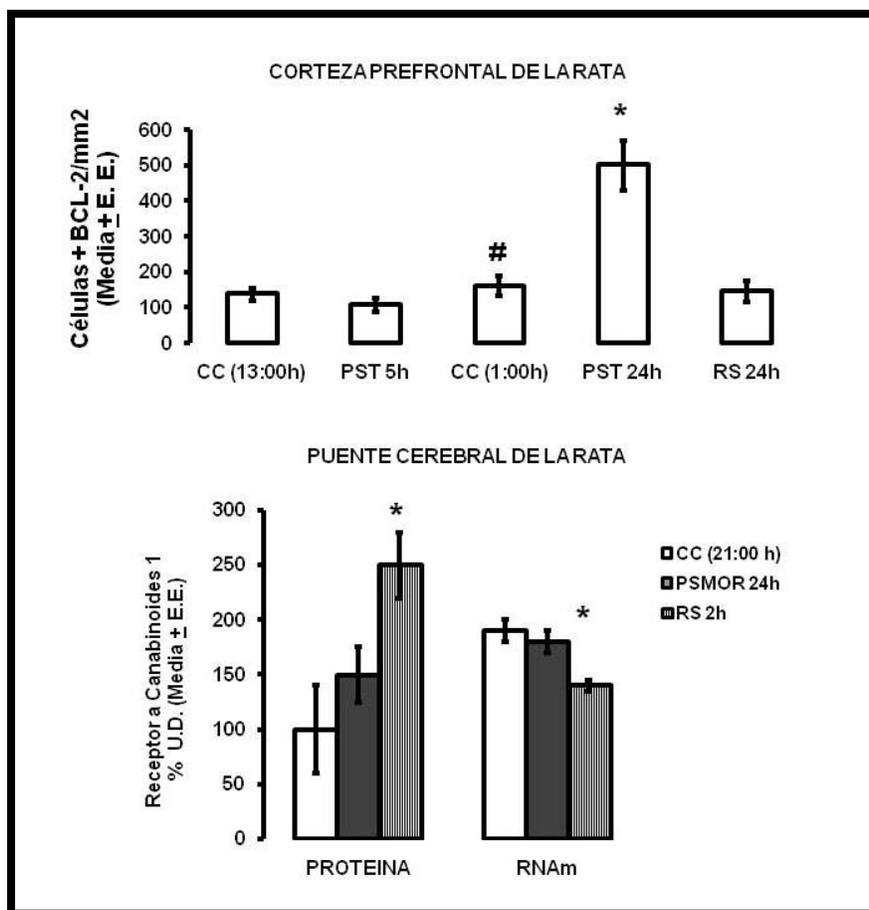
El rebote de sueño (RS) es un aumento en la cantidad habitual de sueño inducido por un periodo previo de PS. Se ha propuesto que el RS indica el componente homeostático del sueño, ya que sugiere que el organismo necesita recuperar el sueño perdido. Esto ocurre, tal vez para recuperar el balance metabólico y de esta forma puede evitar el síndrome de la PS. Durante el RS se observa un aumento tanto en la intensidad como en la

duración de las fases de sueño NMOR y MOR. El aumento en la intensidad de las fases durante el RS es directamente proporcional al tiempo de PS. Es decir, entre más largo es el periodo de PS más larga es la intensidad del RS (Tobler y Borbely , 1986). La intensidad del sueño NMOR se evalúa en la amplitud de las ondas delta que se presentan en esta fase de sueño. En la rata se le llama sueño de ondas lentas (SOL) 2, o actividad lenta que corresponde a la fase 3 y 4 del SOL en el humano. La intensidad del sueño MOR se registra en la amplitud de la actividad theta, que en la rata corresponde a la banda que esta entre 4-8 Hz. La actividad lenta del sueño parece ser la más sensible a la PS, ya que 6 horas de PST son suficientes para observar un aumento en su intensidad durante un periodo de recuperación de 24 h, mientras el sueño MOR necesita 24 h de PST para aumentar su intensidad (Tobler y Borbely, 1986).

La PST por 24 h utilizando el método automatizado aumenta en un 100% la cantidad de sueño MOR y NMOR durante las primeras 6 h de rebote de sueño. El rebote de sueño MOR se presenta durante 18 h al menos, la cantidad de sueño NMOR y MOR se normalizan al siguiente día. Aunque el sueño lento 1 (somnolencia) permanece arriba durante los dos días posteriores a la PS, a costa del tiempo de sueño lento 2 (Rechtschaffen y cols. 1999).

La PST crónica induce un importante RS-MOR. Después de 12, 18,19 o 22 días de PST se observa un RS que se mantiene durante los 10 primeros días de recuperación, presentándose principalmente un aumento en el sueño MOR. De hecho, la PSMOR crónica induce un aumento de sueño MOR durante los siguientes 15 días de recuperación (Everson y cols., 1989b).

En conclusión, podemos decir que la intensidad el sueño NMOR y la duración del sueño MOR son los elementos necesarios del sueño; ya que ambas variables son facilitadas durante el RS. Además, se ha mostrado que la lesión del núcleo supraquiasmático en ratas no interfiere con el RS después de 24 h de PST, lo que sugiere que el RS como fenómeno homeostático del sueño es independiente del componente circadiano (Tobler, 1983).



**Figura 3.** Cambios en las células inmunoreactivas a BCL-2 y en la expresión del receptor a canabinoides 1 (CB1) en el cerebro de la rata, después de un período de privación o de rebote de sueño. A. Número de células inmunoreactivas a Bcl-2 en la corteza prefrontal de ratas después de 5 y 24 h de PST por el método de manipulación gentil y después de un RS por 24 h. Las ratas fueron sacrificadas a la mitad de la fase de luz (13:00 h o de oscuridad (1:00 h). B. Efecto de la PSMOR por 24 h y del RS por 2h sobre los niveles del CB1 en el puente de ratas. El CB1 es reactivo al RS, obsérvese el aumento de la proteína y la disminución del RNAm. Los datos están representados como media ± e. \*P<0.05 con respecto al control de caja (CC); # P<0.05 con respecto al otro CC.

Los efectos de la PS y del RS pueden evaluarse en diferentes variables fisiológicas. Desde la expresión de moléculas que regulan procesos como la sobrevivencia neuronal o que modulan la actividad celular, hasta la ejecución de una conducta de tipo espacial. Esperamos que la PS o el RS modifiquen la expresión de estas variables y con base en dicha modificación podamos inferir si estas moléculas están relacionadas con la vigilia o con el sueño. Por ejemplo, en el caso de las moléculas que se muestran en la figura 5, observamos claramente que la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2 aumenta después de 24 h de PST en la corteza prefrontal de la rata; mientras que la expresión del receptor a canabinoides 1 (CB1) en el puente cerebral aumenta después de un periodo de RS por una PSMOR de 24 h. En este sentido, se puede sugerir que la presencia de BCL-2 en la corteza prefrontal es necesaria en la vigilia y el receptor CB1 en el puente cerebral es necesario durante el sueño.

### **2.3.3 Privación de sueño y Factores Inductores de Sueño**

Alrededor de la manipulación de PS se ha generado una amplísima línea de investigación científica sobre los llamados **factores inductores de sueño**. Esta escuela tiene sus orígenes en el inicio del siglo XX con los trabajos de Ishimori (1910) y Pieron (1913). Mientras el primero desarrollaba sus experimentos en Japón, el segundo lo hacía en Francia (Legendre y Piéron, 1912; Inoué, 1989).

Ishimori privó de sueño total a perros inmaduros por 24-113 h. Después de este período los sacrificó y obtuvo un extracto de todo el cerebro y lo administró por vía subcutánea a perros que habían dormido *ad libitum* Ishimori observó que el extracto cerebral de los perros privados de sueño era más pesado que el de los controles. Además, observó que si administraba el extracto de los perros bajo PST a los perros saciados de

sueño provocaba que estos últimos durmieran durante 2 h. Ishimori obtuvo el extracto cerebral de la siguiente forma: extrajo el cerebro de cada perro, lo homogenizó, lo dializó en alcohol y en éter; posteriormente, lo evaporizo a 45°C hasta tener un extracto de color café (Inoué, 1989).

Pièron privó de sueño total a perros adultos por 150-193 h, les extrajo líquido cefalorraquídeo y suero e hizo una emulsión cerebral. Posteriormente, administró estos fluidos a otro grupo de perros que habían dormido libremente y observó al igual que Ishimori, que presentaban signos de dormir sueño por al menos 2 h. Ambos investigadores concluyeron que en los animales bajo PS se acumula alguna o algunas sustancias capaces de inducir sueño. Así, durante la vigilia continua y/o fatiga se promueve la síntesis de dicha sustancia en el cuerpo, la cual al alcanzar ciertos niveles en el organismo promueve la necesidad del dormir. Como revisamos en el capítulo 1 Piéron llamó a esta molécula hipnotoxina (Legendre y Piéron, 1912).

La idea de estas hipnotoxinas planteaba la regulación humoral del sueño. Los estudios de Monnier establecerían ulteriormente con más claridad este hallazgo. En la década de 1960, Monnier transfundió la sangre de conejos a los que les provocó sueño por la estimulación de los núcleos intralaminares del tálamo, por ejemplo el medio-central del tálamo (donadores) a otros conejos que se encontraban despiertos (receptores). Observó que los dializados inducían sueño y aumentaban la intensidad del sueño delta en los conejos receptores; tal como ocurre en el RS (Monnier y Hoesli 1964).

Por otro lado, los experimentos de Piéron fueron replicados por Pappenheimer en 1967, cuando administró líquido cefalorraquídeo de cabras privadas de sueño por 72 h en el ventrículo cerebral da ratas y observó una disminución en la actividad motora de las ratas,

así como signos conductuales de sueño (Pappenheimer et al., 1967). Las hipnotoxinas reciben hoy el nombre de factores o sustancias inductoras de sueño (FIS). Los FIS son moléculas capaces de inducir sueño al administrarlos en un organismo y deben cumplir algunos criterios como el que sean endógenas, que se acumulen durante la vigilia o que induzcan sueño de una manera dosis-dependiente (ver Borbély y Tobler, 1980; Inoué, 1989).

Desde los trabajos de Piéron e Ishimori la PS ha sido muy utilizada para identificar aquellas moléculas que pueden ser FIS, pues sus niveles aumentan con la vigilia prolongada. Tras muchos años de investigación se ha reunido una lista considerable de FIS, muchas de estas moléculas son de naturaleza peptídica (ver tabla 1) y cumplen con varias funciones biológicas como ser mediadores de la respuesta inmune o de la ingestión de alimento.

En el marco de la teoría homeostática del sueño propuesta por Borbély en 1982 (para una revisión del modelo ver Borbély y Achermann, 1999), los FIS actúan como señalizadores de la necesidad del dormir, activando al sistema del cerebro dormido y consecuentemente deben actuar durante el sueño. En este sentido, los FIS podrían emular las acciones del sueño a nivel celular. Este concepto ha sido sugerido por los trabajos de Próspero-García (1986), donde el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y el líquido cefalorraquídeo de gatos bajo PSMOR por 24 h pueden restituir el sueño de gatos insomnes por la administración de PCPA (Próspero-García et al., 1986).

Los FIS constituyen al sistema funcional del sueño, durante la vigilia se acumulan hasta que sus niveles funcionan como señales positivas para el sistema ejecutor del sueño. Es probable que estas moléculas ejerzan sus acciones biológicas durante el sueño o bien que se degraden pues su expresión disminuye.

<b>Neuropéptido</b>	<b>Vigilia</b>	<b>Sueño NMOR</b>	<b>Sueño MOR</b>	<b>Gen</b>	<b>Posición en los Cromosomas Humanos</b>
<b>Neuropéptidos y Hormonas que regulan la ingestión de alimento</b>					
Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP)	↓	=	↑	VIP	6q25
Colecistocinina octapéptido (CCK-8)	↓	=	↑	CCK	3p22-p21.3
Péptido Semejante a Corticotropina del Lóbulo Intermedio (CLIP)	↓	=	↑	POMC	2p23.3
Somatostatina (SRIF)	↓	=	↑	SST	3q28
Insulina	↓	↑	=	INS	11p15.5
Leptina	↓	↑	↓	LEP	7q31.3
ghrelina	↓	↑	=	GHRL	3p26-p25
Neuropeptido Y (NPY)	↓	↑	=	NPY	7p15.1
Cortistatina (CST)	↓	↑	↑ ↓ *	CORT	1p36.22
<b>Proteínas del sistema inmunológico</b>					
Factor de Necrosis Tumoral (TNF alpha)	↓	↑	↓	TNF	6p21.3
Interleucina-1beta (IL-1beta)	↓	↑	↓	IL1B	2q14
<b>Factores Tróficos</b>					
Hormona Liberadora de Hormona del Crecimiento (GHRH)	↓	↑	=	GHRH	20q11.2
Hormona del Crecimiento (GH)	↓	=	↑	GH1	17q24.2
Prolactina (PRL)	↓	=	↑	PRL	6p22.2-p21.3
Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)	↓	↑	=	BDNF	11p13
Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) beta y gamma	↓	↑	↑	NGFB NGFG	1p13.1 19q13.3
Neurotrofina-3 (NT-3) y Neurotrofina-4 (NT-4)	↓	↑	↑	NTF3 NTF5	12p13 19q13.3

**Tabla 1. Péptidos inductores de sueño. Péptidos como orexinas e interleucinas 4, 10, 13 y otros que inducen vigilia, se han excluido de esta tabla.**

## **2.4 Niveles de análisis de la privación de sueño sobre el cerebro**

Los efectos de la PS y del RS nos indican una alteración en el sistema del sueño-vigilia. En el primer caso se evalúan las alteraciones por no dormir; en el segundo caso las acciones para el restablecimiento del ciclo. Dado que los efectos del no dormir se observan en procesos que dependen del cerebro, analizaremos diversos datos experimentales que evalúan el efecto de la PS en varios niveles del SNC. Como mencionamos en la introducción de este capítulo, podemos hablar al menos de 3 niveles: 1) el celular estructural, 2) el celular funcional, y 3) el sistémico-conductual.

En el nivel celular estructural discutiré los trabajos que evalúan la integridad celular después de varios periodos de PS; en el nivel celular-funcional incluyo los datos sobre PS y actividad neuronal; y, en el nivel sistémico-conductual agrupo los efectos de la PS sobre moléculas que regulan procesos de plasticidad sináptica y sobre procesos cognoscitivos como aprendizaje y memoria.

### **2. 4. 1 Nivel de integridad celular del sistema nervioso**

Dado los efectos negativos de la PS, se ha propuesto que la función del sueño es “*proteger*” o “*restaurar*” al organismo del desgaste ocurrido en la vigilia. Ya que los primeros efectos de la PS se observan en procesos que dependen de la integridad del cerebro, se ha dicho que el no dormir debería tener un efecto negativo sobre la integridad celular del SNC. Es por esto que se han evaluado diferentes indicadores moleculares de

dicha integridad después de varios periodos de PS. Estos experimentos los abordaremos en detalle en el capítulo 3.

#### **2. 4. 2 Nivel de actividad cerebral**

La actividad cerebral puede ser evaluada por diferentes métodos que nos brindan información sobre distintos niveles del sistema nervioso.

Everson y cols. (1994), evaluaron la captación de glucosa cerebral por el método de autoradiografía y la consideraron un indicador del metabolismo cerebral. A pesar del hiper-catabolismo corporal (p. e. aumento en la energía gastada) producido por 10-11 días de PST, el metabolismo del cerebro como un todo (evaluaron 60 estructuras) no cambia. Sin embargo, a nivel discrecional, se observa una reducción en 18 estructuras. Los cambios más claros se presentaron en el hipotálamo, el tálamo y el sistema límbico; no hubo cambios en la corteza cerebral, el puente, la médula y el mesencéfalo.

Braun y cols., (1997) muestran que la actividad cerebral de la vigilia previa al sueño es alta comparada con la vigilia posterior al sueño, esto lo hacen utilizando la técnica de Tomografía con Emisión de Positrones (TEP). Los autores toman a la vigilia normal como el periodo de privación de sueño. Sugiriendo que el sueño regresa la actividad cerebral a un nivel basal, disminuyendo la excitabilidad neuronal provocada por la vigilia previa (Braun y cols., 1997). Este planteamiento fue hecho en 1995 por Drucker-Colín al proponer que el sueño reduce la excitabilidad neuronal que se incrementa durante la vigilia (Drucker-Colín, 1995).

De hecho, es aceptado que durante la vigilia la excitabilidad del cerebro es mayor que durante el sueño (Braun y cols., 1997). Además, se ha sugerido que la PSMOR

aumenta la excitabilidad cerebral (Cohen, 1965). Esto correlaciona con un aumento en la actividad en la ATPasa Na-K en ratas bajo PSMOR por 4 días, este efecto está mediado por el sistema noradrenérgico (Gulyani y Mallick, 1995). De igual forma, la PST aguda (3h) aumenta la expresión de genes de expresión temprana como Fos, NGFI-A y facilita la fosforilación de CREB en la corteza cerebral de ratas, indicando una activación cortical. Este efecto está mediado por el LC (Cirelli y Tononi, 2000). La PST por 24 h aumenta la activación del área preóptica y del hipotálamo lateral de gatos (Ledoux et al., 1996).

Drucker-Colín también propone el término de “somnoprínt” para aplicarlo a la arquitectura particular del sueño de cada noche, la cual refleja las experiencias vividas durante la vigilia previa. De tal forma que cada noche tenemos una arquitectura del sueño diferente. De acuerdo a esta hipótesis, las actividades de la vigilia de un sujeto se reflejan en la actividad cerebral exhibida durante el sueño, el cerebro despierto modifica al cerebro dormido mediante el procesamiento de la información adquirida en la interacción ambiente-cerebro consciente. Este procesamiento ocurre principalmente en la corteza cerebral.

En resumen, la PST aguda (hasta por 24h) aumenta la activación celular en la corteza cerebral y en el hipotálamo lateral; mientras que, la PST por hasta 11 días disminuye la actividad metabólica cerebral. Por otro lado, la PSMOR aumenta la excitabilidad cerebral, aunque como revisaré en el siguiente apartado, la PSMOR modifica dicha excitabilidad en forma estructura-específica. Esto es, la aumenta en la corteza prefrontal y la disminuye en el hipocampo.

En conclusión, la excitabilidad celular de la corteza prefrontal y el hipocampo son severamente afectadas por la PS.

### 2. 4. 3 Nivel de plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria

Varios grupos de investigación han explorado el efecto de la PS sobre los procesos cognoscitivos y los procesos de plasticidad sináptica subyacentes.

La PSMOR por 72 h disminuye la excitabilidad celular en CA1 e inhibe la generación de la LTP<sup>3</sup> en CA1 y en el giro dentado, en el hipocampo de ratas (McDermott et al., 2003): La PSMOR aguda (4h) deteriora el mantenimiento de la LTP 48 h después de su inducción en el GD, pero la facilita en la corteza prefrontal medial (CPFm) (Romcy-Pereira y Pavlides, 2004). La generación de LTP en CA1 puede inhibirse también por una manipulación de fragmentación del sueño por 24 y 72 h (Tartar et al., 2006): McDermott et al. (2006) mostraron que la inhibición de la LTP en CA1 tras una PSMOR por 72 h ocurre porque la PS altera la morfología del receptor a NMDA en células piramidales de CA1 y reduce las corrientes entrantes.

La PSMOR por 72 h deteriora el aprendizaje de ratas entrenadas en una tarea emocional relacionada al contexto y dependiente del hipocampo. Sin embargo, no afecta el aprendizaje de una tarea emocional relacionada a una clave y que es dependiente de la amígdala. Esto mismo ocurre con una PSMOR por 24 h en ratones, siendo acompañado de una reducción en la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en el hipocampo, y un deterioro en la inducción de LTP. Después de un periodo de recuperación de 24 h se normaliza la inducción de LTP y la expresión de NR1, la ejecución en la tarea mejora pero no alcanza los niveles del control (Chen et al., 2006).

---

<sup>3</sup> La potenciación a largo plazo (LTP) es una medida de plasticidad sináptica, se considera el modelo electrofisiológico de la memoria y puede ser un indicador de la excitabilidad celular. Entre más robusta sea la respuesta de LTP se considera que las neuronas están más excitables.

Por otro lado, la PSMOR por 6 h daña la extinción de una tarea emocional asociada al contexto y dependiente de la amígdala (Fu et al., 2007). La PSMOR por 96 h antes del aprendizaje de una tarea de prevención pasiva deteriora la evocación de ésta tarea en ratas. Este deterioro no está asociado a un cambio en el pegado de acetilcolina en el receptor M1 o del GABA al receptor GABA<sub>A</sub> en el cerebro de ratas, en estructuras como la corteza cerebral, el hipotálamo, el tálamo, el hipocampo, el estriado, la amígdala el puente, y la sustancia gris periacueductal (Moreira et al., 2003; Dubiela et al., 2005). El deterioro en la evocación de la tarea de prevención pasiva también puede inducirse por una PSMOR de 72 h en ratones; y, se ha mostrado que está asociado a la presencia de estrés oxidante en el hipocampo de ratas. Este déficit puede revertirse con la administración previa (durante 15 días) de antioxidantes como la melatonina y la vitamina E (Silva et al., 2004).

Además, la PS reduce la neurogénesis espontánea del hipocampo de ratas adultas (Guzmán-Marín y cols., 2005) y suprime la neurogénesis inducida por una tarea dependiente del hipocampo (Hairston et al., 2005).

Como sabemos, el sustrato del proceso de almacenamiento de la información involucra procesos de plasticidad sináptica que resultan en la construcción de patrones estables de conducta. La PS modifica la expresión de moléculas que facilitan la plasticidad sináptica. Estas modificaciones son estructura-específicas y dependen de la duración de la manipulación.

La PST aguda provoca un incremento en la expresión de BDNF y NGF en la corteza cerebral de ratas. BDNF con una PST por 8 hrs (Cirelli et al., 2000) y NGF con una PST por 6 hrs (Brandt et al., 2001). La PST por 24 h aumenta el RNAm de c-Fos, BDNF y el factor de crecimiento de fibroblasto 2 (FGF2) en la corteza cerebral de ratas neonatales.

Asimismo, el RNAm de FGF2 aumentó después de 2 h de rebote (Hairston et al., 2004). Sin embargo, la PSMOR por 6 h disminuye los niveles de NGF en el hipocampo y de BDNF en el cerebelo y el tallo cerebral (Sei, et al., 2000). La PS por 8 y 48 h disminuye el RNAm de BDNF, sinapsina I, CAMKII y CREB en el hipocampo de ratas (Guzman-Marin et al., 2006).

Podemos concluir que la PS aguda facilita la expresión de moléculas que promueven plasticidad sináptica y protección celular en la corteza cerebral; mientras en el hipocampo la PS aguda y crónica las disminuye. La transmisión hipocampal es dañada por la PSMOR y esto se refleja en el deterioro de la adquisición de tareas dependientes del hipocampo. Estos datos sustentan la hipótesis de la consolidación de la memoria como una función del sueño. Además, el trabajo Ruskin y cols., 2006 sugiere que los efectos negativos de la PS sobre el aprendizaje son independientes del estrés de la manipulación. Ellos mostraron que la PSMOR por 72 h deteriora el aprendizaje espacial de ratas adrenalectomizadas, en un laberinto acuático (Ruskin et al., 2006).

Finalmente, las estructuras más afectadas por la PS son la corteza prefrontal y el hipocampo, además de las tareas que dependen de ellos. Esto indica que ambas estructuras forman parte del sistema beneficiario del sueño; al privar a un organismo de sueño no permitimos que sucedan los eventos celulares que ocurrirían normalmente. Así, las redes neuronales que son afectadas por la PS son aquellas que se benefician del dormir en condiciones normales.

## **2.5 La privación de sueño como un cambio en la homeostasis del sistema cerebral**

La PS es una manipulación experimental que se ha utilizado como vía para obtener información sobre las funciones del sueño. Sin embargo, como hemos visto a lo largo de este capítulo la PS sostenida tiene efectos en múltiples niveles del organismo; desde provocar un desbalance metabólico hasta el deterioro de los procesos cognoscitivos. Lo cual implica cambios en el sistema cerebral y corporal que se pueden observar en el cuadro característico de la PS (ver Cuadro 1). De esta manera, la PS debe tomarse como una alteración del sistema de la vigilia que va a ser afectado por el sistema del sueño. Los efectos evaluados después de la PS deben considerarse como respuestas de ambos sistemas (que obviamente siempre están interaccionando) ante la manipulación de PS. Esto lo podemos observar cuando un sujeto refiere que se siente somnoliento por no haber dormido adecuadamente, ya que los sistemas del sueño promueven la motivación para dormir a pesar de que el sujeto este despierto.

La activación del sistema de estrés por la PS indica que el organismo esta sometido a una demanda extraordinaria del ambiente. En este sentido, podemos decir que la PS altera la homeostasis del cuerpo y del cerebro, de tal forma que los efectos que registramos por esta manipulación reflejan un estado de alostasis del organismo. La alostasis se define como el proceso por el cual el organismo intenta mantener su viabilidad interna ante demandas extraordinarias de su medio interno y externo. Esto lo hace activando una serie de señales moleculares reguladas por el SNC con el fin de responder de una manera óptima al medio. En este sentido la alostasis hace referencia a la noción evolutiva de adaptación;

pero se limita a los mecanismos (a través del sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal) por los cuales el cerebro moviliza al cuerpo para la sobrevivencia de los organismos ante retos de su medio (Schulkin, 2003).

En 1982 Borbély propuso que el sueño tiene un componente circadiano y otro homeostático (revisado en Borbély y Achermann, 1999). El primero está regulado por el núcleo supraquiasmático y depende de su sincronización con el ciclo luz-oscuridad; el segundo es el que refleja la necesidad del dormir. La noción de homeostasis plantea un sistema estable que al usarse y gastarse acciona mecanismos para compensar o reparar este desgaste y conservar la llamada constancia del medio interno. En este sentido, durante la vigilia se acumula la necesidad del dormir hasta el punto en que el sueño se instala y esta necesidad se disipa. Podríamos decir que al término de un ciclo vigilia-sueño este sistema esta en homeostasis. Por ejemplo, por la mañana, en una persona que duerme regularmente 7.5 horas diarias y que esa mañana las ha dormido.

Durante la PS el componente homeostático es alterado, ocurre una vigilia prologada que aumenta la necesidad de dormir sobre la vigilia normal. Esto se puede observar en el RS, donde el organismo parece recuperar el sueño que perdió en cantidad y en intensidad. El RS permite al sujeto regresar su cerebro a la homeostasis del ciclo sueño-vigilia.

Sin embargo el organismo no es pasivo, el medio interno y externo están en constante cambio (Damasio, 2002). La PS aguda provoca respuestas para compensar o proteger al organismo ante tal manipulación. Prueba de ello es el aumento de moléculas que promueven plasticidad sináptica en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas (Cirelli et al., 2000); así como en la facilitación de la LTP en la CPFm después de una PST por 4 h (Romcy-Pereira y Pavlides, 2004). Sin embargo, si los efectos de la PS se evalúan sobre procesos de aprendizaje y memoria; así como sobre procesos plásticos que dependen del

hipocampo, observaremos que la PS deteriora dichos procesos (ver apartado 4.4.4). Esto indica que el cerebro responde diferencialmente ante la PS.

Los efectos observados son respuestas cuyo fin último es restablecer la homeostasis, pero que transitoriamente nos mantienen en un estado de alostasis estructura-específica ante la ruptura del componente homeostático del sueño. Interpretar los efectos de la PS como cambios alostáticos permite estudiar un sistema más dinámico, que toma en cuenta la necesidad del dormir pero también la presencia de la vigilia alterada. El sueño únicamente como un sistema homeostático anula al organismo y a sus múltiples respuestas conductuales ante la PS. No podemos olvidar que el cerebro es un órgano plástico por excelencia y, los efectos observados por la PS son probablemente la respuesta del cerebro ante tal situación.

Como revisamos en el Capítulo 1, varios trabajos han mostrado que el GABA señala o refleja el componente homeostático del sueño en el área preóptica medial y en el área preóptica ventrolateral (APOvl) del hipotálamo. Por ejemplo, la PS aumenta la actividad de células GABAérgicas del APOMn; este incremento es mayor que el observado después del RS o durante el sueño espontáneo, indicando que aumenta con la necesidad del dormir (Gvilia y cols., 2006). Además, la transmisión GABAérgica en estas áreas hipotalámicas inicia el sueño al inhibir a los núcleos promotores de la vigilia (ver capítulo 1).

Los FIS también son parte del sistema homeostático del sueño; como recordaremos se acumulan durante la vigilia hasta alcanzar niveles que pueden inducir sueño. Los FIS señalizan la necesidad de dormir, cuando se duerme los niveles descienden y el sistema está en homeostasis; al inicio de la vigilia el ciclo empieza, los FIS se acumularán a lo largo de ella. Recordemos que los FIS son moléculas que tienen diversas funciones biológicas como

señalizadores del sistema inmune, del crecimiento neuronal o de la ingestión de alimento. De forma que, sus funciones podrían ser lo que el sueño restituya.

## **2.6 Conclusiones**

Todos hemos experimentado los efectos de la PS. Por experiencia sabemos que si un día no dormimos la vigilia del día siguiente será desagradable, estaremos somnolientos, no atenderemos bien a los diferentes estímulos y la capacidad para retener información estará disminuida. Estos síntomas desaparecen después de dormir bien, lo que indica que el sueño es necesario para una adecuada interacción con el entorno de un individuo. Como sabemos, esta interacción ocurre gracias al cerebro, al igual que la generación de la vigilia y el sueño. En términos de los dos cerebros, el cerebro dormido beneficia al cerebro despierto, el beneficio del cerebro después del dormir recae en estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral. El cerebro despierto ante el reto de la vigilia prolongada activa mecanismos compensadores que promueven plasticidad sináptica.

La PS ha sido y sigue siendo una manipulación experimental muy útil que nos ha brindado muchos datos en la construcción del conocimiento alrededor del sueño y la vigilia. A pesar del ruido experimental inherente a la manipulación de PS y a la enorme cantidad de datos generados, podemos resumir y agrupar en el cuadro 1 los datos más sólidos sobre el sueño y sus funciones; los cuales se han inferido a partir de dicha manipulación (ver cuadro 1). En este sentido, la PS nos ha permitido ver como la alteración de la función del cerebro dormido afecta los procesos del cerebro despierto.

Finalmente, es importante analizar los datos sobre la PS y sus efectos en diferentes niveles del organismo en el marco de ciertos cuestionamientos y restricciones sobre la misma manipulación experimental para tener una adecuada interpretación de los datos experimentales. En el cuadro 2 se plantean algunos cuestionamientos que deben considerarse (ver cuadro 2).

La conclusión última de este capítulo se refiere a algo que no necesita tantos datos experimentales como los aquí revisados; no dormir es incompatible con la vida y afecta en primer lugar a los procesos que dependen del cerebro.

Recordemos que si no cumplimos nuestra cuota diaria de sueño, no seremos eficientes y no nos adaptaremos a nuestro entorno. Asegurando nuestra extinción.

### **Cuadro 1. Efectos de la PS sobre los organismos**

- a. La manipulación de PS nos ha mostrado que el sueño es vital para la vida; y permanecer despiertos hasta el llamado *punto de no retorno* es irreversible; ya que a pesar de dormir después de un largo período de PS la muerte es inevitable.
- b. La PS aumenta el metabolismo corporal y disminuye la respuesta inmunológica. Provocando un cuadro característico que consiste en la disminución del peso corporal, acompañado de un aumento en la ingestión de alimento y en la temperatura corporal; y disminuyendo la respuesta inmunológica.
- c. Los efectos de la PS sobre el cerebro son estructura - específico.
- d. El cerebro se protege durante la PS, ya que no se han encontrado datos sólidos que muestren que la PS provoca muerte neuronal.
- e. Los estudios sobre los efectos de la PS sobre la restauración celular en el cerebro no esclarecen que dicha restauración sea una función del sueño.
- f. Durante la PST aguda (hasta 24h) se están activando mecanismos de la vigilia prologada (la cual ocurre al mismo tiempo que la PS). Esto se observa en el aumento de la expresión de moléculas que promueven protección neuronal y plasticidad sináptica en la corteza cerebral de ratas.
- g. La PS deteriora los procesos del nivel sistémico-conductual, esto se observa en el deterioro de la ejecución de tareas dependientes de la amígdala y el hipocampo; además del daño en la LTP hipocampal.
- h. La PS afecta la integridad de la corteza cerebral y el hipocampo. Estos deben ser beneficiarios del sueño.

## **Cuadro 2. Limitaciones del método de la PS y propuestas para una nueva interpretación**

- a. La discusión sobre los efectos del estrés en la PS conduce a una reflexión más general sobre el método, y en especial sobre los conceptos que usamos para estudiar el sueño. Los métodos de la PS suponen la idea de que es posible aislar la variable sueño de la fisiología del organismo. Sin embargo, los resultados de más de un siglo de investigación nos hacen pensar que no es posible.
- b. Estrictamente hablando, los estudios de control de estrés en la PS no implementan grupos control, porque ello implicaría que la variable independiente no se presentara en absoluto para los sujetos control. Como puede verse en la revisión general de estos estudios, los sujetos control también cursan por una alteración de su ciclo sueño-vigilia.
- c. Si bien el estrés y la PS pueden medirse evaluando la actividad neuronal o de moléculas particulares, ambos implican una situación que involucra al organismo entero en interacciones concretas con el ambiente, por lo tanto la PS y el estrés no pueden estudiarse como causa-efecto de variables discretas.
- d. Una nueva vía de interpretación y de investigación empírica para los estudios de la PS que proponemos en este capítulo, es conceptualizar a la PS como un estado fisiológico global alterado por sí mismo. Ello significa que antes de evaluar la PS por lo que le hace falta (sueño NMOR y/o MOR), se intente explicar por el funcionamiento compensatorio que se despliega durante la PS. A final de cuentas, los mamíferos están preparados (antes de cualquier manipulación) para enfrentar la alteración del ciclo sueño-vigilia.
- e. Como hemos visto, el exceso de vigilia o el déficit de sueño plantean al organismo una respuesta fisiológica generalizada (alostasis), y una activación de ensamblajes neuronales específicos, incluyendo protección celular diferencial de áreas cerebrales. En ese sentido, la pregunta general es: ¿Cuál es el valor adaptativo de la PS para el organismo?
- f. Es necesario realizar investigación que nos permita observar las funciones adaptativas propias de la PS, pues sus efectos han sido descritos bajo la idea de que al eliminar el sueño o prolongar la vigilia las funciones del organismo sólo pueden descender o desequilibrarse. Se evalúa al organismo en la ejecución de funciones propias de la vigilia (p. e., aprendizaje y memoria) y se describe como padece por la ausencia de las funciones propias del sueño (p. e. la consolidación de la memoria durante el sueño) Pero si tomamos a la PS como un estado neurofisiológico propio, debemos preguntarnos ¿Cuáles son las funciones apropiadas a evaluar? ¿Cuáles son, en los diferentes niveles de análisis, funciones propias del estado neurofisiológico de la PS?

## 2.6 Referencias

- Bergmann BM, Kushida CA, Rechtschaffen A, Everson CA, Gilliland MA, Obermeyer W, Rechtschaffen A (1989) Sleep deprivation in the rat: II. Methodology. *Sleep* 12: 5-12.
- Biswas S, Mishra P, Mallick BN (2006) Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience* 142:315-31.
- Borbély AA, Achermann P (1999) Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J Biol Rhythms* 14: 557-68.
- Borbély AA, Tobler I (1980) The search for an endogenous “sleep-substance”. *TIPS* 356-8.
- Bradbury MJ, Dement WC, Edgar DM (1998) Effects of adrenalectomy and subsequent corticosterone replacement on rat sleep state and EEG power spectra. *Am J Physiol*; 275: R555-65.
- Brandt J, Churchill L, Guan Z, Fang J, Chen L, Krueger JM (2001) Sleep deprivation but not a whisker trim increases nerve growth factor within barrel cortical neurons. *Brain Res* 898: 105-12.
- Braun AR, Balkin TJ, Wesensten NJ, Carson MV, Baldwin P, Selbie S, Belenkey G & Herscovitch (1997) Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. *Brain* 120: 1173-97.
- Bubenik G, Monnier M (1972) Nuclear size variations in cells of the locus ceruleus during sleep, arousal and stress. *Exp Neurol* 35: 1-12.
- Chen C, Hardy M, Zhang J, LaHoste GJ, Bazan NG (2006) Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 435-40.
- Chen C, Hardy M, Zhang J, LaHoste GJ, Bazan NG (2006) Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 435-40.
- Cirelli C (2006) Cellular consequences of sleep deprivation in the brain. *Sleep Med Rev* 10:307-21.
- Cirelli C, Tononi G (2000) Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic System. *J Neurosci* 20: 9187-94.
- Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G (2004) Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron* 41: 35-43.
- Cirelli C., Shaw, P.J., Rechtschaffen, A. & Tononi, G (1999) No evidence of brain cell degeneration after long-term sleep deprivation in rats. *Brain Res* 840: 184-193.

- Coenen AM, van Luijtelaar EL (1985) Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiol Behav* 35: 501-4.
- Coenen AML (2001) The controversial platform technique for REM sleep deprivation in rats. *Sleep-Wake Research in the Netherlands* 12: 20-3.
- Cohen HB, Dement WC (1965) Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* 150: 1318-9
- D'Almeida V, Lobo LL, Hipólido DC, De Oliveira A, Nobrega JN, Tufik S (1998) Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport* 9:2853-6.
- Damasio A (2002) *Sentir lo que sucede: cuerpo y emoción en la fábrica de la consciencia*. Santiago de Chile: Andrés Bello.
- Drucker-Colin R (1995) The function of sleep is to regulate brain excitability in order to satisfy the requirements imposed by waking. *Behav Brain Res* 69:117-24.
- Dubiela FP, de Oliveira MG, Moreira KD, Nobrega JN, Tufik S, Hipólido DC (2005) Learning deficits induced by sleep deprivation and recovery are not associated with altered [(3)H]muscimol and [(3)H]flunitrazepam binding. *Brain Res* 1037:157-63.
- Eiland MM, Ramanathan L, Gulyani S, Gilliland M, Bergmann BM, Rechtschaffen A, Siegel JM (2002) Increases in amino-cupric-silver staining of the supraoptic nucleus after sleep deprivation. *Brain Res* 945: 1-8.
- Everson CA (1995) Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 69:43-54.
- Everson CA, Guilligan MA, Kushida CA, Pilcher JJ, Fang VS, Refetoff S, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1989b). Sleep Deprivation in the Rat: IX. Recovery. *Sleep* 12: 60-67.
- Everson CA, Smith CB, Sokoloff L (1994) Effects of prolonged sleep deprivation on local rates of cerebral energy metabolism in freely moving rats. *J Neurosci* 14: 6769-78.
- Everson CA, Toth LA (2000) Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R905-16.
- Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1989a). Sleep Deprivation in the Rat: III. Total Sleep Deprivation. *Sleep* 12: 13-21.
- Fu J, Li P, Ouyang X, Gu C, Song Z, Gao J, Han L, Feng S, Tian S, Hu B (2007) Rapid eye movement sleep deprivation selectively impairs recall of fear extinction in hippocampus-independent tasks in rats. *Neuroscience* 144:1186-92.
- Gopalakrishnan A, Ji LL, Cirelli C (2004) Sleep deprivation and cellular response to oxidative stress. *Sleep* 27:27-35.

- Gulyani S, Mallick BN (1995) Possible mechanism of rapid eye movement sleep deprivation induced increase in Na-K ATPase activity. *Neuroscience* 64: 255-60.
- Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R, McGinty D (2005) Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 22:2111-6.
- Guzman-Marin R, Ying Z, Suntsova N, Methippara M, Bashir T, Szymusiak R, Gomez-Pinilla F, McGinty D (2006) Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. *J Physiol* 575: 807-19.
- Hairston IS, Little MT, Scanlon MD, Barakat MT, Palmer TD, Sapolsky RM, Heller HC (2005) Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. *J Neurophysiol* 94:4224-33.
- Hairston IS, Peyron C, Denning DP, Ruby NF, Flores J, Sapolsky RM, Heller HC, O'Hara BF (2004) Sleep deprivation effects on growth factor expression in neonatal rats: a potential role for BDNF in the mediation of delta power. *J Neurophysiol* 91: 1586-95.
- Hipólido D C, D'Almeida V, Raymond R, Tufik S, Nobrega JN (2002) Sleep deprivation does not affect indices of necrosis or apoptosis in rat brain. *Int J Neurosci* 112: 155-66.
- Inoué S (1989) *Biology of sleep substances*. Florida: CRC Press.
- Koban M, Le WW, Hoffman GE (2006) Changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone, neuropeptide Y, and proopiomelanocortin gene expression during chronic rapid eye movement sleep deprivation of rats. *Endocrinology* 147: 421-31.
- Kushida CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1989) Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* 12: 22-30.
- Ledoux L, Sastre JP, Buda C, Luppi PH, Jouvet M (1996) Alterations in c-fos expression after different experimental procedures of sleep deprivation in the cat. *Brain Res* 735: 108-18.
- Legendre R, Piéron H (1912) De la propriété hypnotoxique des humeurs développée au cours d'une veille prolongée C.R. *Société de Biologie de Paris* 70: 210-2
- Majumdar S, Mallick BN (2005) Cytomorphometric changes in rat brain neurons after rapid eye movement sleep deprivation. *Neuroscience* 135: 679-90.
- Manacéine M (1894) Quelques observations expérimentales sur l'influence de l'insomnie absolue. *Arch Ital Biol*; Tomo XXI: 321-5.
- Manacéine M (1897) *Sleep: Its physiology, pathology, hygiene and psychology*. London: Walter Scott Pub Co Ltd.

- McDermott CM, Hardy MN, Bazan NG, Magee JC (2006) Sleep deprivation-induced alterations in excitatory synaptic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Physiol* 570: 553-65.
- McDermott CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazan NG & Magee JC (2003) Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons *J Neurosci* 23: 9687-95.
- Meerlo P, Koehl M, van der Borght K, Turek FW (2002) Sleep restriction alters the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *J Neuroendocrinol* 14:397-402.
- Monnier M, Hoesli L (1964) Dialysis of sleep and waking factors in blood of the rabbit. *Science* 146: 796-8.
- Montes-Rodríguez CJ, Rueda-Orozco PE, Urteaga-Urías E, Aguilar-Roblero R, Prospero-García O (2006) De la restauración neuronal a la reorganización de los circuitos cerebrales. *Rev Neurol* 43:409-15.
- Montes-Rodríguez CJ, Alavez S, Helder JH, Haro R, Moran J, Prospéro-García O (2004) Prolonged waking reduce human immunodeficiency virus glycoprotein 120- or tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in the cerebral cortex of rats. *Neurosci Lett* 360: 133-136.
- Moreira KM, Hipólido DC, Nobrega JN, Bueno OF, Tufik S, Oliveira MG (2003) Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered [3H]pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors in rat brain. *Brain Res* 977: 31-7.
- Pappenheimer JR, Miller TB, Goodrich CA (1967) Sleep-promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep-deprived goats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58: 513-7.
- Prospéro-García O, Morales M, Arankowsky-Sandoval G, Drucker-Colin R (1986) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and cerebrospinal fluid (CSF) of sleep-deprived cats restores REM sleep in insomniac recipients. *Brain Res* 385: 169-73.
- Prospéro-García. O., Méndez Díaz, M. & Navarro, L...
- Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM (2002) Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *Neuroreport* 13: 1387-90.
- Ramos-Platón JM (1996) Funciones del Sueño. En Ramos Platón, J. M. (Ed.) *Sueño y Procesos Cognitivos* Madrid, España: Síntesis Psicología.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM (2002) Sleep Deprivation in the Rat: An update of the 1989 Paper. *Sleep* 25:18-24.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA (1989) Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 12:68-87.

- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Gilliland MA, Bauer K (1999) Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep* 22:11-31.
- Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB (1983) Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science* 221: 182-4.
- Romcy-Pereira R & Pavlides C (2004) Distinct modulatory effects of sleep on the maintenance of hippocampal and medial prefrontal cortex LTP *Eur J Neurosci* 20: 3453-62.
- Ruskin DN, Dunn KE, Billiot I, Bazan NG, LaHoste GJ (2006) Eliminating the adrenal stress response does not affect sleep deprivation-induced acquisition deficits in the water maze. *Life Sci* 78:2833-8.
- Schulkin J. Rethinking homeostasis (2003) Allostatic regulation in physiology and pathophysiology. Cambridge MA, London, England: MIT Press.
- Sei H, Saitoh D, Yamamoto K, Morita K, Morita Y Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. *Brain Res* 877:387-90.
- Silva RH, Chehin AB, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Abílio VC, Tufik S & Frussa-Filho R (2004) Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animals models of learning and memory in mice” *Neurobiol Learn Mem*, 82: 90-8
- Singh R, Kiloung J, Singh S, Sharma D (2008) Effect of paradoxical sleep deprivation on oxidative stress parameter in brain regions of adult and old rats. *Biogerontology* 9:153-62.
- Suchecki D, Lobo LL, Hipólide DC, Tufik S (1998) Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res* 7: 276-81.
- Tartar JL, Ward CP, McKenna J, Thakkar M, Arrigoni E, McCarley R, Brown R Strecker RE (2006) Hippocampal synaptic plasticity and spatial learning are impaired in a rat model of sleep fragmentation. *Eur J Neurosci* 23: 2739-48.
- Tobler I, Borbély AA (1986) Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 64: 74-6.
- Tobler I, Borbély AA, Groos G (1983) The effect of sleep deprivation on sleep in rats with suprachiasmatic lesions. *Neurosci Lett* 42:49-54

## **CAPITULO 3. SUEÑO Y SOBREVIVENCIA NEURONAL**

Como revisamos en el capítulo 2, la PS provoca alteraciones fisiológicas que llevan al organismo a un desbalance metabólico, y finalmente a la muerte. En este contexto, se ha propuesto que el sueño es un período de restauración del organismo ante el desgaste inducido por la vigilia. Sin embargo, a pesar de que para cualquier persona es claro que el sueño sirve para descansar, es necesario escudriñar los mecanismos celulares sobre los cuales recae dicha restauración.

Dado que los procesos cognoscitivos y la actividad cerebral son los primeros en alterarse por la PS y, puesto que el sueño y vigilia son generados por la activación de redes neuronales específicas, se cree que el principal blanco de la restauración que ocurre es el cerebro. En este contexto, en este capítulo discutiré si el sueño cumple una función en el marco de la restauración neuronal. Los mecanismos celulares que estudiaremos son aquellos que regulan la sobrevivencia y la muerte celular; asumiendo que cualquier déficit en los mecanismos de restauración se debería de reflejar en la viabilidad de las neuronas.

En este capítulo revisaremos brevemente los conceptos de sobrevivencia y muerte neuronal, los mecanismos celulares implicados y, finalmente, su relación con el sueño.

### **3.1 Sobrevivencia Neuronal**

Se ha calculado que en el cerebro humano existen 100 mil millones de neuronas ( $10^{11}$ ) y 100 billones de conexiones interneuronales ( $10^{14}$ ); (Zigmond et al., 1999). La homeostasis del número de neuronas y conexiones del Sistema Nervioso Central (SNC) se

altera en diversas patologías, como la epilepsia o el Alzheimer (Siao y Tsirka, 2002; Kato et al., 2001). Por lo que, es evidente que el funcionamiento óptimo del Sistema Nervioso Central (SNC), basado en un número específico de neuronas, permite el desempeño de nuestras conductas cotidianas, lo que a su vez, nos ayuda a adaptarnos a nuestro entorno.

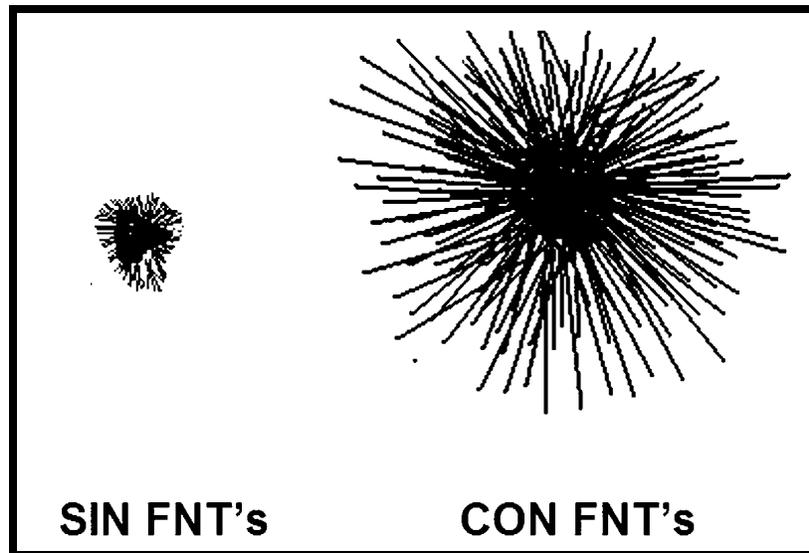
El SNC regula la cantidad de neuronas necesarias para su funcionamiento idóneo bajo condiciones fisiológicas, a través de dos procesos: la sobrevivencia neuronal y la muerte celular, particularmente la muerte por apoptosis. Ambos, la sobrevivencia celular como la apoptosis son procesos activos y regulados por la expresión de una gran cantidad de genes, necesarios para la homeostasis del SNC.

### **3.1.1 Sobrevivencia Neuronal y Factores Tróficos**

Los factores tróficos (FT's), son moléculas endógenas que promueven la sobrevivencia y mantenimiento de las células. Los FT's exclusivos del SNC reciben el nombre de factores neurotróficos (FNT's) o neurotrofinas; los que han sido más estudiados son: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), las neurotrofinas 3 y 4 (NT3 y NT4).

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 sobrevivencia de neuronas sensoriales y simpáticas durante el desarrollo embrionario depende del NGF (Levi-Montalcini, 1986). En ausencia de este factor o su receptor de alta afinidad las neuronas mueren (Fig. 1). El tratamiento con NGF exógeno o la sobre-expresión de NGF mantiene neuronas que normalmente morirían (Levi-Montalcini, 1986). Además, en el SNC en desarrollo las neurotrofinas presentan niveles altos. Todos estos datos indican que los FNT's tienen una

función importante en el mantenimiento neuronal durante desarrollo y llevaron a la postulación de la hipótesis neurotrófica.



**Figura 1.** Los factores neurotróficos (FNT's) promueven la supervivencia de las neuronas y el crecimiento axonal (derecha), la ausencia de estos factores provoca muerte celular (izquierda). Montes et al., 2006.

La hipótesis neurotrófica propone que las neuronas inmaduras compiten por células blanco proveedoras de factores tróficos que están suministrados limitadamente. En este contexto, se entiende que únicamente las neuronas que tienen éxito en establecer las conexiones sinápticas correctas para la obtención del factor trófico sobrevivirían, las neuronas no exitosas, morirían (revisado en Yuan y Yankner, 2000). No parece que el suministro limitado de los factores tróficos sea aleatorio, sino que se persigue rescatar solo a las neuronas más aptas. La supervivencia de la neuronas por la obtención del factor trófico ejemplifica parte del proceso que Edelman llama Darwinismo Neuronal (Edelman, 1999). El Darwinismo Neuronal supone que ocurre una selección de grupos neuronales con base en el establecimiento de nuevas sinapsis y el uso de las conexiones establecidas entre los grupos neuronales. Estas conexiones crean redes neuronales que resultan en la

emergencia de mapas cognitivos para la interacción con el ambiente. Esto implica que es un proceso dinámico y continuo, que ocurre a lo largo del desarrollo de un individuo desde su generación in útero hasta su muerte. Edelman incluso propone que estos arreglos neuronales complejos generan la conciencia como una función emergente (Edelman, 1999; Edelman, 2003).

### **3.1.2 Factores Neurotróficos y sus funciones**

Además del clásico estudio de Levi-Montalcini y Hamburger, diversos estudios han mostrado la función 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 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). El BDNF facilita la función sináptica en neuronas hipocampales, estudiado 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 excitadoras hipocampales (Tyler y 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).

En general la ausencia de neurotrofinas promueve que las neuronas mueran. Por el contrario, su presencia promueve crecimiento, sobrevivencia y regeneración neuronal.

### 3.1.3 Receptores con actividad de tirosina cinasa

Los FNT's se unen a los receptores membranales con actividad de tirosina cinasa (trk's). Los trk's son glucoproteínas con una masa molecular de 140-145 kDa. Se caracterizan porque al unírseles los FNT's 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 (Patapoutian y Reichardt, 2001; Purcell y Carew, 2003).

La unión de los FNT's a los receptores trk activa 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 (Kaplan an Miller, 2000; Patapoutian y Reichardt, 2001).

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 (Yan et al., 1997;

Zigmond et al., 1999). La especificidad de la distribución del BDNF y la NT3 puede relacionarse con su participación en procesos de plasticidad neuronal, asociados con el aprendizaje y la memoria (Purcell y Carew, 2003).

En resumen, los FTN's son las moléculas mediadoras de la sobrevivencia y el crecimiento neuronal. Durante el desarrollo embrionario juegan un papel determinante en la formación adecuada del SNC. En el organismo maduro promueven procesos de plasticidad sináptica como neurogénesis y sinaptogénesis; están relacionados con el aprendizaje y la memoria; además de esto, siguen facilitando la sobrevivencia y el crecimiento neuronal.

Además, los FNT's son sumamente importantes en procesos de regeneración celular, cuando ocurre un evento isquémico cerebral o un traumatismo cráneo-encefálico estas moléculas protegen a nuestro cerebro y su acción rescata a la mayor cantidad de neuronas; o por lo menos a aquellas que son más eficientes, pues tendrían más contactos sinápticos y más posibilidades de sobrevivir.

### **3.2 Muerte celular**

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 en varios tejidos y tipos de células en desarrollo. A este tipo de muerte celular se le llamó apoptosis, término griego dado por Currie en 1972, que describe la caída de las hojas o el marchitar de una flor (revisado en Hengartner, 2000).

### **3.2.1 Apoptosis**

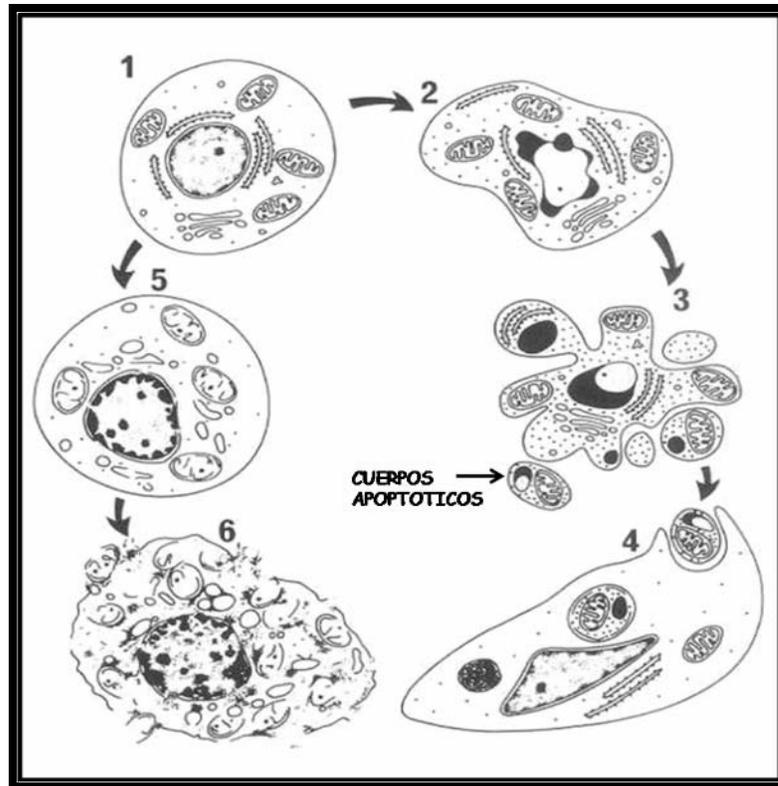
La apoptosis es un proceso de muerte celular activo y programado, regulado por genes y caracterizado por cambios morfológicos específicos; como la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación nuclear (Figura 2). Este tipo de muerte está conservado entre las especies, indicando su importancia para los sistemas biológicos. Las características morfológicas de la apoptosis son diferentes a las observadas en la muerte celular bajo condiciones patológicas o por intoxicación llamada muerte necrótica. La muerte necrótica es desordenada, el volumen celular aumenta hasta que la célula se rompe (Figura 2), (Yuan y Yankner, 2000).

La apoptosis ocurre de manera natural durante el desarrollo embrionario, la regeneración hepática y ante la presencia de células infectadas por virus, en células que activan al sistema inmune o células que porten mutaciones genéticas.

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

- a)** Falta de señales positivas o de supervivencia, como los factores tróficos.
- b)** Recepción de señales negativas o de muerte; por ejemplo por un incremento en los niveles de oxidantes celulares (especies reactivas de oxígeno, ROS), daño en el DNA o por moléculas que se unen a receptores de la superficie celular que activan un programa de apoptosis (Been y Woolf, 2004).

En el primer caso se trata de una estimulación negativa sobre la supervivencia celular y en consecuencia positiva sobre la muerte celular; en el segundo caso, es una estimulación positiva y directa sobre la muerte celular.



**Figura 2. Muerte celular por necrosis (izquierda) y por apoptosis (derecha).** En la necrosis la célula se hincha (5) hasta explotar (6). En la apoptosis el volumen celular se reduce (2), hay una fragmentación celular, condensación nuclear y se forman cuerpos apoptóticos (3); finalmente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por otras células como los macrófagos o la microglía (4).

En el SNC maduro la muerte celular por apoptosis se puede iniciar por dos vías la intrínseca regulada por la mitocondria, y la extrínseca que inicia por la activación de receptores membranales acoplados a dominios de muerte (Danial y Korsmeje, 2004; Been y Woolf, 2004).

### **3.2.2 Vía intrínseca**

La vía intrínseca se activa por otro tipo de señales, como daño en el DNA, ausencia de FT's o estrés en el retículo endoplásmico (por ejemplo estrés por un aumento en el calcio intracelular). El proceso iniciado por estas señales terminará en la liberación del citocromo c que a su vez formará el apoptosoma y activará a las caspasas, que son las

moléculas efectoras de la apoptosis. Algunas e moléculas reguladoras de apoptosis como la familia de proteínas Bcl-2 son determinantes en el éxito o fracaso de las señales de muerte (Been y Woolf, 2004; Distelhorst y Shore, 2004).

### **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 (Hengartner et a., 2000, Yuan y Yanker, 2000).

Kerr (en Yaun, 2000), observó que los cambios morfológicos observados en la apoptosis eran activados por proteasas de cisteína que son activadas específicamente en la muerte apoptótica. Estas proteasas son parte de una larga familia conocida como caspasas. Las caspasas están altamente conservadas a lo largo de la evolución, y pueden encontrarse desde insectos hasta humanos. Las caspasas son consideradas los ejecutores centrales de las vías apoptóticas, porque ellas efectúan los cambios estructurales característicos de este proceso. Por ejemplo, la condensación del núcleo celular es causada probablemente por que las caspasas rompen proteínas del citoesqueleto, como la fodrina o gelsolina. Además, si se inhibe a las caspasas se observa una disminución o una prevención de la apoptosis (Hengartner et al., 2000).

La caspasas se han clasificado en: **A)** Caspasas con un dominio efector de muerte y que son activados por su interacción con dominios intracelulares de receptores de muerte como el Apo-1/Fas y receptores a TNF- $\alpha$  : caspasa 8 y 10. **B)** Caspasas que activan otras caspasas, con dominios de reclutamiento para la activación de caspasas: caspasas 1, 2, 4, 5, 9, 11 y 12. **C)** Caspasas con prodominios cortos, como la caspasa 3, la cual puede ser activada por la mayor parte de las caspasas (Yuan et al, 2000).

## **Familia de proteínas Bcl-2**

Las proteínas de la familia Bcl-2 pueden ejercer acciones anti y pro-apoptóticas y son determinantes en la regulación de la muerte celular (Reed, 1994; Burlacu, 2003; Danial and Korsmeyer, 2004, Sharpe et al, 2004; Cheng, 2006; Reed, 2006; Häcker and Weber, 2007). Comparten dominios llamados BH (del inglés BCL2 homology) y se dividen en tres familias funcionales. Las proteínas parecidas a Bcl-2 que son inhibidoras de apoptosis y comparten cuatro dominios BH (BH1-4), incluyen a Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 y A1; las proteínas con multidominios de muerte que son efectoras de la apoptosis, se incluyen a Bax, Bak y recientemente a Bok. Finalmente las proteínas con solo el motivo BH-3, las cuales se consideran iniciadoras de apoptosis, pues regularan la disponibilidad de las proteínas parecidas a Bcl-2 y de las efectoras de apoptosis (Walensky, 2006; Häcker y Weber, 2007).

Tanto Bcl-2 como Bax se han caracterizado como reguladores importantes de la viabilidad celular ya que responden a una gran cantidad de señales de muerte que pueden inhibir o facilitar. La proteína Bcl-2 tiene una acción anti-apoptótica. Por ejemplo, Bcl-2 puede mantener la sobrevivencia de neuronas simpáticas privadas de NGF. Por el contrario, Bax es una proteína pro-apoptótica, ampliamente expresada en el SNC. En ratones deficientes de Bax, aumenta el número de neuronas del ganglio cervical superior y del núcleo del nervio facial (Yuan et al, 2000; Been y Woolf, 2004).

Se piensa que la facilitación o inhibición de muerte celular por las proteínas Bcl-2 ocurre en la regulación de la liberación del citocromo c. La activación de Bax puede llevar a la formación de dímeros entre Bax y Bak que crearan un poro de permeabilidad mitocondrial que permitirá el paso del citocromo c al citoplasma. Por el contrario, la

activación de Bcl-2 promueve que esta proteína forme dímeros con Bax o Bak, resultando en un poro mitocondrial disfuncional e inhibiendo la liberación del citocromo c (Häcker y Weber, 2007). De hecho la presencia de Bcl-2 bloquea la salida del citocromo c de la mitocondria (Yang et al., 1997). Las proteínas con solo el motivo BH-3 puede promover apoptosis por activar a Bax o Bak o por inhibir a las proteínas anti-apoptóticas que estarían inhibiendo las acciones de Bax o Bak, dejando un balance hacia la muerte (Häcker y Weber, 2007).

Como observamos existe una regulación recíproca entre Bax y Bcl-2, el aumento en los niveles de Bax indican una disminución de la viabilidad celular y un aumento en la muerte. Por el contrario, el aumento de Bcl-2 indica un aumento en la viabilidad celular y una disminución en la muerte. La relación entre la disponibilidad de Bax y Bcl-2 puede determinar si una célula muere o no (Brenner et al., 2000; Tan et al., 2004; Chipuk et al., 2006; Dlugosz et al., 2006).

Además, otras moléculas tróficas como los FNT's facilitan la expresión de estas proteínas anti-apoptóticas. Por ejemplo, el NGF y el BDNF aumentan los niveles de Bcl-2 en neuronas corticales (Liu et al., 1999; Riccio et al., 1999).

### **3.2.3 Vía extrínseca**

La vía extrínseca depende de la activación de receptores con dominios de muerte como TNF- $\alpha$  (tumor de necrosis tumoral-alpha), lymphotoxin o TNF-b y el ligando Fas (FasL), (Hengartner, M. O., 2000), (Baud and Karin, 2001).

Veamos a detalle uno de estos sistemas; el TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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 sobrevivencia celular, iniciados por el TNF- $\alpha$  o por el mismo NGF. Yang, Lindholm, Konishi, Li, & Shen (2002), observaron la translocación del factor nuclear-kB en neuronas hipocampales, donde sólo está presente el receptor p55, sugiriendo el uso de esta vía para su función.

Además, en condiciones patológicas se han detectado diversas moléculas capaces de disparar cascadas moleculares que llevan a la apoptosis. Por ejemplo, la VIHgp120 (glucoproteína 120, derivada del VIH) se ha relacionado con la muerte neuronal observada por la Demencia Asociada al VIH (Kaul, Garden y Lipton, 2001; Galicia et al, 2003).

### **3.3 Restauración Neuronal como una función del sueño**

La noción de que el sueño restaura al cerebro surge desde principios del siglo XX con los trabajos de Henri Piéron (ver Capítulo 2). Piéron afirma que durante de vigilia se

forma una toxina, su acumulación provoca una condición de fatiga o una disminución en la *irritabilidad* del SN, llevando finalmente al sujeto al estado de sueño en condiciones normales. En el caso de un insomnio prolongado, debe existir una gran acumulación de la toxina puesto que provoca distintas lesiones corticales y finalmente la muerte (Piéron, 1913 revisado en Howell, 1913).

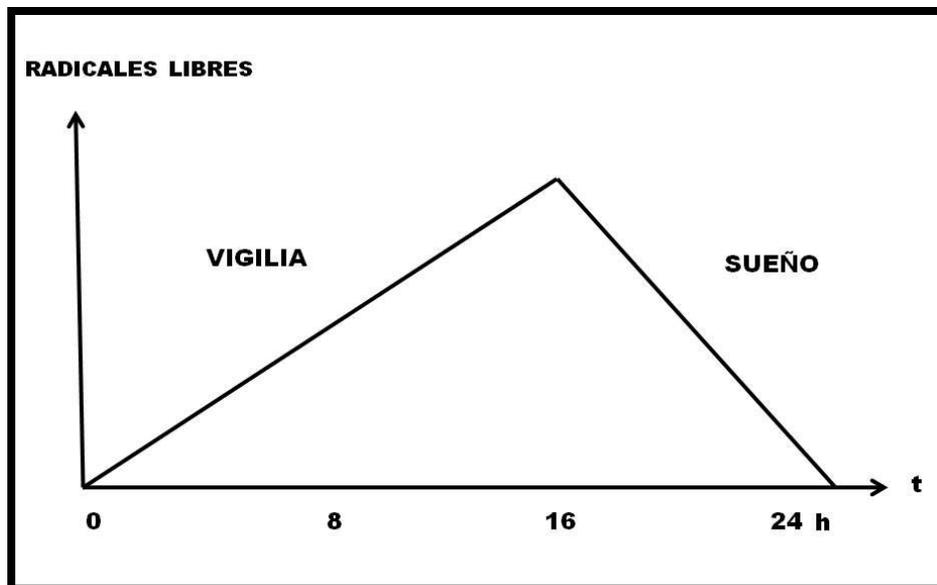
La obra de Piéron indica que el sueño es un periodo donde el organismo se desintoxica y la vigilia un periodo de intoxicación que puede dañar al cerebro. Desde entonces se ha asumido que el sueño restaura al cerebro. Para abordar a la restauración neuronal como una función del sueño primero debemos definir ¿qué significa restaurar? y ¿qué restauraría el sueño? El término restaurar se define como recuperar, colocar una “cosa” en el estado o circunstancia en que se encontraba anteriormente. Por lo que, hablando de sistemas cerebrales restaurar sería el proceso celular básico, necesario para que las neuronas y las conexiones neuronales tengan las condiciones óptimas después de un período de uso y desgaste, todo esto, para el buen funcionamiento del cerebro. Por lo tanto, el sustrato específico de la restauración serían las neuronas y sus conexiones. Diversos autores han teorizado sobre los mecanismos celulares implicados en dicha restauración.

*El sueño tiene una función antioxidante*, ya que, la vigilia ejerce una regulación positiva sobre radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ERO<sup>4</sup>); por el contrario, el sueño ejerce una regulación negativa (Reimund, 1994, Schulze, 2004).

---

<sup>4</sup> Las ERO resultan de la oxidación de compuestos celulares, si no son controlados por algunas enzimas antioxidantes como la catalasa o la glutatión peroxidasa pueden provocar daño y finalmente muerte celular. A este desbalance entre la producción de las ERO y las enzimas antioxidante se le conoce como estrés oxidante. Parte de la justificación de esta teoría es que el cerebro es un blanco importante de los radicales libres por utilizar una gran cantidad de oxígeno para su actividad, por tener una gran concentración de lípidos poliinsaturados, catecolaminas y elevadas concentraciones de hierro u otros metales que facilitan la generación de ERO.

Reimund (2004) propone que la producción de ERO es dependiente del metabolismo cerebral. En la vigilia se acumulan de manera que el balance se pierde y se genera un estado de estrés oxidante, es entonces cuando el sueño ocurre para disminuir los niveles de ERO y llevar al cerebro a un estado estable de oxidación (Fig. 3). Una vigilia prolongada llevaría a una acumulación excesiva de ERO, si el organismo no duerme para neutralizarlos se presentaría estrés oxidante y finalmente muerte neuronal inespecífica.



**Figura 3. Representación esquemática del flujo de radicales libres a lo largo de un período de 24 h. Obsérvese que en la vigilia los radicales aumentan y en el sueño disminuye. Modificado de Reimund, 1994.**

Schulze (2004) propone que el sueño protege a los circuitos corticales excitadores del daño celular a través del Factor Nuclear  $\kappa$ -B, que a su vez promueve la transcripción de productos neuroprotectores y sinaptogénicos. La reducción de la actividad cortical durante el sueño es un mecanismo de protección en sí mismo que permite un remodelamiento sináptico que implica la eliminación de circuitos neuronales dañados.

*El sueño restituye y desintoxica al organismo a un nivel celular; a través del glutatión que promueve la transmisión GABAérgica y la uridina que inhibe la transmisión glutamatérgica. La actividad de estos sistemas de neurotransmisión promovería el sueño o la vigila. Adicionalmente, el glutatión puede neutralizar los radicales libres producidos durante la vigilia (Inoué et al., 1995).<sup>5</sup>*

La función del sueño sería *re-llenar los depósitos de glucógeno el cuál generará la glucosa* necesaria para la actividad cerebral de la vigilia. Asumiendo, que durante la vigila se descompone el glucógeno cerebral (glial), para cubrir la alta necesidad energética de la actividad neuronal (Benington y Heller, 1995).

La función del sueño es el *reabastecimiento neuronal*. El sueño reabastece los recursos neuronales y redistribuye los elementos necesarios para el adecuado funcionamiento neuronal. Por ejemplo, la vesiculación del glutamato y su regreso a la región presináptica de los sitios que estuvieron más activos en la vigilia; el movimiento de la mitocondria de los procesos neuronales donde la hidrólisis del ATP es alta hacia el soma neuronal, donde la mitocondria puede replicarse (Gally y Edelman, 2004).

Como podemos observar, se proponen que el sueño restaura a las neuronas a través de dos mecanismos, uno de facilitación y otro de inhibición:

- 1) El sueño promueve señales positivas que permiten a las células obtener los recursos necesarios para su funcionamiento óptimo.

---

<sup>5</sup> Esta teoría retoma la idea de que un gran incremento en la excitabilidad cerebral puede llevar a la muerte de las neuronas, específicamente a través del sistema glutamatérgico. Los sistemas inhibidores como el GABAérgico disminuyen tal excitabilidad y finalmente protegerían de una posible muerte neuronal por excitotoxicidad. Recordemos que el sueño es básicamente iniciado y mantenido por la transmisión GABAérgica del área preóptica medial y ventrolateral (ver capítulo 1).

- 2) El sueño inhibe señales negativas para las neuronas, si estas señales no son reguladas pueden inducir muerte celular. De acuerdo a este razonamiento, la PS debe afectar la viabilidad celular.

A excepción de la teoría antioxidante del sueño, los mecanismos celulares de los planteamientos teóricos son sumamente específicos y resulta difícil pensar que de alguno de ellos depende el bienestar de la célula, pues su funcionamiento óptimo dependerá de múltiples señales. Revisare dos aproximaciones experimentales generales, una donde se explora la relación entre los FNTás y el sueño que se refiere al mecanismo 1); y otra, donde se analizan indicadores de daño celular en el cerebro de animales con diferentes períodos de privación de sueño, que corresponde al planteamiento 2).

### **3.4 Sueño y Factores Neurotróficos**

Como revisamos en el apartado 3.1 los FNT's son determinantes en la sobrevivencia y restauración neuronal. Si es verdad que el sueño sirve para restaurar al cerebro entonces los FNT's pueden ser las señales positivas idóneas para hacerlo; o al menos deben contribuir en parte. En este contexto revisaremos algunos experimentos realizados al respecto.

Se ha mostrado la presencia de los receptores p75, trkA, trkB y trkC en núcleos reguladores del sueño MOR, como el LDT, PPT, RD y LC (Yamuy et al., 2000); así como la presencia de NT3 en el 90% de células colinérgicas de PPT y LDT. Además, la administración de NGF y NT3 en el núcleos pontis oralis de gatos induce sueño MOR

(Yamuy et al., 1995; Yamuy et al., 2002). Presumiblemente por la facilitación de la excitabilidad celular de neuronas mesencefálicas (Yamuy et al., 2000).

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.

Krueger (1999), muestra 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.

Estos experimentos indican que los factores neurotróficos son facilitadores del sueño. Además, en el capítulo 2 revisamos que la PS aguda incrementa la expresión de NGF y BDNF en la corteza cerebral de ratas. Los FNT`s podrían funcionar como FIS, durante la vigilia se acumulan y cuando hay altas concentraciones se promueve el sueño; siendo este un mecanismo probable de restauración celular durante el sueño. Sin embargo, esta noción choca con los datos sobre aprendizaje y FNT`s; en primer lugar porque los FNT`s se sintetizan a demanda y en segundo lugar porque su síntesis en el cerebro adulto se ha relacionado con procesos de aprendizaje (Purcell y Carew, 2003), los cuales ocurren en la vigilia.

En conclusión, los FNT`s deben promover procesos de restauración celular todo el tiempo. En la vigilia está claro que promueven el aprendizaje y la excitabilidad celular (Purcell y Carew, 2003). En el sueño como hemos revisado en este apartado los FNT`s actúan como FIS, al parecer esto ocurre cuando alcanzan altas concentraciones. Es probable que durante el sueño también promuevan restauración celular, ya que en teoría siempre que estén presentes mandarán señales tróficas a las células.

### 3.5 Privación de sueño e integridad celular del sistema nervioso

Los trabajos de Lamberto Daddi en 1898 y Tarozzi en 1899 indican la presencia de cambios degenerativos en neuronas de los núcleos de la base, del cerebelo y de la corteza cerebral, principalmente en “el lóbulo anterior” (revisado en Bentivoglio y Grassi-Zucconi, 1997). Además, Pieron (1912) reporta que los perros privados de sueño por 270 h en promedio presentan cambios degenerativos en la corteza prefrontal; las células disminuyen de tamaño y se observa cromatólisis.

La pregunta de si el sueño promueve la restauración celular ha existido al menos desde esta época y se han evaluado diferentes indicadores moleculares de la integridad celular en el cerebro de sujetos bajo diferentes períodos de PS.

Se ha mostrado que la PSMOR por 6 días modifica el tamaño de las neuronas; en el LC se observa que la PS aumenta el área de las células mientras que en PPT/LDT y MPOH la reduce. En todos los casos el tamaño normal se recuperó después de 3 días de RS. El aumento en el área del LC por la PSMOR ocurre principalmente en células noradrenérgicas y en menor grado en células GABAérgicas. La reducción del área celular en PPT/LDT ocurre en células colinérgicas mientras que en células GABAérgicas solo se observa una ligera reducción. Finalmente, en el área MPOH son células GABAérgicas las que disminuyen su tamaño (Majumdar y Mallick, 2005). Todos los cambios en el tamaño de las neuronas pueden ser bloqueados con la administración i.p. de prazosina un bloqueador  $\alpha$ -adrenérgico. Sugiriendo que el cambio en el volumen celular es por acción de la transmisión noradrenérgica. Este concepto ya había sido sugerido por Bubenik y Monnier desde 1972, al observar que el tamaño de las células del LC es mayor en la vigilia o bajo

estrés y menor en el sueño. Además, describieron que existe una relación inversamente proporcional en la cantidad de actividad delta y el volumen celular. Por ejemplo, durante la vigilia hay poca actividad delta y el volumen celular es máximo; mientras que en el sueño hay mucha actividad delta y disminuye el volumen celular. (Bubenik y Monnier, 1972).

Diversos experimentos han explorado el efecto de la privación de sueño sobre el estrés oxidante en el cerebro, mostrando que los cambios ocurren de forma estructura-específicos. La PSMOR por 96 h en ratas disminuye los niveles de glutatión en el hipotálamo y en el tálamo (D'Almeida et al., 1998); aumenta la peroxidación de lípidos en el hipocampo, tálamo e hipotálamo y la disminuye en la corteza y el puente cerebral (Singh et al., 2008). La PS total por 5-11 días disminuye los niveles de superóxido dismutasa en el hipocampo y el tallo cerebral de ratas (Ramanathan et al., 2002). Mientras que en la corteza cerebral no se observa estrés oxidante por la PS crónica en ratas (Gopalakrishnan et al., 2004). A pesar de estos resultados, estudios recientes no han encontrado muerte celular por apoptosis o por necrosis después de diversos periodos de PS. La PST hasta por 14 días y la PSMOR por 96 h no provocan muerte celular en el cerebro adulto de ratas (Cirelli et al., 1999; Hipólido et al., 2002). La PS crónica no induce daños estructurales gruesos, ni en los microtúbulos del cerebro de ratas (revisado en Rechtschaffen et al., 2002). Además, 24 h de PST por manipulación gentil no induce apoptosis en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas (Montes-Rodríguez et al., 2004). De hecho, solo un trabajo ha mostrado que la PSMOR por 6 días promueve apoptosis en el área preóptica medial (MPOH); en el núcleo locus coeruleus (LC), en el núcleo pontino tegmental (PPT) y laterodorsal (LDT) de ratas (Biswas et al., 2006). Además, se ha observado daño celular por la PST en forma crónica únicamente en el núcleo supraóptico de ratas (Eiland et al., 2002).

Con base en estos datos podemos decir que la ausencia de sueño promueve estrés oxidante en el hipotálamo, el hipocampo y el tálamo de ratas. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre muerte celular en el cerebro después de diferentes periodos de PS han fallado en sustentar dicha muerte. El hipotálamo es más susceptible al estrés oxidante que las otras estructuras, ya que la PS provoca daño celular en el núcleo supraóptico y apoptosis en el núcleo preóptico medial (Eiland et al., 2002; Biswas et al., 2006).

En conclusión, los datos aquí discutidos indican que la PS no provoca muerte celular en el cerebro, al menos hasta por 14 días; sugiriendo que facilitar la viabilidad celular no es una función del sueño. El cerebro es capaz de neutralizar el estrés oxidante provocado por la PS evitando la muerte de las neuronas (al menos en la corteza cerebral, el hipocampo y el tálamo). De hecho, se ha mostrado que la PS aguda promueve la síntesis de moléculas que facilitan la sobrevivencia celular y la plasticidad sináptica. Por ejemplo, como revisamos en el capítulo 2, la PST por 6 y 8 h aumenta la concentración de NGF y BDNF respectivamente, en la corteza cerebral de ratas (Brandt et al., 2001; Cirelli et al., 2000). Otros ejemplos de los mecanismos protectores que se activan durante la PS son la disminución del estrés oxidante por la PSMOR por 72 h (Singh et al., 2008) y la inhibición de la apoptosis inducida por TNF-alfa y VIHgp120 después de 24 h de PS total (Montes-Rodríguez et al., 2004). Ambos efectos fueron observados en la corteza cerebral de ratas.

Estas evidencias apoyan la hipótesis de que la corteza cerebral y el hipocampo son estructuras que activan un sistema de “protección celular” ante la PS; sugiriendo la enorme importancia de mantener funcional y estructuralmente intactas estas áreas del sistema nervioso. También nos indican que son parte del sistema beneficiario del sueño.

### **3.6 Conclusiones**

La viabilidad celular puede ser un indicador de restauración celular. El funcionamiento adecuado de las células depende de una gran variedad de señales. Si los mecanismos de restauración son adecuados la célula vivirá, pero si son disfuncionales entonces morirá.

La sobrevivencia y muerte celular son también reguladas por diversas señales, tanto internas como externas. Existen varios puntos de regulación durante la muerte celular, por ejemplo, la familia de proteínas Bcl-2 son determinantes.

La mayoría de los trabajos han buscado muerte celular en el cerebro por efecto de la PS y han fallado. De alguna forma el cerebro evita que sus células mueran.

### 3.7 Referencias

- Akerstedt T, Nilsson PM (2003) Sleep as restitution: an introduction. *J Intern Med* 254: 6-12.
- Altar CA, Cai N, Bliven MJ, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389: 856-860.
- Benington JH, Hellen HC (1995) Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Progress in Neurobiol* 45: 347-360.
- Benn SC, Woolf CJ (2004) Adult neuron survival strategies-slammung on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 9: 686-700.
- Cirelli C, Shaw PJ, Rechtschaffen A, Tononi G (1999) No evidence of brain cell degeneration after long-term sleep deprivation in rats. *Brain Research* 840: 184-193.
- Cirelli C, Tononi G (2000) Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic System. *J Neurosci* 20: 9187-94.
- D'Almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira V, Tufik S (1997) Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neuroscience Letters* 235: 25-8.
- D'Almeida V, Lobo LL, Hipólido DC, Oliveira AC, Nobrega JN, Tufik S (1998) Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *NeuroReport* 9: 2853-6.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 116: 205-19.
- Distelhorst CW, Shore GC (2004) Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene* 23: 2875-80
- Edelman GM (1999) Building a picture of the brain. *Ann N Y Acad Sci* 882: 68-89.
- Edelman GM (2003) Naturalizing consciousness: a theoretical framework. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5520-4.
- Fraguera-González ME, Castellano-Benítez O, González-Hoyuela M (1999) Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. *Revista de Neurología* 28: 504-11.
- Galicia, O., Sánchez-Alavéz, M., Méndez-Díaz, M., Navarro, L. & Próspero-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 JA (2000) Sleep Loss and Temporal Memory. *Q J Exp Psychol* 53: 271-9.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-6.

- Inoué S, Honda K, Komoda Y (1995) Sleep as neuronal detoxification and restitution. *Behavioural Brain Research* 69: 91-6.
- Junying Y, Yanker BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-9.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-91
- Kato K, Masa T, Tawara Y, Kobayashi K, Oka T, Okabe A, Shiosaka S (2001) Dendritic aberrations in the hippocampal granular layer and the amygdalohippocampal area following kindled-seizures. *Brain Research* 901: 281-95.
- Kaul M, Garden GA, Lipton SA (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 410: 988-94.
- Krueger JM, Obál F, Kapás L, Fang J (1995). Brain organization and sleep function. *Behavioral Brain Research* 69: 177-85.
- Kushikata T, Fang J, Krueger JM (1999) Brain-derived neurotrophic factor enhances spontaneous sleep in rats and rabbits. *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiol* 276: R839-R845.
- Levi-Montalcini R (1986) The nerve growth factor: thirty-five years later. Nobel Lecture.
- Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS (1999) Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 27: 2086-90.
- Montes-Rodríguez, C. J., González-Lira, B., Alavez, S., Moran, J. & Prospéro-García, O. (2004). Prolonged waking reduce human immunodeficiency virus glycoprotein 120- or tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in the cerebral cortex of rats *Neurosci Lett* 2004; 360: 133-6.
- Monti B, Zanghellini P, Contestabile A (2001) Characterization of ceramide-induced death in cerebellar granule cells in culture. *Neurochemistry International*, 39: 11-18.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272-80.
- Purcell AL, Carew TJ (2003) Tyrosine kinases, synaptic plasticity and memory: insights from vertebrates and invertebrates. *Trends Neurosci* 26:625-30.
- Rabacchi SA, Kruk B, Hamilton J, Carney C, Hoffman JR, Meyer SL, Springer JE, Baird DH (1999) BDNF and NT4/5 Promote Survival and Neurite Outgrowth of Pontocerebellar Mossy Fiber Neurons. *Journal of Neurobiology* 40: 254-9.
- Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM (2002) Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *NeuroReport* 13: 1387-90.
- Reimmund E (1994) The free radical flux theory of sleep. *Medical Hypotheses* 43: 231-3.

- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286: 2358-61.
- Sanchez-Alavez M, Criado J, Gómez-Chavarrín M, Jiménez-Anguiano A, Navarro L, Díaz-Ruiz O, Galicia O, Sánchez-Narváez F, Murillo-Rodríguez E, Henriksen SJ, Elder JH, Próspero-García O (2000) HIV-and FIV-Derived gp120 Alter Spatial Memory, LTP, and Sleep in Rats. *Neurobiology of Disease* 7: 384-94.
- Schulze G (2004) Sleep protects excitatory cortical circuits against oxidative damage. *Medical Hypotheses* 63: 203-7.
- Schuman EM (1999) Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 105-9.
- Siao CJ, Tsirka SE (2002) Extracellular proteases and neuronal cell death. *Cell Molecular Biology* 48: 151-61.
- Takahashi P, Krueger JM (1999) Nerve growth factor enhances sleep in rabbit. *Neuroscience Letters* 264: 149-152.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller LD (2001) BDNF enhances quantal neurotransmitter and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 21: 4249-58.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, Welcher AA (1997) Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78:431-48.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-32.
- Yuan J, Yanker B A (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-9.
- Zigmond MJ, Blomm FE, Landis SC, Robets JL, Squire LR (1999) *Fundamental Neuroscience*. San Diego, CA, EEUU: Academic Press.

## CAPITULO 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sueño es un estado generado por el cerebro. En particular, los núcleos cerebrales a nivel del hipotálamo y del puente son los responsables del sueño y la vigilia. Estos constituyen el sistema ejecutor del sueño. Por otro lado, los estudios de privación de sueño han mostrado que los procesos cognoscitivos son los primeros en alterarse. El hipocampo y la corteza cerebral son las estructuras más afectadas por no dormir, indicando que son beneficiarias del sueño.

Es indudable que el sueño cumple con alguna función biológica importante, su preservación entre especies y la muerte inminente de un organismo cuando no duerme lo indican. Sin embargo, aunque se ha avanzado rápidamente en la descripción de los sistemas neuronales ejecutores del sueño, los mecanismos celulares de la función del sueño han sido poco explorados.

A pesar de que varias hipótesis señalan que el sueño restaura al cerebro existe poca evidencia experimental que sustente o descarten estas teorías. Si bien se han encontrado indicadores de estrés oxidante en el hipotálamo, el tálamo y el hipocampo después de varios periodos de privación de sueño; la mayoría de los trabajos no han podido mostrar que la PS provoque muerte neuronal. Dejando en entredicho que la sobrevivencia neuronal sea una función del sueño.

La protección del cerebro como una función del sueño es un planteamiento difícil de abordar; la restauración celular depende de múltiples señales internas y externas por lo que evaluarla en su totalidad resulta difícil. Sin embargo, si una célula presenta mecanismos celulares de restauración adecuados se reflejaría en su sobrevivencia. Por el contrario, si sus

mecanismos son insuficientes o están dañados la célula morirá. En este sentido, la viabilidad celular se puede evaluar en el éxito de muerte o sobrevivencia, así como en los niveles de moléculas que regulen dichos procesos. Las proteínas de la familia Bcl-2 son excelentes candidatos para estudiar la viabilidad celular, ya que contienen a miembros anti y pro – apoptóticos que regulan de forma determinante la muerte celular. Estas proteínas responden a una gran cantidad de señales de muerte desde daño en el DNA, estrés oxidante o ausencia de factores tróficos; indicando que son un punto de regulación crucial en la sobrevivencia celular. Además, el índice de Bcl-2/Bax ha resultado un buen indicador de la viabilidad celular, por lo que la estimación de los niveles de Bcl-2 y Bax nos permite predecir si la célula morirá o no (ver capítulo 3).

En este contexto, el objetivo de este trabajo es evaluar si la sobrevivencia celular es una función del sueño, para lo cual se diseñaron experimentos que evalúan la viabilidad celular en el cerebro de la rata; bajo condiciones espontáneas a lo largo del ciclo luz-oscuridad que corresponde al ciclo de sueño-vigilia o después de un periodo de privación o de rebote de sueño. Si es verdad que el sueño restaura a las células debería observarse que la viabilidad celular es facilitada durante el período de luz-sueño y después del período de rebote de sueño. Por el contrario, durante la vigilia espontánea en la fase de oscuridad o después de un periodo de privación de sueño esperaríamos que la viabilidad celular este reducida. Además, se evaluará la vulnerabilidad celular ante un la apoptosis inducida farmacológicamente durante el periodo de luz-sueño y durante el periodo de oscuridad-vigilia, para lo cual se evaluará la viabilidad celular después de administrar un inductor de muerte en ambas fases del ciclo. Esperando que durante la fase de oscuridad la vulnerabilidad celular a morir sea mayor que durante la fase de luz.

## 4.1 Hipótesis

La viabilidad celular en el cerebro de la rata esta facilitada durante el sueño en comparación con la vigilia.

## 4.2 Tesis específicas

Para corroborar o descartar la hipótesis he planteado cuatro tesis específicas:

- 1) La apoptosis espontánea en el cerebro de la rata adulta varía a lo largo del ciclo luz-oscuridad que corresponde al ciclo sueño-vigilia; siendo mayor en el período de oscuridad-vigilia que en el período de luz-sueño.
- 2) Los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica Bax, así como el índice de sobrevivencia celular (Bcl-2/Bax) en el cerebro de la rata adulta varían a lo largo del ciclo luz-oscuridad; que corresponde al ciclo sueño-vigilia. Durante el período de luz-sueño los niveles de Bcl-2 y el índice de sobrevivencia celular presentan sus valores máximos, mientras que los niveles de Bax están disminuidos. En la vigilia ocurre lo contrario.
- 3) La privación de sueño disminuye la viabilidad celular en el cerebro, al aumentar los niveles de Bax, disminuir los niveles de Bcl-2 y el índice de sobrevivencia celular. Por el contrario, el rebote de sueño facilita la viabilidad celular al aumentar los niveles de Bcl-2, el índice de sobrevivencia y disminuir los niveles de Bax.
- 4) La administración i.c.v. de un fármaco inductor de muerte celular en la fase de luz o en la fase de oscuridad tiene un efecto diferencial sobre la apoptosis, en la corteza cerebral y el hipocampo de la rata adulta. Promoviendo más muerte durante el

período de oscuridad-vigilia que durante el período de luz-sueño. Esto se debe acompañar de un aumento en los niveles de Bax y una reducción en los niveles de Bcl-2.

### **4.3 Objetivos**

- 1) Evaluar la muerte neuronal espontánea en la corteza prefrontal, corteza parietal, hipocampo, hipotálamo lateral, área preóptica, rafe dorsal, locus coeruleus y núcleo pedúnculo pontino tegmental de la rata a lo largo del ciclo luz-oscuridad (9:00, 13:00, 21:00 y 1:00 h).
- 2) Evaluar la expresión de Bcl-2 y Bax en la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, el puente cerebral y el estriado de la rata. En 6 puntos del ciclo luz oscuridad escogidos arbitrariamente (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 5:00 hrs).
- 3) Evaluar la expresión de Bcl-2 y Bax en la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo, el puente cerebral y el estriado de la rata. Después de una privación de sueño total (PST) por 24 h, después de un rebote de sueño de 24 h de un grupo bajo PST por 24 h y en el grupo control. Todos los animales se deben sacrificar a las 21:00 h.
- 4) Evaluar la muerte celular y las células inmunoreactivas a Bcl-2 y Bax en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas 24 h después de la administración i.c.v. de la glicoproteína 120 derivada del VIH (VIHgp120) en la fase de luz (13:00 h) o en la fase de oscuridad (1:00 h).

## **4.4 Método**

Para determinar si la hipótesis es correcta se realizaron cuatro experimentos, cada uno corresponde a las cuatro tesis específicas y a los objetivos. En este apartado reporto los grupos, los fármacos, el procedimiento y el análisis que se utilizó en cada uno de ellos. En el apartado 4.5 se detallan las técnicas.

### **4.4.1 Muerte celular espontánea**

*Sujetos:* 10 ratas macho de la cepa Wistar entre 250-300 g de peso. Bajo un ciclo luz-oscuridad de 12-12 (luces encendidas a las 08:00 am), con agua y alimento *ad libitum*.

*Grupos.* Se hicieron 2 grupos de 5 ratas cada uno; un grupo correspondía a la fase de luz y el otro a la de oscuridad. Para el grupo de la fase de luz se sacrificaron 2 sujetos a las 9:00 h y 3 a las 13:00 h; en el grupo de oscuridad se sacrificaron 3 sujetos a las 21:00 h y 2 a la 1:00 h.

*Fármacos:* Anticuerpos contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), (Santa Cruz Biotechnology); TUNEL (Roche Applied Science); medio de montaje con DAPI (VECTOR).

#### **Procedimiento**

Para el grupo de la fase de luz se sacrificaron dos sujetos a las 9:00 h y tres a las 13:00 h; en el grupo de oscuridad se sacrificaron tres sujetos en el punto de las 21:00 h y dos en el punto de la 1:00 h. Se perfundió a los animales y se extrajo el cerebro para hacer el proceso histológico (ver proceso histológico en el apartado de técnicas). Se hizo un triple marcaje, para marcar las células en proceso de muerte se utilizó la técnica de TUNEL y la tinción de DAPI; para marcar a los astrocitos se hizo una inmunohistoquímica contra GFAP

(ver muerte celular en el apartado de técnicas). El TUNEL se marcó en verde por la fluoresceína, en azul DAPI y en rojo los astrocitos por la rodamina, si una neurona estaba muriendo la colocalización resultaba amarillo (Fig. 1A). Posteriormente se tomaron fotos en un microscopio de fluorescencia y se contaron las células en proceso de muerte en la corteza prefrontal, la corteza parietal, el hipocampo, el hipotálamo lateral, el área preóptica, el rafe dorsal, el locus coeruleus y el núcleo pedúnculo pontino tegmental. (Ver adquisición de imágenes en el apartado de técnicas)

### **Análisis**

Se realizó la prueba estadística “U de Mann-Whitney” ya que los datos no presentaban una distribución normal. Se comparó la cantidad de núcleos fragmentados y condensados que presentaba cada una de las estructuras cerebrales. La comparación fue hecha entre el grupo que fue sacrificado en la fase de luz y el grupo sacrificado en la fase de oscuridad. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando presentaban una  $P \leq 0.05$ .

#### **4.4.2 Variaciones diurnas de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax**

*Sujetos:* 48 ratas macho de la cepa Wistar entre 250-300 g de peso. Bajo un ciclo luz-oscuridad de 12-12 (luces encendidas a las 08:00 am), con agua y alimento *ad libitum*.

*Fármacos:* Anticuerpos desarrollados en ratón para Bcl-2 y Bax (Sta. Cruz Biotechnology).

*Grupos.* Se hicieron 6 grupos de 6 ratas cada uno, se sacrificó un grupo por cada punto del ciclo luz-oscuridad (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 5:00 h).

## **Procedimiento**

Se sacrifico a 6 sujetos en 6 puntos del ciclo luz-oscuridad (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 5:00 h) se extrajo el cerebro y se hizo la disección del hipotálamo y el puente cerebral, ya que contienen núcleos promotores del sueño y la vigilia; de la corteza prefrontal y el hipocampo por ser los más afectados por la privación del sueño y el estriado como una estructura control. (Ver disección en el apartado de técnicas)

Una vez procesadas las muestras se realizaron los western blots para la cuantificación de Bcl-2 y para Bax. Se usaron muestras independientes. La señal se detectó por quimioluminiscencia y se realizó el análisis densitométrico con el software Image J 1.38x (NHI). Todas las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau (SIGMA) con el objetivo de corroborar el cargado adecuado de los geles. Para el método detallado del western blot ver Montes-Rodríguez et al., 2009.

## **Análisis**

*Variaciones diurnas.* Cada gel contenía seis muestras, cada una provenía de un sujeto sacrificado en uno de los seis puntos del ciclo. Para hacer comparativos los geles, se hizo un promedio de todas las bandas por membrana y fue considerado como el 100%. Cada banda fue referida al promedio y se obtuvo un valor relativo por banda. Posteriormente, se promediaron los seis sujetos de cada punto del ciclo para obtener el valor promedio por grupo.

*Fase de luz vs fase de oscuridad.* Los grupos de las 9:00, 13:00 y 17:00 h se promediaron para tener un promedio de la fase de luz y los grupos de las 21:00, 1:00 y 5:00 h se promediaron para el de la fase de oscuridad. Esto se hizo para cada estructura.

*Índice de sobrevivencia celular.* Con el fin de tener un indicador más real del sistema que regula la viabilidad celular se obtuvo el índice de sobrevivencia celular al dividir los valores relativos de la expresión de Bcl-2 entre los valores relativos de Bax por cada rata.

Para evaluar las diferencias de los niveles de Bcl-2, Bax y el índice de sobrevivencia celular en los seis puntos del ciclo luz-oscuridad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor por cada una de las cinco estructuras. Para el análisis post-hoc se usó la prueba LSD. Para determinar las diferencias entre la fase de luz y la fase de oscuridad se realizó la prueba “t”. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando presentaban una  $P \leq 0.05$ . Para ver el análisis de cada grupo ver la Tabla 2 en el Capítulo 5.

#### **4.4.3 Variaciones en los niveles de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax por las manipulaciones de sueño**

*Sujetos:* 27 ratas macho de la cepa Wistar entre 250-300 g de peso. Bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 (luces encendidas a las 08:00 am), con agua y alimento *ad libitum*.

*Fármacos.* Anticuerpos desarrollados en ratón Bcl-2, Bax y  $\alpha$ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology).

*Grupos.* Se hicieron 3 grupos de 9 ratas cada uno, el grupo control de caja (CC), el grupo de privación de sueño total (PS) y el grupo de rebote de sueño (REB). Todos los sujetos fueron sacrificados a las 21:00 h.

#### **Procedimiento**

Al grupo de PS se le privó de sueño por 24 horas mediante el método de manipulación gentil por considerarse el menos estresante. Para mantener despiertos a los sujetos se les colocaba objetos novedosos en sus cajas, o se le movía cada que presentaban indicios de sueño. El grupo de RS se le permitió dormir libremente por 24 horas después de una PS por 24 h. El grupo control de caja estuvo en las mismas condiciones ambientales que los otros dos pero a este se le permitió dormir normalmente.

Al término de las manipulaciones experimentales todos los sujetos fueron sacrificados en el punto de las 21 h. Se extrajo el cerebro y se hizo la disección de la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo y el estriado. Los niveles de Bcl-2, Bax y  $\alpha$ -tubulina fueron evaluados por el método de western blot (ver western blot en el apartado de técnicas).

### **Análisis**

El análisis de los datos se hizo igual el en las variaciones diurnas excepto que se utilizó como post-hoc la prueba de Student-Newman Keuls y cuando los resultados no presentaban distribución normal se aplicó la ANOVA de rangos. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando presentaban una  $P \leq 0.05$ . Para ver el análisis de cada grupo ver la Tabla 2 en el capítulo 5.

#### **4.4.4 Vulnerabilidad del cerebro**

*Sujetos:* 30 ratas macho de la cepa Wistar entre 250-300 g de peso. Bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 (luces encendidas a las 08:00 am), con agua y alimento *ad libitum*.

*Fármacos:* PBS y VIHgp120 (140 ng/5µl), anticuerpos para Bcl-2 y Bax (Santa Cruz Biotechnology), 1:00; TUNEL (*Roche Applied Science*); medio de montaje con DAPI (VECTOR).

*Grupos.* Cuatro grupos de 5 ratas cada uno, dos en la fase de luz y dos en la de oscuridad; estos se dividieron por el tratamiento farmacológico, PBS ó VIHgp120

### **Procedimiento**

Se implantó una cánula de acero inoxidable por cirugía estereotáxica dirigida al ventrículo lateral de la rata para administrar los fármacos. Antes del día de administración se corroboró el libre paso de 5µl de solución salina a través de la cánula, solo se utilizaron las ratas con la cánula permeable para asegurar que estuviera en el ventrículo. Se administró en un ventrículo cerebral para asegurar que el fármaco llegaría a todo el tejido cerebral. Después de 10 días de recuperación, se administró i.c.v. 5 µl de PBS o VIHgp120 en una concentración de 140 ng; durante las fase de luz a las 13:00 h o durante la fase de oscuridad a a la 1:00 h. Se utilizó una jeringa Hamilton y una bomba de micro-administración (Kd-Scientific 200).

Veinticuatro horas después de la administración del fármaco se sacrificó a todos los sujetos, se perfundió y se extrajo el cerebro para el proceso histológico. Para corroborar que la cánula estuviera en el ventrículo de la rata se realizó la tinción de violeta de cresilo; para evaluar la muerte celular se obtuvieron cortes de la corteza prefrontal, parietal y el hipocampo. Se cuantificaron como células en proceso de muerte aquellas que presentaban la cromatina fragmentada (evaluada por TUNEL) y los núcleos condensados (evaluados por DAPI). En cortes consecutivos se hizo una inmunohistoquímica contra Bcl-2 y contra Bax.

Se hizo la adquisición de imágenes de la corteza de manera bilateral en cada estructura. Para detalles de todas las técnicas ver el apartado 4.5.

### **Análisis**

Se realizó una ANOVA de dos factores, uno por la fase (luz vs oscuridad) y otro por el tratamiento (PBS vs VIHgp120), como post-hoc se usó la prueba de Student-Newman Keuls. Para los datos de la inmunohistoquímica contra Bcl-2 y Bax se realizó una ANOVA de un solo factor, y como post.hoc la prueba de Student-Newman Keuls. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando presentaban una  $P \leq 0.05$ .

## **4.5 Técnicas**

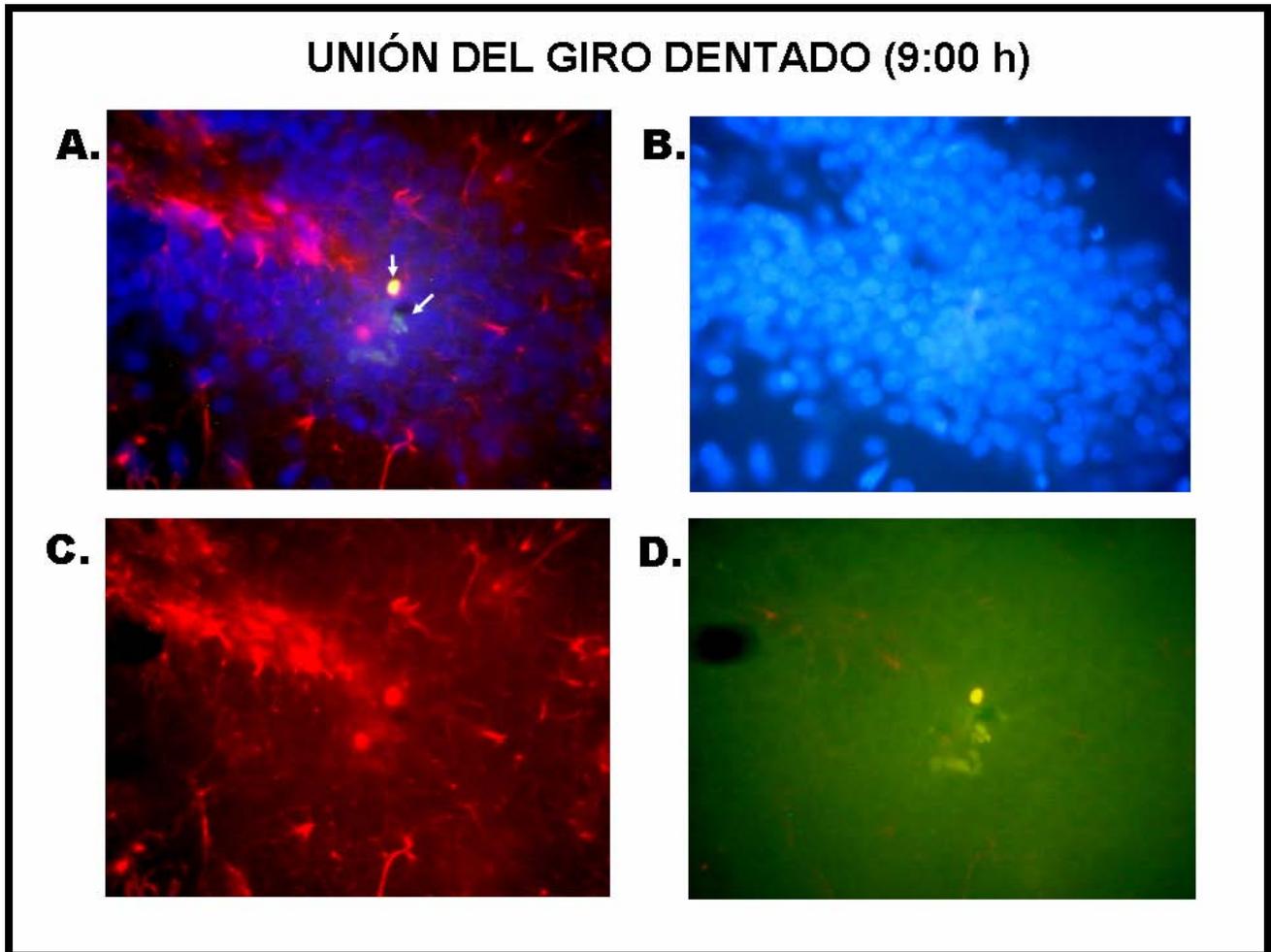
*Proceso histológico.* Primero se realizó la perfusión transcardíaca, para lo cual se anestesiaron a las ratas con 0.5 ml de pentobarbital. Se expuso el corazón y se administró en el ventrículo izquierdo cardíaco 200 ml de PBS 0.01 M, seguido de 200 ml de paraformaldehído al 4% en PBS 0.2 M. Se extrajo el cerebro de las ratas. Posteriormente, los cerebros pasaron por un proceso de fijación, el cual 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%. Finalmente, los cerebros se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se hicieron cortes coronales a 30 micras en diferentes niveles para obtener las estructuras de interés. Se colocaron en portaobjetos y se realizó la tinción correspondiente.

*Muerte celular.* Se cuantificaron como células en proceso de muerte aquellas que presentaban la cromatina fragmentada (evaluada por TUNEL) y los núcleos condensados (evaluados por DAPI). El TUNEL es una hibridación *in situ* que permite marcar los

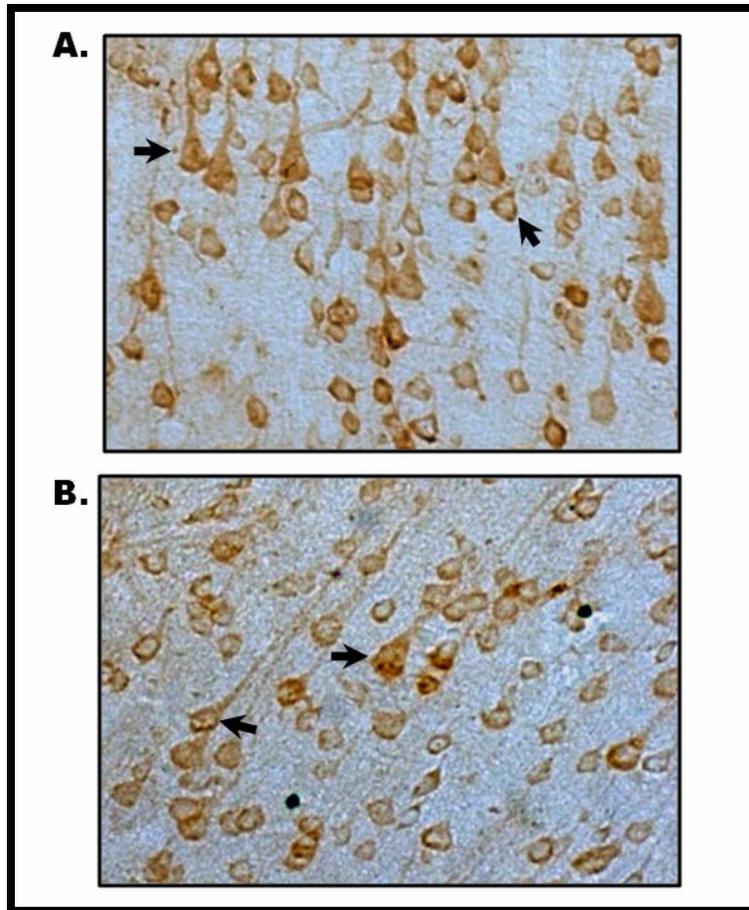
nucleótidos con fluorescencia. Aquellas células que presentan el núcleo fragmentado emitirán señal indicando que están bajo un proceso de apoptosis (Fig. 1D). Para esto se mezclaron nucleótidos dUTP marcados con fluoresceína y la DNA polimerasa terminal, dicha enzima pega el nucleótido marcado a los 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 con la 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 un medio de montaje que contiene DAPI (SIGMA). El DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) es un colorante fluorescente que tiene afinidad por el ADN, nos permite evaluar los núcleos celulares en proceso de muerte por sus características morfológicas y la cantidad de fluorescencia emitida. Aquellos que están en proceso de apoptosis están condensados, son más pequeños y emiten más fluorescencia (Fig. 1B).

*Inmunohistoquímica.* Se realizó por flotación. Primero se bloquea contra la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% en PBS durante veinte minutos, se hacen tres lavados de 5 min cada uno en Triton al 0.3% en PBS (T-PBS). Posteriormente, se bloquea con suero normal de caballo, cabra, ratón o conejo en PBS (1:200) durante 20 m; el tipo de suero depende del anticuerpo primario, si el primario está desarrollado en conejo se bloquea con cabra, si se desarrolló en ratón se bloquea con caballo y viceversa. Se incuban en el anticuerpo primario por 24, 48 ó 72 h a 4°C (el tiempo de incubación depende de la eficiencia del anticuerpo). Después del primario se realizan 3 lavados con T-PBS y se incuban en el anticuerpo secundario biotilado por 1 hora (1:200 en T-PBS y suero de caballo, ratón o cabra). Se lava 3 veces por 5 min en T-PBS y se coloca en el complejo AB por una hora. Finalmente se revela con diamino benzidina (DAB), la señal observada es de

color sepia (Fig. 2). Los cortes se montan en portaobjetos gelatinizados y se cubren con un medio de montaje que contenga resina (Cytoseal-60, Richard Allan Scientific).



**Figura 1. Muerte celular espontánea en la unión de las capas del giro dentado del hipocampo del la rata. B, núcleos teñidos con DAPI; C, inmunohistoquímica contra GFAP; D, núcleos fragmentados evaluados por TUNEL; A, colocalización de B-D.**



**Figura 2. Células inmunoreactivas a Bcl-2 (A) y a Bax (B) en la corteza cerebral de la rata adulta.**

*Adquisición de imágenes.* La adquisición de las imágenes se realizó en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX41 acoplado a la cámara Evolution VF COLOR (Media Cybernetics), con el programa Image ProPlus 5.1 (Media Cybernetics). Las imágenes se tomaron con un objetivos OLYMPUS Plan N, con un aumento de 40x para TUNEL, DAPI e inmunohistoquímicas con fluorescencia y con un aumento de 10X para las inmunohistoquímicas de luz (Fig. 1 y 2 respectivamente).

*Cirugía.* Se anestesió a las ratas con una mezcla de: carbalem 1ml, rompum 1ml, ketamina 5ml y salina 12ml; se administró 0.8 – 1.2 ml intraperitoneal (i.p.), por cada rata

con un rango de peso entre 250-350 grs. Se colocó a la rata en un aparato estereotáxico y se localizó sobre el cráneo la posición del ventrículo lateral (AP=-0.8; L=1.5; V=3.8 referente a Bregma). Se introdujo la cánula, la cual fue fijada con acrílico dental y un par de tornillos de sostén. Se dio un período de recuperación de 10 días.

*Disección.* Se extrae el cerebro en fresco, todo se maneja en hielo. Primero se coloca el cerebro con su porción basal hacia arriba, el hipotálamo se puede identificar fácilmente como una esfera y para extraerlo se corta alrededor de él y se retira con una espátula; para extraer el puente cerebral se separó el cerebelo y se hicieron dos cortes, uno a nivel de la unión del mesencéfalo con el puente y otro a nivel la unión ponto-medular. Finalmente, mediante un corte sagital se separaron los dos hemisferios cerebrales, la corteza prefrontal se obtuvo después de un corte vertical por delante de la rodilla del cuerpo calloso. El hipocampo se removió al cortar el fornix; por debajo del hipocampo se identificó un tejido que presenta estrías y que corresponde a la cabeza del núcleo estriado.

## CAPITULO 5. RESULTADOS

### 5.1 Muerte celular espontánea

**Tesis 1.** *La apoptosis espontánea en el cerebro de la rata adulta varía a lo largo del ciclo luz-oscuridad que corresponde al ciclo sueño-vigilia; siendo mayor en el período de oscuridad-vigilia que en el período de luz-sueño.*

Se comparó la apoptosis espontánea en neuronas y en astrocitos en el cerebro de la rata adulta durante la fase de luz vs la fase de oscuridad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas por el ciclo en la muerte celular en ninguna de las nueve estructuras analizadas ( $P \geq 0.05$ ).

Para tener una idea de la distribución de la muerte celular espontánea en las neuronas y en los astrocitos del adulto nuestro la sumatoria de células en proceso de muerte en cuatro puntos del ciclo en la Figura 1. Como se puede observar, prácticamente no se observaron neuronas en proceso de muerte y no presentan una distribución circadiana. Para darnos una idea de esto, en 180 cortes (nueve estructuras x lado x diez sujetos) solo se cuantificaron ocho neuronas en procesos de muerte. Si hacemos una equivalencia a  $\text{mm}^2$ , resulta que cada célula bajo apoptosis que se cuantifico por campo correspondería a 50 células en un  $\text{mm}^2$ . Si tomamos como cierto que en la corteza cerebral existen aproximadamente 146,000 neuronas por  $\text{mm}^2$  (Rockel et al., 1980) entonces se morirían el 0.003% de neuronas por  $\text{mm}^2$  espontáneamente.

En la Fig. 1A se observa que la corteza cerebral y el hipocampo básicamente no presentan neuronas en proceso de muerte, la mayoría de las neuronas cuantificadas se observaron en el puente cerebral (Fig. 1B). Lo mismo ocurre en los astrocitos (Fig. 1C-

D). Es probable que la corteza y el hipocampo sean estructuras con una viabilidad celular alta.

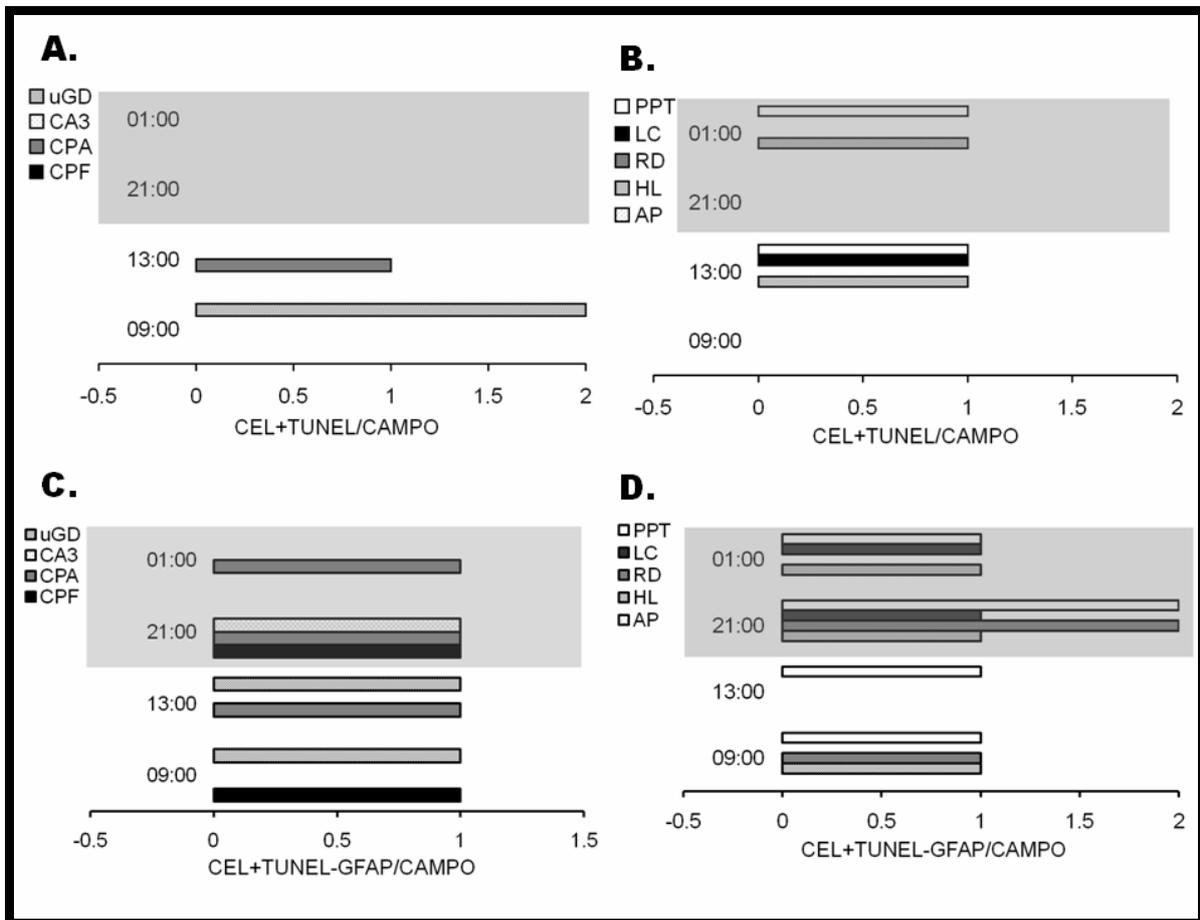


Figura 1. de neuronas (A, B) y astrocitos (C, D) en proceso de muerte en cuatro puntos del ciclo luz-oscuridad, en la corteza cerebral, el hipocampo (A, C), el hipotálamo y el tallo cerebral (B, D) de ratas adultas. Grupos: 9:00 h, N=2; 13:00 h, N=3; 21:00 h, N=3; 1:00 h, N= 2. CPF, corteza prefrontal; CPA, corteza parietal; CA3, cuernos de Ammon 3; uGD, unión del giro dentado; HL, hipotálamo lateral; APO, área preóptica; RD, rafe dorsal; LC, locus coeruleus; PPT, núcleo pedunculo pontino tegmental. Obsérvese que solo se encontraron 8 neuronas en proceso de apoptosis en 180 cortes analizados, la apoptosis basal es muy baja. Se encontraron dos neuronas en proceso de muerte en la uGD y una en la CPA; en el puente cerebral se encontraron cinco, por lo que esta fue la estructura que tuvo mayor cantidad de neuronas en apoptosis.

## 5.2 Variaciones diurnas de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax

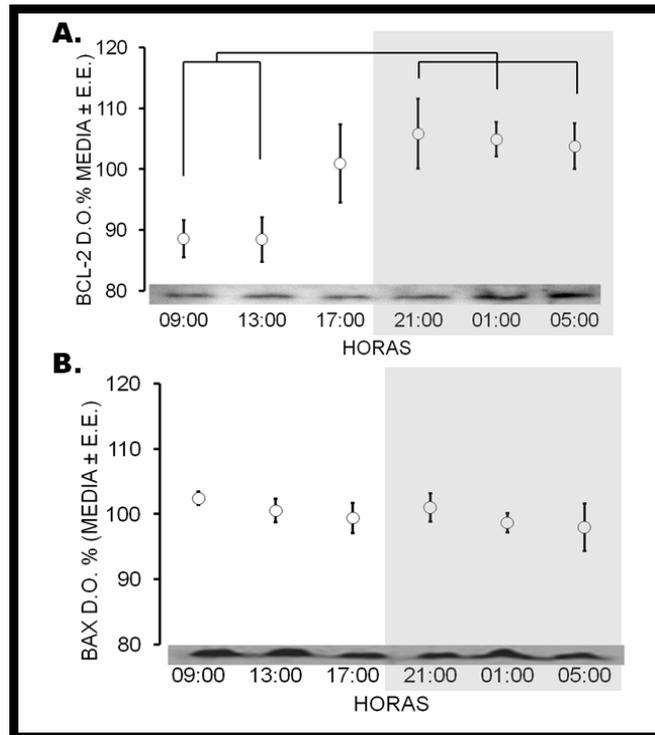
**Tesis 2.** *Los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica Bax, así como el índice de sobrevivencia celular (Bcl-2/Bax) en el cerebro de la rata adulta varían a lo largo del ciclo luz-oscuridad; que corresponde al ciclo sueño-vigilia. Durante el período de luz-sueño los niveles de Bcl-2 y el índice de*

*sobrevivencia celular presentan sus valores máximos, mientras que los niveles de Bax están disminuidos. En la vigilia ocurre lo contrario.*

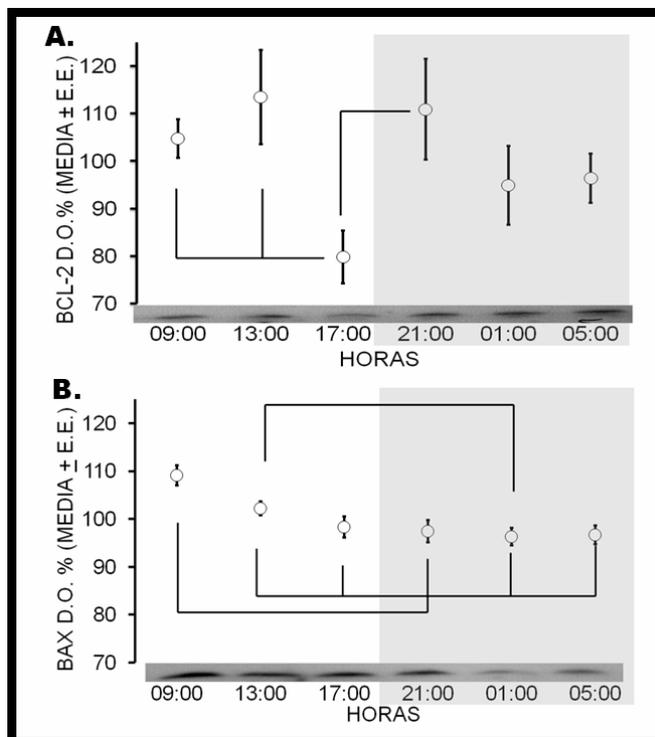
Para corroborar o descartar la hipótesis se midieron los niveles de Bcl-2 y Bax por western-blot en la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, el puente cerebral y el estriado de la rata adulta en seis puntos del ciclo luz oscuridad (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 5:00 h). Se obtuvo el índice de sobrevivencia celular (Bcl2/Bax). Además, se compararon los valores promedio de Bcl-2, Bax y Bcl2/Bax durante la fase de luz vs la fase de oscuridad.

*Variaciones diurnas.* Bcl-2 varía a lo largo del ciclo luz-oscuridad en la corteza prefrontal, el hipotálamo y el estriado; mientras que, Bax varía en el hipotálamo, el puente cerebral y el estriado;  $P \leq 0.05$  (Fig. 2-5). Los valores de “P” y de “F” se resumen en la Tabla 1.

En la corteza prefrontal se observaron los niveles máximos de Bcl-2 a las 21:00, 1:00 y 5:00 h comparado con las 9:00 y 13:00 h; el aumento fue de 16% (Fig. 2A). Bax permaneció constante (Fig. 2B). En el hipotálamo se observaron los niveles mínimos de Bcl-2 en el punto de las 17:00 h y los niveles máximos a las 13:00 y 21:00 hrs (Fig. 3A); con un cambio de 32% en promedio. Bax presentó su punto máximo al inicio de su fase de luz (9:00 h) y los puntos mínimos al final de la fase de oscuridad (1:00 y 5:00 h), con una diferencia de 13% (Fig. 3B).



**Figura 2.** Variaciones diurnas de Bcl-2 (A) y Bax (B) en la corteza prefrontal de la rata adulta, las líneas indican diferencias estadísticamente significativas,  $P \leq 0.05$ . Observe que Bcl-2 presenta sus máximos niveles en la fase de oscuridad, que es cuando la rata está despierta; es probable que durante esta fase la corteza prefrontal esté más protegida. Bax por el contrario permanece constante a lo largo del ciclo.



**Figura 3.** Variaciones diurnas de Bcl-2 (A) y Bax (B) en el hipotálamo de la rata adulta, las líneas indican diferencias estadísticamente significativas,  $P \leq 0.05$ . Bcl-2 presenta variaciones bifásicas, con niveles mínimos al final de cada fase. Bax está facilitado al principio de la luz, sin embargo, es reprimido durante la oscuridad.

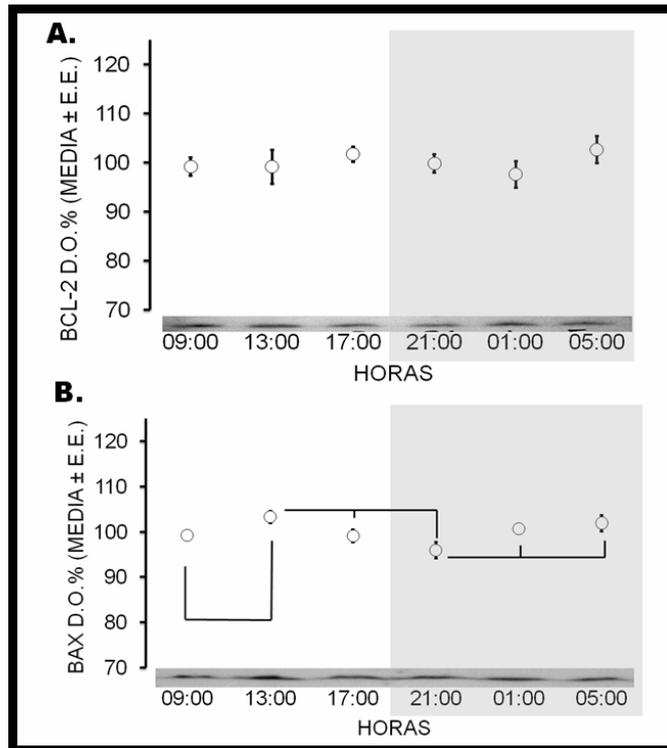


Figura 4. Variaciones diurnas de Bcl-2 (A) y Bax (B) en el puente cerebral de la rata adulta, las líneas indican diferencias estadísticamente significativas,  $P \leq 0.05$ . Bax presenta ligeras variaciones diurnas, su máximo pico se observa a la mitad de la fase de luz y el mínimo al inicio de la oscuridad.

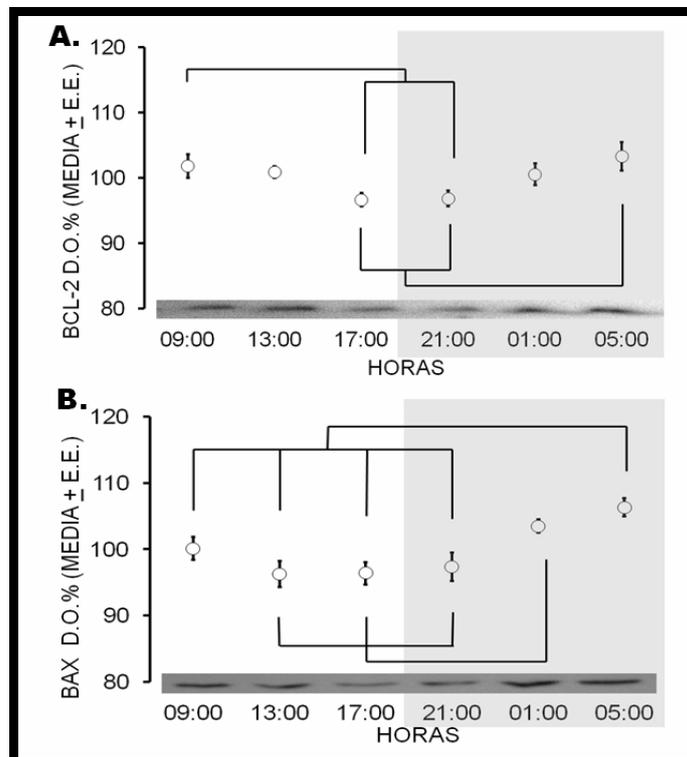


Figura 5. Variaciones diurnas de Bcl-2 (A) y Bax (B) en el estriado de la rata adulta, las líneas indican diferencias estadísticamente significativas,  $P \leq 0.05$ . Ambas proteínas presentan claras variaciones diurnas, disminuyen en la transición luz-oscuridad y aumentan en la transición oscuridad-luz; estos datos sugieren la alta reactividad de estos genes al ciclo luz-oscuridad.

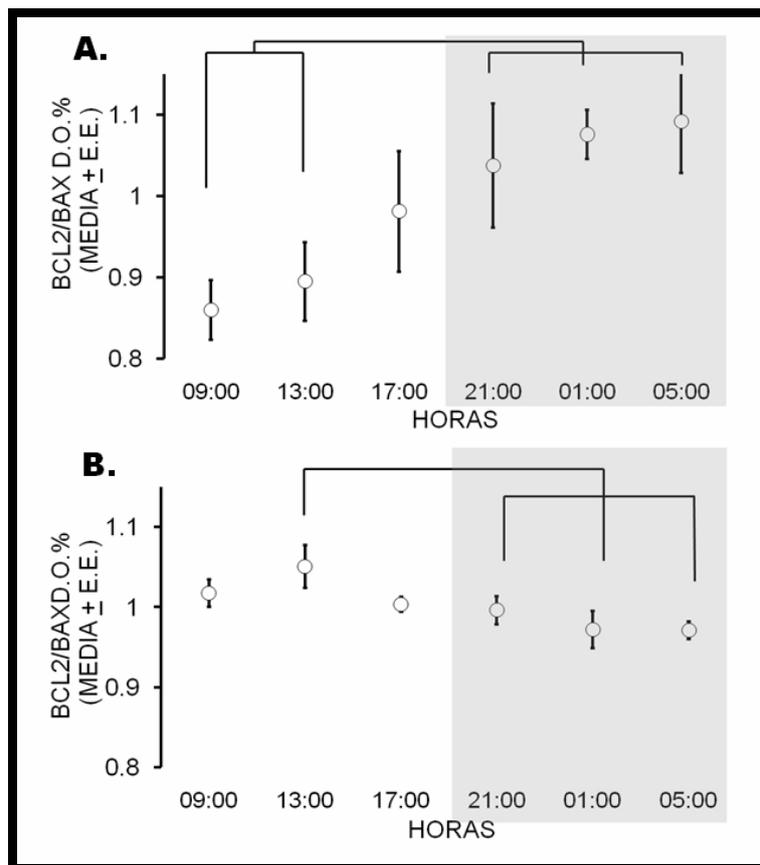
En el puente cerebral los niveles máximos Bax se observaron en el punto a las 13:00 h y los mínimos a las 21:00 h, con una diferencia de 8%; los niveles de Bcl-2 no cambiaron (Fig. 4). En el estriado tanto Bcl-2 como Bax presentan variaciones diurnas, ambas proteínas presentan sus niveles mínimos en la transición de luz a oscuridad y los máximos en la transición de oscuridad a luz (Fig. 5). El porcentaje de cambio para Bcl-2 fue de 7% y para Bax de 10%. Finalmente, en el hipocampo no se observaron variaciones diurnas de Bcl-2 y Bax (Tabla 1);  $P > 0.05$ .

**TABLA 1. VALORES ESTADÍSTICOS PARA LAS VARIACIONES ESPONTÁNEAS DE BCL-2, BAX Y BCL-2/BAX EN EL CEREBRO DE LA RATA ADULTA**

		Variaciones Diurnas		Luz-Oscuridad	
		ANOVA (LSD)		Estadístico "t"	
		P	F	P	T
Corteza Prefrontal	BCL-2	0.014	3.331	0.002	-3.313
	BAX	0.747	0.536	0.342	0.962
	BCL-2/BAX	0.035	2.787	0.002	-3.390
Hipocampo	BCL-2	0.415	1.035	0.069	1.881
	BAX	0.283	1.299	0.043	2.077
	BCL-2/BAX	0.883	0.343	0.868	0.168
Hipotálamo	BCL-2	0.045	2.601	0.846	-0.196
	BAX	<0.001	6.126	0.001	3.468
	BCL-2/BAX	0.072	2.279	0.186	-1.350
Puente	BCL-2	0.723	0.596	0.989	-0.0139
	BAX	0.013	3.699	0.618	-0.503
	BCL-2/BAX	0.165	1.737	0.618	-0.503
Estriado	BCL-2	0.021	3.155	0.759	-0.309
	BAX	<0.001	6.094	0.006	-2.937
	BCL-2/BAX	0.042	2.661	0.006	2.903

Para el análisis de las variaciones diurnas se realizó un ANOVA y LSD como post-hoc. Para comparar el ciclo de luz contra el ciclo de oscuridad se utilizó la prueba "t" (para detalles ver el apartado de Método en el capítulo 4).

El índice de sobrevivencia presenta variaciones diurnas únicamente en la corteza prefrontal y en el estriado (Fig. 6, Tabla 1);  $P \leq 0.05$ . En la corteza prefrontal el índice es mayor en los puntos de las 21:00, 1:00 y 5:00 hrs comparados con los puntos de las 9:00 y 13:00 hrs (Fig. 6A); en el estriado esto se invierte, el índice es menor en los puntos de las 1:00 y 5:00 comparados con el punto de las 13:00 hrs (Fig. 6B). Para los valores de “P” y “H” ver Tabla 1.



**Figura 6.** Variaciones diurnas del índice de sobrevivencia o viabilidad celular (Bcl-2/Bax) en la corteza prefrontal (A) y en el estriado (B) de la rata adulta, las líneas indican diferencias estadísticamente significativas,  $P \leq 0.05$ . Obsérvese que el índice de sobrevivencia celular esta facilidad en forma inversa estas estructuras; en la corteza prefrontal la viabilidad celular esta facilitada en la fase de oscuridad, mientras que en el estriado esta facilitada en la fase de luz.

*Fase de luz vs fase de oscuridad.* El análisis por ciclo mostró que Bax es más reactivo a la luz-oscuridad, ya que presenta diferencias estadísticamente significativas en el hipocampo, el hipotálamo y el puente cerebral. Bcl-2 solo cambió en la corteza prefrontal (Fig. 7, Tabla 1).

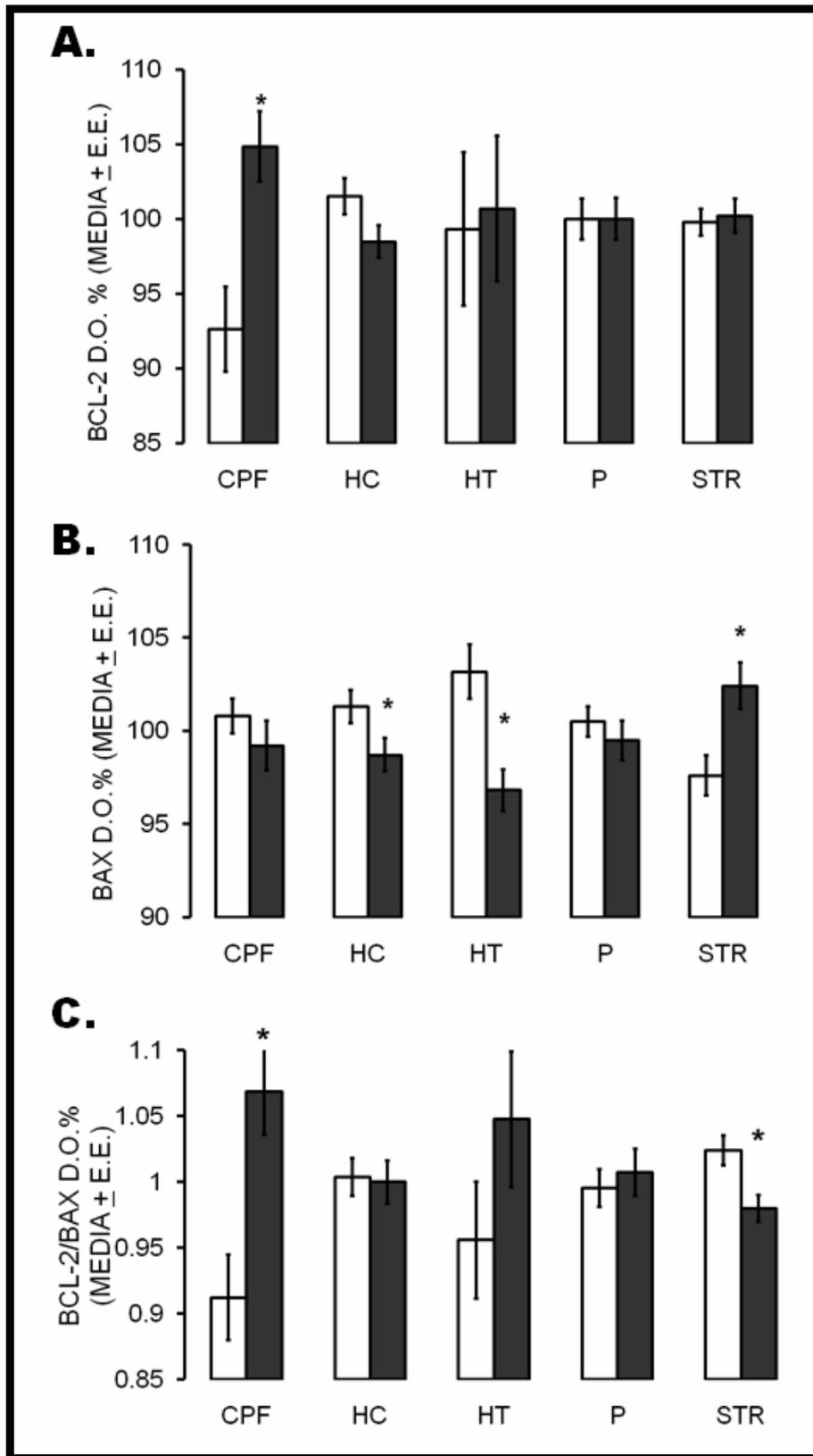


Figura 7. Niveles de Bcl-2 (A), Bax (B) e índice de viabilidad celular evaluado por Bcl-2/Bax (C) en el cerebro de la rata adulta, durante la fase de luz (barras blancas) y durante la fase de oscuridad (barras negras). CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; HT, hipotálamo; P, puente cerebral; STR, estriado. \* indica diferencias estadísticamente significativas entre las fases,  $P \leq 0.05$ . Bax fue más reactivo a la luz-oscuridad que Bcl-2, ya que cambia en el HC, HT y el STR. El índice de sobrevivencia celular aumenta en la CPF en la oscuridad mientras que disminuye en el STR.

Los niveles de Bcl-2 son mayores en la corteza prefrontal durante la fase luz en un 12% con respecto a la fase de oscuridad (Fig. 7A). Durante la fase de oscuridad Bax presenta una ligera disminución en el hipocampo y en el hipotálamo (3 y 7% respectivamente); mientras que en el estriado se observa un aumento del 5% (Fig. 7B).

El índice de sobrevivencia es mayor (15%) en la corteza prefrontal durante la fase de oscuridad y menor en un 5% en el estriado (Fig. 7C). En la Tabla 1 se muestran los valores para “P” y “T”.

### **5.3 Variaciones en los niveles de Bcl-2, Bax y Bcl2/Bax por las manipulaciones de sueño**

**Tesis 3.** *La privación de sueño disminuye la viabilidad celular en el cerebro, al aumentar los niveles de Bax, disminuir los niveles de Bcl-2 y el índice de sobrevivencia celular. Por el contrario, el rebote de sueño facilita la viabilidad celular al aumentar los niveles de Bcl-2, el índice de sobrevivencia y disminuir los niveles de Bax.*

Se evaluaron los niveles de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax en la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, el puente cerebral y el estriado en ratas después de 24 h de privación de sueño total (PS) o después de un periodo de rebote de sueño de 24 h (REB) en ratas que previamente fueron privadas de sueño total por 24 h. Se evaluó también la proteína alfa-tubulina para verificar que la cantidad de proteínas fuera la misma en los carriles del gel. Sin embargo, al observarse que también se modifica con las manipulaciones (Fig.12), no se utilizó como control interno (ver método para detalles del análisis). Además, se evaluó el efecto de la PS y el REB sobre la cantidad total de proteínas, ya que previamente se reportó que la cantidad de proteínas en la formación

reticular medial pueden cambiar en función del ciclo sueño vigilia (Drucker-Colín, et al., 1975).

*Proteína total y  $\alpha$ -tubulina.* Para saber el efecto de las manipulaciones de sueño sobre todas las proteínas presentes en el tejido cerebral se hizo un primer análisis donde promedié las proteínas presentes en las cinco estructuras analizadas. La PS aumenta la cantidad de proteína en todo el cerebro (P= 0.038, T=2444). Este efecto desaparece después de un periodo de recuperación de 24 h (Fig. 8). El análisis por estructura indicó que en la corteza prefrontal el REB disminuye la cantidad de proteína total; en el puente dichas proteínas se incrementan por la PS y durante el REB se reducen; en el estriado la PS también las aumenta, sin embargo, el tiempo de recuperación no fue suficiente para regresarlas a niveles basales (Fig. 9). Los valores de P y F/H están en la Tabla 2.

**TABLA 2. VALORES ESTADÍSTICOS PARA LA PROTEÍNA TOTAL Y  $\alpha$ -TUBULINA EN EL CEREBRO DE LA RATA ADULTA DESPUES DE LAS MANIPULACIONES DE SUEÑO**

		<b>P</b>	<b>F /H</b>	<b>Estadístico usado</b>
Corteza Prefrontal	Proteína total	0.015	4.947	ANOVA
	$\alpha$ - tubulina	0.001	13.094	ANOVA de Rangos
Hipocampo	Proteína total	0.383	0.994	ANOVA
	$\alpha$ - tubulina	0.320	1.172	ANOVA
Hipotálamo	Proteína total	0.179	1.836	ANOVA
	$\alpha$ - tubulina	0.156	1.986	ANOVA
Puente	Proteína total	0.003	11.401	ANOVA de Rangos
	$\alpha$ - tubulina	0.618	0.486	ANOVA
Estriado	Proteína total	0.015	4.933	ANOVA
	$\alpha$ - tubulina	<0. 001	10.090	ANOVA

El método de Student-Newman-Keuls fue aplicado como post-hoc para el ANOVA y el método de Dunn para el ANOVA de Rangos cuando la comparación ente grupos (CC, PS y REB) fue P<0.05. Para detalles ver el Método en el Capítulo 4.

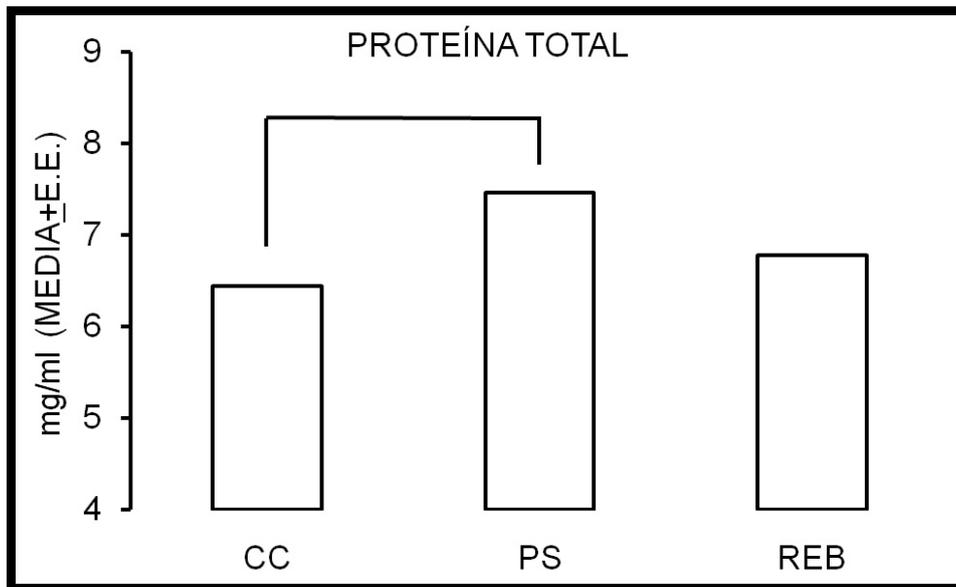


Figura 8. Proteína total de la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, el puente y el estriado de la rata adulta después de las manipulaciones de sueño. CC, control de caja; PS, privación de sueño total por 24 h; REB, rebote de sueño de 24 h. Las líneas indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . Se utilizó la prueba U-Mann como estadístico. La PS incrementa la cantidad total de proteínas, y el REB permite que recuperen. Indicando que la expresión génica puede modificarse por los estados de vigilancia.

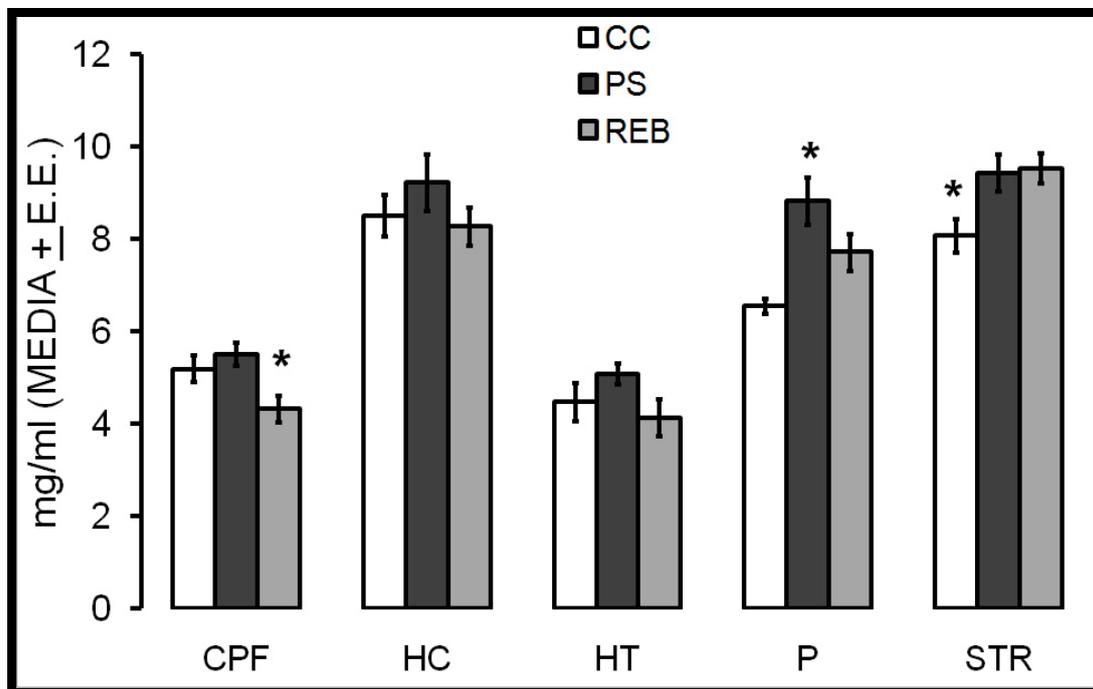


Figura 9. Proteína total en el cerebro de la rata adulta en un grupo control de caja (CC), después de 24 h de privación de sueño total (PS) y después de un período de rebote de sueño por 24 h (REB). CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; HT, hipotálamo; P, puente cerebral; STR, estriado. \* indica diferencias estadísticamente significativas por las manipulaciones de sueño,  $P \leq 0.05$ . Todos los animales fueron sacrificados a las 9:00 h. Obsérvese que el aumento en la proteína total (Fig. 8) está dada por el puente cerebral y el estriado.

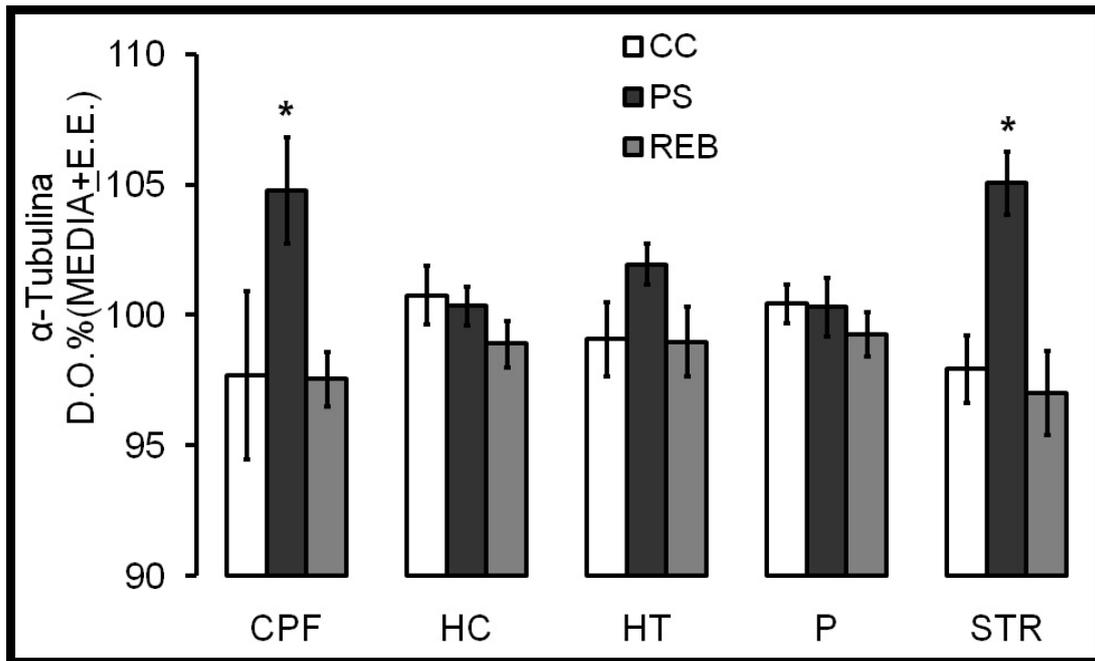


Figura 10. Niveles de  $\alpha$ -tubulina en el cerebro de la rata adulta en un grupo control de caja (CC), después de 24 h de privación de sueño total (PS) y después de un período de rebote de sueño por 24 h (REB). CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; HT, hipotálamo; P, puente cerebral; STR, estriado. \* indica diferencias estadísticamente significativas,  $P \leq 0.05$ . Todos los animales fueron sacrificados a las 9:00 h. La  $\alpha$ -tubulina aumentó por la PS en la CPF y el STR, después del REB regresó a niveles normales. Es probable que esta proteína contribuya al aumento de proteína total provocado por la PS (Fig. 8).

A pesar del efecto de las manipulaciones de sueño sobre las proteínas presentes en el cerebro, los niveles de cada proteína pueden modificarse de diferente manera. En  $\alpha$ -tubulina, se observó que sus niveles incrementaron por la PS en la corteza prefrontal y en el estriado de la rata y, el período de REB permitió que regresara a sus niveles basales (Fig. 10). Los niveles de  $\alpha$ -tubulina no se modificaron por las manipulaciones de sueño en el hipocampo, el hipotálamo y el puente cerebral (Fig. 10). Ver Tabla 2 para los valores de P y F/H.

*Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax.* Las manipulaciones de sueño afectaron diferencialmente los niveles de Bcl-2 y Bax en las cinco estructuras analizadas. En la Tabla 3 se detallan los valores P y F/H, así como el estadístico usado.

En la corteza prefrontal Bcl-2 y Bax aumentaron por la PS (3 y 8% respectivamente), el tiempo de REB no fue suficiente para regresar a los niveles del CC (Fig. 11 y 12). Dado que el aumento de Bax fue mucho mayor que el de Bcl-2, el índice de sobrevivencia se redujo en un 7% por la PS y no se recuperó durante el REB (Fig. 13). El aumento de Bcl-2 por la PS en esta estructura fue confirmado por la evaluación de Bcl-2 mediante inmunohistoquímica (Ver anexo, Fig.1).

En el hipocampo, el índice de Bcl-2/Bax aumento marginalmente (3%) por la PS (Fig. 13), a pesar de que ni Bcl-2 ni Bax cambiaron significativamente sí se observó una tendencia a aumentar Bcl-2 y disminuir Bax (Fig. 11 y 12). Sin embargo, el REB aumentó los niveles de Bcl-2, disminuyó los de Bax y aumentó el índice de Bcl-2/Bax (Fig. 10-12).

En el hipotálamo solo se observó un ligero aumento de Bax (3%) durante el REB (Fig. 11).

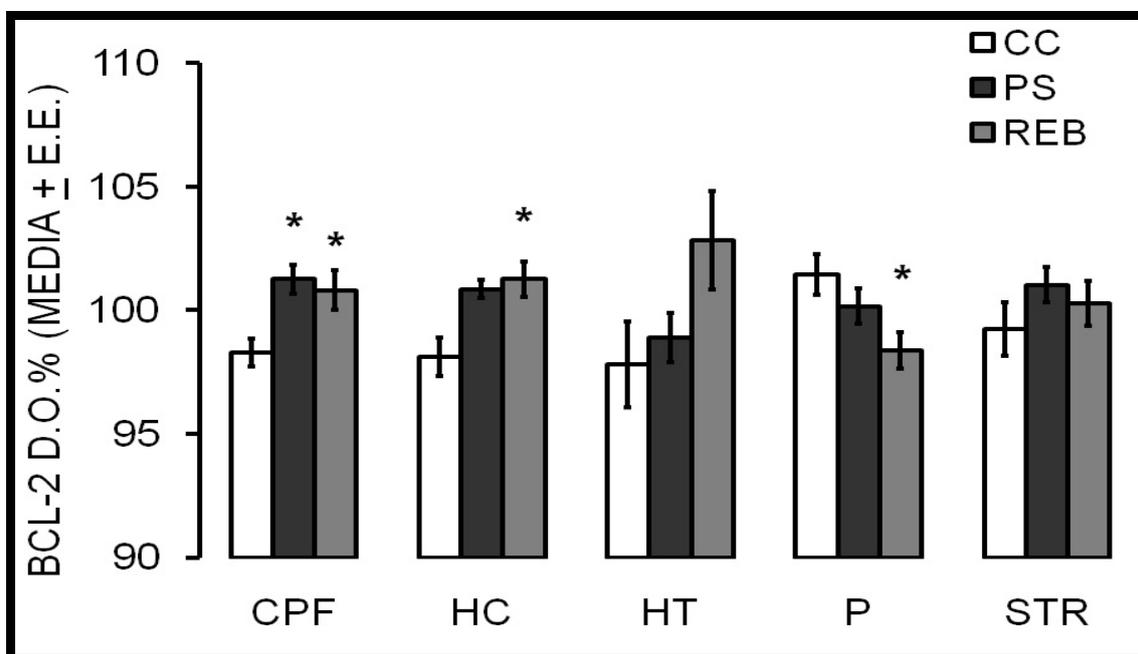


Figura 11. Niveles de Bcl-2 en el cerebro de la rata adulta en el grupo control de caja (CC), el grupo de privación de sueño total por 24 h de (PS) y el grupo de rebote de sueño por 24 h (REB). CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; HT, hipotálamo; P, puente cerebral; STR, estriado. \* indica diferencias estadísticamente significativas contra el CC;  $P \leq 0.05$ . Todos los animales fueron sacrificados a las 9:00. La CPF fue altamente reactiva a las manipulaciones de sueño, Bcl-2 aumentó por la PS y el período de REB no fue suficiente para disminuir sus niveles. El HC se beneficia del sueño ya que el REB aumentó los niveles de Bcl-2.

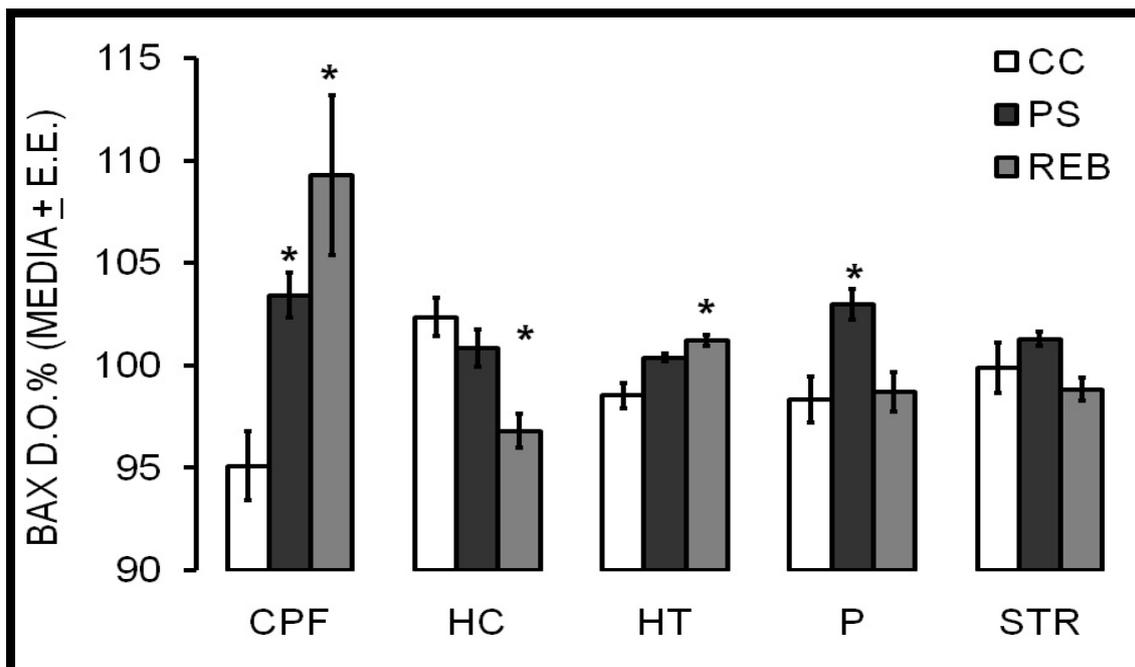


Figura 12. Niveles de Bax en el cerebro de la rata adulta en el grupo control de caja (CC), el grupo de privación de sueño total por 24 h de (PS) y el grupo de rebote de sueño por 24 h (REB). CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; HT, hipotálamo; P, puente cerebral; STR, estriado. \* indica diferencias estadísticamente significativas contra el CC, \*\* contra las otras dos manipulaciones de sueño;  $P < 0.05$ . Todos los animales fueron sacrificados a las 9:00. Al parecer la CPF, el HC y el P se benefician del sueño; ya que la PS aumenta los niveles de Bax en la CPF y el P, mientras que en el HC se reducen después del periodo de REB.

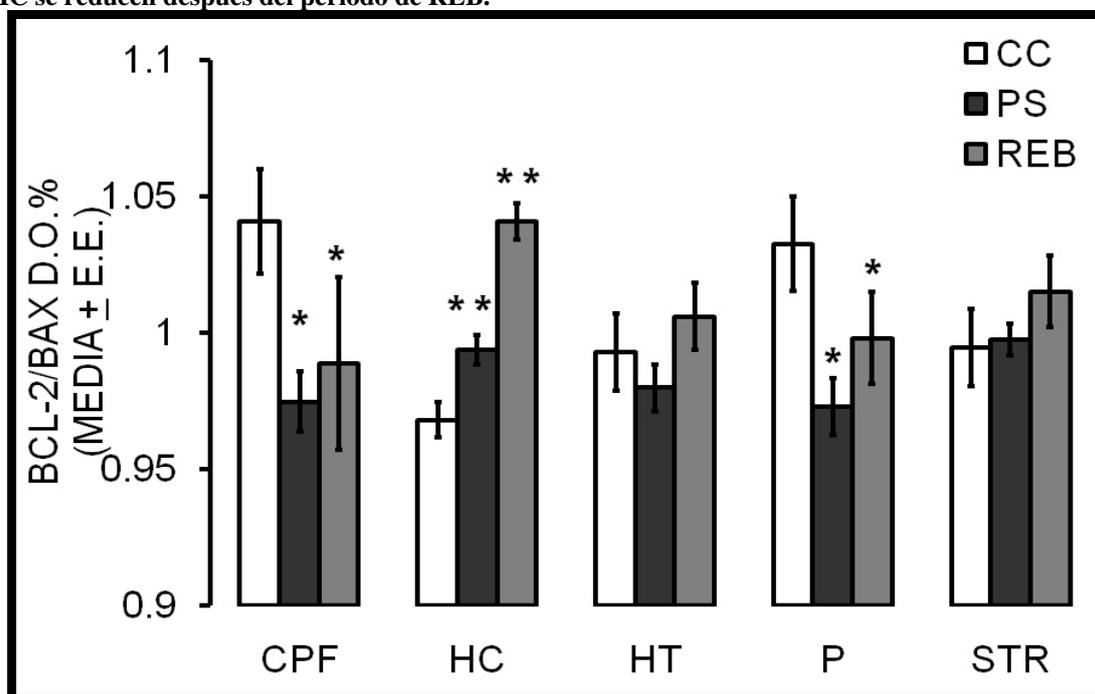


Figura 13. Índice de viabilidad celular en el cerebro de la rata adulta en el grupo control de caja (CC), el grupo de privación de sueño total por 24 h de (PS) y el grupo de rebote de sueño por 24 h (REB). CPF, corteza prefrontal; HC, hipocampo; HT, hipotálamo; P, puente cerebral; STR, estriado. \* indica diferencias estadísticamente significativas contra el CC; \*\* indica diferencia con los otros dos grupos;  $P < 0.05$ . Todos los animales fueron sacrificados a las 9:00. Obsérvese que la PS disminuyó la viabilidad celular en la CPF y en el P; el sueño facilitó el índice de sobrevivencia celular en el HC.

**TABLA 3. VALORES ESTADÍSTICOS PARA BCL-2, BAX Y BCL-2/BAX EN EL CEREBRO DE LA RATA ADULTA DESPUES DE LAS MANIPULACIONES DE SUEÑO**

		P	F /H	Estadístico usado
Corteza Prefrontal	BCL-2	0.003	6.871	ANOVA
	BAX	0.001	16.497	ANOVA de Rangos
	BCL-2/BAX	0.004	6.742	ANOVA
Hipocampo	BCL-2	0.019	7.889	ANOVA de Rangos
	BAX	0.001	10.694	ANOVA
	BCL-2/BAX	<0.001	36.128	ANOVA
Hipotálamo	BCL-2	0.083	2.776	ANOVA
	BAX	0.001	13.678	ANOVA de Rangos
	BCL-2/BAX	0.511	0.692	ANOVA
Puente	BCL-2	0.028	4.155	ANOVA
	BAX	0.003	7.275	ANOVA
	BCL-2/BAX	0.005	6.658	ANOVA
Estriado	BCL-2	0.401	0.950	ANOVA
	BAX	0.115	2.375	ANOVA
	BCL-2/BAX	0.431	0.872	ANOVA

El método de Student-Newman-Keuls fue aplicado como post-hoc para el ANOVA y el método de Dunn para el ANOVA de Rangos cuando la comparación ente grupos (CC, PS y REB) fue P<0.05. Para detalles ver el Método en el Capítulo 4.

En el puente Bax aumentó por la PS (Fig. 12) y el periodo de REB fue suficiente para regresar a sus niveles basales. Bcl-2 no cambió por la PS pero durante el REB disminuyó (Fig. 11); en consecuencia el índice de Bcl-2/Bax disminuyó durante la PS y el REB en un 6 y 4 % respectivamente (Fig. 13).

Finalmente, en el estriado no se observaron cambios en los niveles de Bcl-2, Bax o en Bcl-2/Bax por las manipulaciones de sueño (Fig. 11-13).

## 5.4 Vulnerabilidad del cerebro

**Tesis 4.** *La administración i.c.v. de un fármaco inductor de muerte celular en la fase de luz o en la fase de oscuridad tiene un efecto diferencial sobre la apoptosis, en la corteza cerebral y el hipocampo de la rata adulta. Promoviendo más muerte durante el período de oscuridad-vigilia que durante el período de luz-sueño. Esto se debe acompañar de un aumento en los niveles de Bax y una reducción en los niveles de Bcl-2.*

Se evaluó la muerte celular por TUNEL y DAPI y la presencia de células inmunoreactivas a Bcl-2 y Bax por inmunohistoquímica en la corteza prefrontal, la corteza parietal, en el área CA3 y en la unión del giro dentado en el hipocampo. La evaluación se hizo 24 h después de administrar PBS o VIHgp120 de forma i.c.v. en la fase de luz (13:00h) o en la fase de oscuridad (1:00 h) para promover apoptosis y evaluar si existen diferencias en la vulnerabilidad celular por el ciclo. En la Tabla 4 se muestran los valores para P y F para cada factor ciclo (luz u oscuridad) y tratamiento (PBS o VIHgp120).

En la corteza prefrontal se observó un efecto por el tratamiento y no por el ciclo luz-oscuridad en la muerte celular, esto es, la VIHgp120 indujo muerte de forma significativa ( $P < 0.05$ ) tanto en la luz como en la oscuridad (Fig. 14).

La cantidad de células inmunoreactivas a Bcl-2 fueron afectadas por el ciclo pero no por el tratamiento, con un aumento de Bcl-2 durante la fase de oscuridad en el grupo control (Fig. 15A). Por el contrario, las células inmunoreactivas a Bax fueron afectadas por el tratamiento pero no por ciclo, observándose un aumento en el número de células inmunoreactivas a Bax en el grupo administrado con VIHgp120 en la luz y en la oscuridad (Fig. 15B). El índice de Bcl2/Bax se vio afectado por el ciclo y por el

tratamiento; se observó un aumento en el índice durante la oscuridad dado por el aumento de Bcl-2 en esta misma fase y se redujo en dicha fase por efecto de la VIHgp120, en la fase de luz solo se observa una tendencia a disminuir (Fig. 15C).

**TABLA 4. VALORES ESTADÍSTICOS PARA TUNEL, DAPI, BCL-2, BAX Y BCL-2/BAX DESPUES DE LA ADMINISTRACIÓN i.c.v. DE PBS O VIHgp120 EN LA FASE DE LUZ O EN LA FASE DE OSCURIDAD**

		CICLO		TX	
		P	F	P	F
Corteza Prefrontal	TUNEL	0.831	0.831	<0.001	20.628
	DAPI	0.229	1.508	<0.001	12.716
	BCL-2	0.004	9.261	0.343	0.921
	BAX	0.228	1.504	<0.001	18.849
	BCL-2/BAX	0.026	5.914	0.033	5.334
Corteza Parietal	TUNEL	0.353	0.886	0.023	5.723
	DAPI	0.284	1.179	<0.001	25.381
	BCL-2	0.358	0.863	0.683	0.170
	BAX	0.180	1.863	<0.001	12.670
	BCL-2/BAX	0.978	0.0007	0.016	6.344
Ca3	TUNEL	0.986	0.0003	<0.001	17.442
	DAPI	0.257	1.311	<0.001	12.634
	BCL-2	0.253	1.349	0.593	0.291
	BAX	0.252	1.364	0.019	6.128
	BCL-2/BAX	0.076	3.396	0.551	0.364
Giro Dentado	TUNEL	0.511	0.440	0.021	5.826
	DAPI	0.260	1.309	0.019	6.037
	BCL-2	0.223	1.364	0.734	0.118
	BAX	0.006	0.285	0.037	5.019
	BCL-2/BAX	0.223	1.564	0.734	0.118

Se realizo un ANOVA de dos vías, los factores fueron el Ciclo (luz y oscuridad) y el Tratamiento (PBS o VIHgp120). Se utilizó el método de Student-Newman-Keuls como análisis post-hoc siempre que la comparación entre factores fuera con un valor de P<0.05; las diferencias entre cada uno de los grupos se muestran en las Fig. 13-20. Para detalles ver el Método en el Capítulo 4.

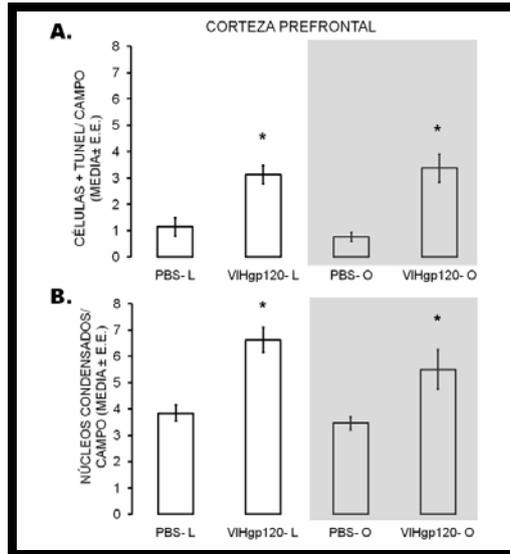


Figura 14 Muerte celular en la corteza prefrontal evaluada por TUNEL (A) y DAPI (B) 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). \* indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . La VIHgp120 tiene un potente efecto neurotóxico sobre la CPF. La apoptosis ocurrió de manera independiente del ciclo L-O, indicando que la vulnerabilidad celular a morir no cambia por el ciclo L-O.

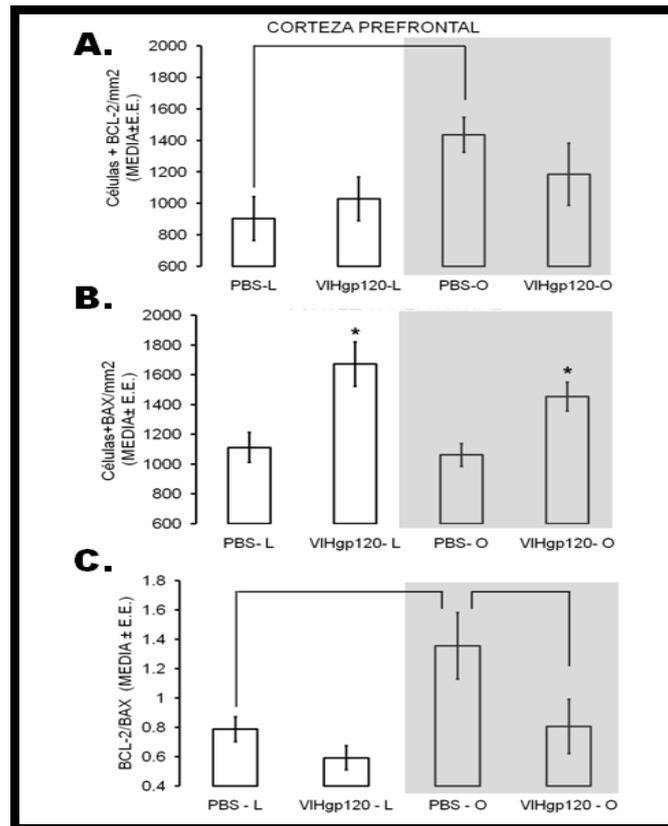


Figura 15. Células inmunoreactivas a Bcl-2 (A), Bax (B) y el índice de Bcl-2/Bax (C) en la corteza prefrontal evaluada 24h después de administrar PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). Las líneas y \* indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . La facilitación de Bcl-2 en esta estructura durante la oscuridad se observó nuevamente en la evaluación por inmunohistoquímica (A). El aumento de Bax por la VIHgp120 sugiere que participa en la inducción de apoptosis. El índice de viabilidad celular disminuye por la VIHgp120.

En la corteza parietal se observó un efecto del tratamiento pero no por el ciclo en la muerte celular evaluada, aumentado en el grupo administrado con VIHgp120 (Fig. 16). El número de células inmuno-positivas a Bcl-2 no fueron afectadas por el tratamiento o por el ciclo (Fig. 17A). Bax fue afectado por el tratamiento pero no por el ciclo; sin embargo, el análisis post-hoc mostró que las células inmuno-positivas a Bax aumentaron significativamente por la VIHgp120 solo en la fase de oscuridad, en la fase de luz se observó una tendencia (Fig. 17B). Esto se reflejó en el índice de Bcl-2/Bax. No hubo un efecto por el ciclo pero si por el tratamiento; disminuyendo significativamente en la fase de oscuridad mientras que en la fase de luz se observó una tendencia a disminuir (17C).

En el área CA3 se observó un efecto sobre la muerte celular por el tratamiento pero no por el ciclo, aumentado las células en proceso de muerte por la administración de VIHgp120 (Fig.18). El número de células inmunoreactivas a Bcl-2 no fue afectado ni por el tratamiento ni por el ciclo (Fig. 19A). El número de células inmunoreactivas a Bax fueron modificadas por el tratamiento pero no por el ciclo. Se observó un aumento significativo solo en la fase de oscuridad y una tendencia a aumentar en la fase de luz en el grupo administrado con VIHgp120 (Fig. 19B).

En el análisis por factores, el índice de Bcl-2/Bax no fue afectado por el tratamiento ni por el ciclo (Tabla 4). Sin embargo, dado que en el ciclo la  $P=0.07$  se hizo un análisis con el estadístico “t” con cada uno de los grupo y se observó que la fase de oscuridad presenta un índice de sobrevivencia mayor que en la fase de luz en el grupo de PBS (Fig. 19C).

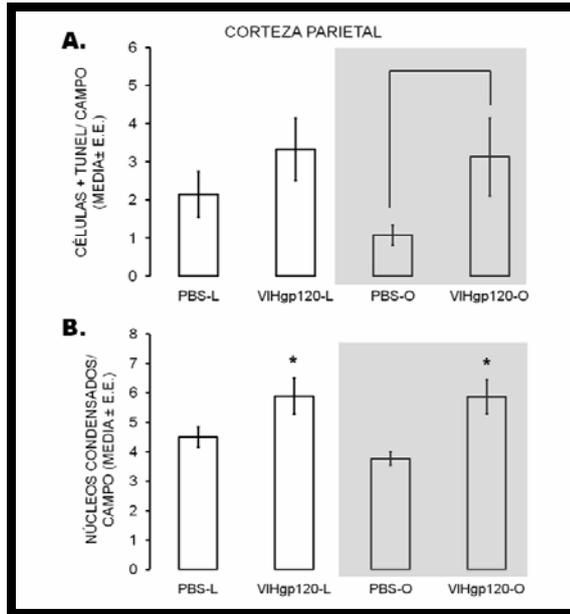


Figura 16. Muerte celular en la corteza parietal evaluada por TUNEL (A) y DAPI (B) 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). \* indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . La apoptosis inducida por la VIHgp120 fue la misma en la L y en la O, indicando que la viabilidad celular es igual a lo largo del ciclo L-O.

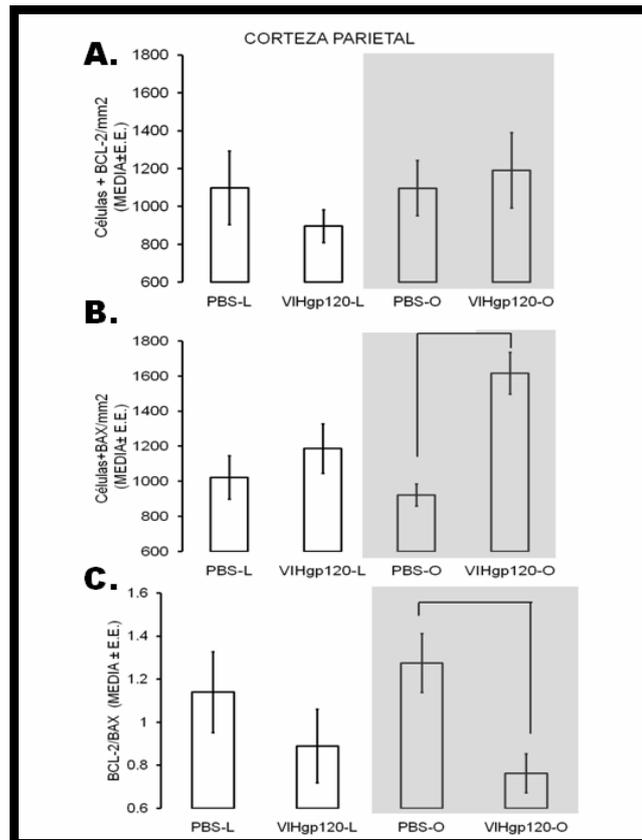
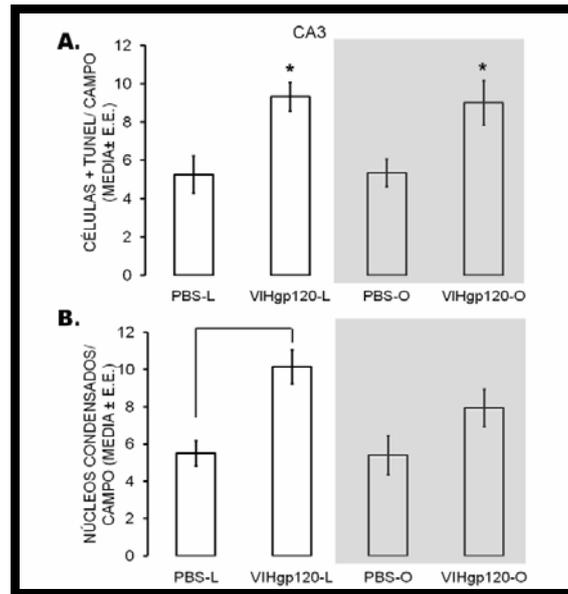
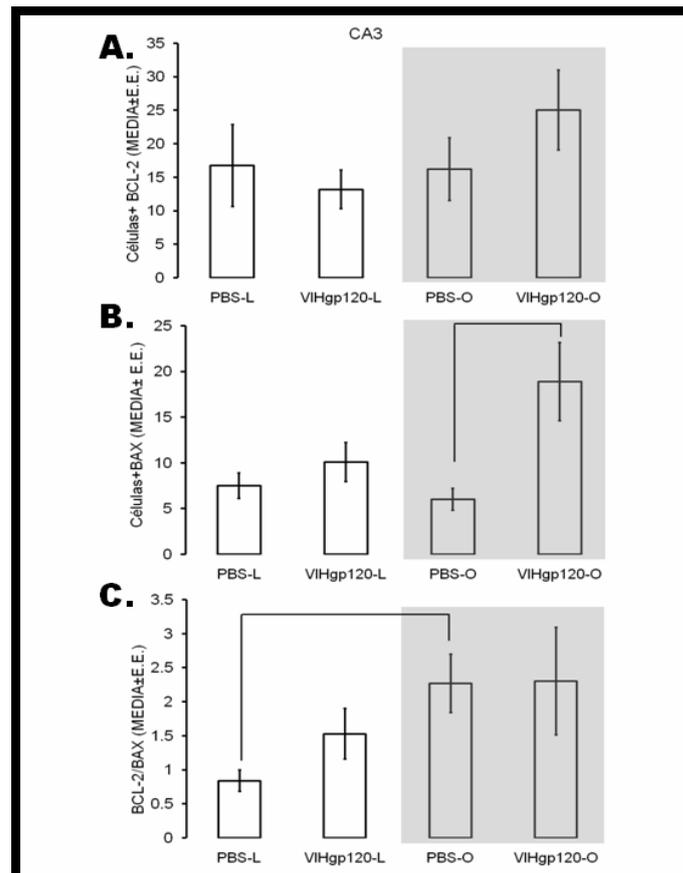


Figura 17. Células inmunoreactivas a Bcl-2 (A), Bax (B) y el índice de Bcl-2/Bax (C) en la corteza parietal evaluada 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). Las líneas indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . La VIHgp120 provocó un aumento de Bax en la oscuridad, por lo que se redujo el índice de viabilidad celular en esta fase. A pesar de estos datos la apoptosis fue la misma en la L y en la O.



**Figura 18.** Muerte celular en CA3 en el hipocampo evaluada por TUNEL (A) y DAPI (B) 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). \* indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . La VIHgp120 indujo apoptosis independientemente del ciclo L-O en esta estructura.



**Figura 19.** Células inmunoreactivas a Bcl-2 (A), Bax (B) y el índice de Bcl-2/Bax (C) en Ca3 en el hipocampo 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). Las líneas indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . Bax aumentó por la VIHgp120 en la fase de oscuridad, sugiriendo que la viabilidad celular se reduce en esta fase. Obsérvese que el índice de viabilidad está facilitado en la oscuridad en los controles.

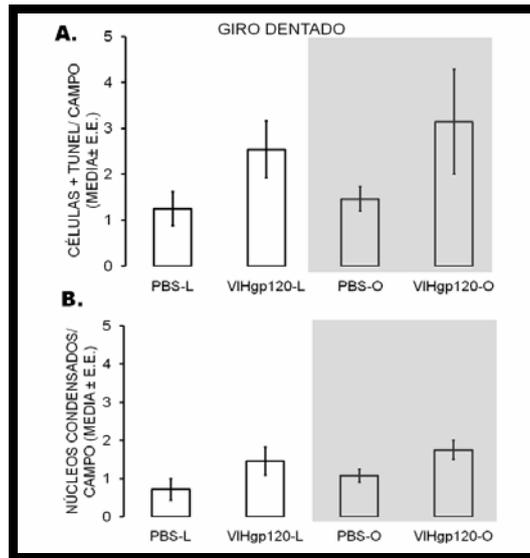


Figura 20. Muerte celular en el Giro Dentado evaluada por TUNEL (A) y DAPI (B) 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). No hubo diferencias estadísticamente significativas en esta estructura, se observa una tendencia de aumentar la muerte celular tras la VIHgp120 en ambas fases del ciclo L-O.

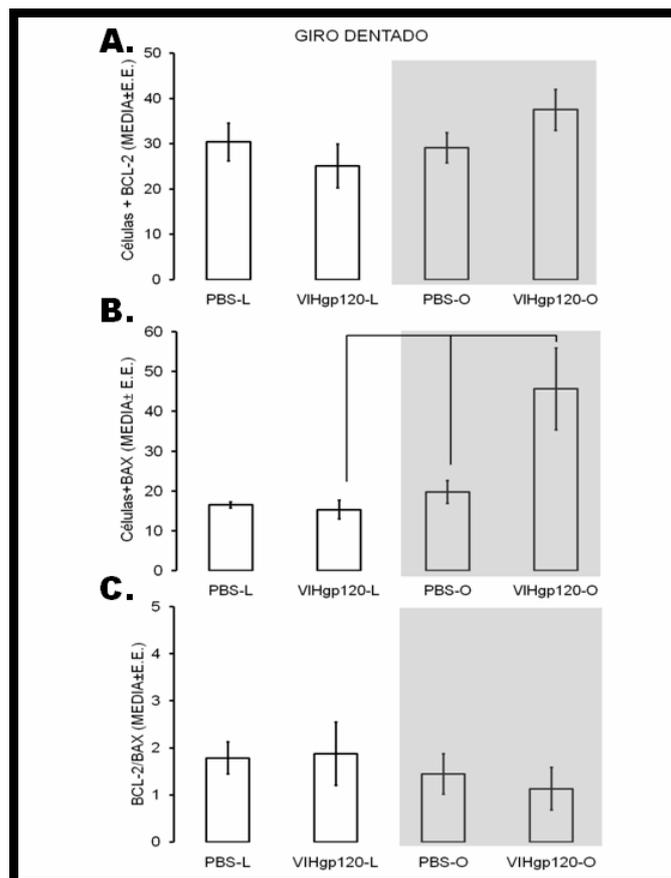


Figura 21. Células inmunoreactivas a Bcl-2 (A), Bax (B) y el índice de Bcl-2/Bax (C) en Ca3 en el hipocampo 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). Las líneas indican diferencias estadísticamente significativas;  $P \leq 0.05$ . La VIHgp120 aumentó las células inmunoreactivas a BAX durante la oscuridad pero esto no se reflejó ni en el índice de viabilidad celular ni en la apoptosis cuantificada.

En el giro dentado el análisis por factores indicó diferencias significativas por tratamiento pero no por ciclo en la muerte celular (Tabla 4). Sin embargo, en el análisis post-hoc las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 20).

Las células inmuno-positivas a Bcl-2 no se modificaron ni por el ciclo, ni por el tratamiento (Fig. 21A). Por el contrario, el número de células inmunoreactivas a Bax se modificó por el ciclo y por el tratamiento, aumentado en la fase de oscuridad en el grupo de VIHgp120 con respecto al grupo con PBS; además el grupo de VIHgp120 de la fase de oscuridad presentó más células inmunoreactivas a Bax con respecto al grupo de VIHgp120 de la fase de luz (Fig. 21B). El índice de Bcl-2/Bax no presentó cambios por el ciclo o por el tratamiento (Fig. 21C).

## CAPITULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

¿Para qué dormir? Es una pregunta abordada científicamente desde finales del siglo XIX en biología, fisiología y psicología, fundándose desde entonces la teoría de que el sueño tiene un papel protector y de restauración sobre el organismo, en especial sobre el cerebro (Capítulo 1 y 2). Durante el siglo XX se generó una gran cantidad de información sobre los centros cerebrales que regulan el sueño y la vigilia, siendo vigente hasta nuestros días la teoría restauradora del sueño. Sin embargo, los mecanismos celulares que subyacen a esta protección no se han investigado en detalle. Aunado a lo anterior, no hay una clara delimitación conceptual de la teoría, en especial sobre el concepto de *función*, que permita integrar la enorme cantidad de datos existentes en una explicación de la función biológica del sueño y los procesos que se supone el sueño facilitaría.

En este contexto, el objetivo fundamental de este trabajo fue evaluar de manera teórica y experimental la validez de la teoría restauradora del sueño. Por ello, antes de discutir los resultados experimentales, debemos considerar tres aportaciones teóricas de esta tesis que permitieron un mejor diseño experimental.

a) Entender el contexto de origen de la teoría de la restauración, para entender por qué tomó tanta fuerza en la fisiología a pesar de los datos experimentales contradictorios.

b) Delimitar los conceptos de *restauración* y *función*, como pasos hacia una teoría general de la restauración como función del sueño.

c) Desarrollar una metodología que nos permitiera evaluar una variable que reflejara el proceso de *restauración*, en forma espontánea y después de diferentes manipulaciones de sueño.

## **6.1 Contexto de origen de la teoría restauradora. ¿Por qué la *teoría restauradora del sueño* tuvo tanto auge?**

La idea del papel restaurador del sueño data de los trabajos de De Manacéine, Daddi y Tarozzi, a finales del siglo XIX, y de Piéron, a principios del siglo XX, quienes mostraron que la privación de sueño por varios días (120 h, 13-17 d y hasta 293 h respectivamente) promueve daño degenerativo en el cerebro de los animales, principalmente en el lóbulo anterior (De Manacéine, 1894; Legendre y Piéron, 1912; Bentioglio y Grassi-Zucconi, 1997).

Tal vez, el argumento más contundente de la teoría restauradora es el hecho de que no dormir provoca la muerte. Una de las conclusiones más influyentes de De Manacéine fue que el sueño es más importante biológicamente que la ingestión de alimento. Esto lo afirmó después de observar que los cachorros bajo privación de sueño mueren irremediamente después de 120 h sin dormir, a pesar de que se les permita dormir libremente después de ese tiempo de privación de sueño; en cambio, los cachorros privados de alimento hasta por 25 días pueden sobrevivir (De Manacéine, 1894; De Manacéine, 1897).

Piéron afirmó que durante el sueño el organismo elimina las toxinas acumuladas durante la vigilia; explicó también que la muerte de los sujetos después de varios días de PS se debía a la acción de las hipnotoxinas (recordemos que son sustancias que se acumulan durante la vigilia y son inductoras de sueño). Esto último lo concluyó al observar que la administración del líquido cefalorraquídeo de perros privados de sueño a perros que habían dormido *ad libitum* provocaba no solo somnolencia, sino también daño celular en la corteza

prefrontal de los perros receptores (revisado en Howell, 1913). La conclusión general de estos trabajos es que la integridad del sistema nervioso se afecta al no dormir.

Los datos contemporáneos que apoyan la teoría restauradora del sueño se desprenden de estudios epidemiológicos que han reportado que dormir lo suficiente (8 h en promedio) se correlaciona con una vida más larga; mientras que, dormir poco (menos de 8 h) se asocia con la presencia de enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y una mortalidad temprana (Akerstedt y Nilsson, 2003; Dew et al., 2003; Mullington et al., 2009).

Si bien estos datos indican que el sueño es indispensable para la vida, no nos permiten explicar los procesos fisiológicos que subyacen al beneficio.

## **6. 2 Delimitación de los conceptos de *restauración y función***

Existe una gran cantidad de hipótesis sobre la función restauradora que el sueño tiene sobre el cerebro (Reimund, 1994; Benington y Heller, 1995; Inoué et al., 1995; Gally y Edelman, 2004; Schulze, 2004), cada una propone mecanismos celulares que generarían la restauración celular (Ver Capítulo 3). Sin embargo, los mecanismos propuestos son tan específicos que parece difícil que la integridad celular dependa de alguno de ellos o incluso de todos ellos. Además, varias de las hipótesis son especulativas, es decir que no pueden concluirse de los datos experimentales, y para que tengan alguna validez es necesario diseñar y realizar experimentos que las corroboren.

La aproximación experimental de la teoría restauradora del sueño tiene limitaciones, por una parte debidas a las alteraciones intrínsecas a los métodos de privación de sueño, como el estrés (Ver Capítulo 2); y por la otra, generadas por la ausencia de una teoría

formal y consensada. Por ejemplo, las hipótesis que existen utilizan los conceptos de restauración, desintoxicación, protección o re-abastecimiento indistintamente.

Para aportar los elementos necesarios de una teoría general de la función restauradora del sueño, hay que considerar la dificultad de que la supuesta protección no podrá explicarse si no se abordan sistemáticamente los múltiples niveles de información del Sistema Nervioso Central. Para ello nos parece indispensable delimitar adecuadamente el significado de dos conceptos básicos en sistemas biológicos: restauración y función.

*Restaurar* es el proceso celular básico necesario para que las neuronas y las conexiones neuronales tengan las condiciones óptimas después de un período de uso y desgaste. Como condiciones óptimas se entiende la disponibilidad de los nutrientes necesarios, el balance del PH, de los iones, de las especies reactivas de oxígeno, etcétera. Estas condiciones tendrían un carácter homeostático con el objetivo final de un buen funcionamiento del cerebro. Por lo tanto, el sustrato específico de la restauración serían las neuronas y sus conexiones (Ver Capítulo 3).

La noción de *función* en sistemas biológicos se refiere a la actividad adaptativa del organismo dirigida al cumplimiento de una meta; de tal forma que se habla de la función de la ingestión de alimento, del movimiento, de la percepción o del sueño en términos de beneficio del organismo. Dentro del sistema nervioso central debemos hablar de *sistemas funcionales*, un sistema funcional está determinado a cumplir una meta biológica específica, para lo cual se apoya en un complejo de actos intervencionales que al final, conducen al efecto biológico correspondiente; dicha constelación dinámica de eslabones pueden cambiar aunque la meta final no se inmute. Debe destacarse que los sistemas

biológicos tienen la capacidad de auto-regularse para el cumplimiento de la función (Luria, 2000).

En el Capítulo 1, discutí sobre los núcleos del tálamo, el hipotálamo y el puente cerebral que forman el sistema ejecutor del sueño y de la vigilia, la acción coordinada de ellos permite el acto de dormir o de estar despierto. En el capítulo 2, describí la existencia del sistema beneficiario del dormir, y, que de acuerdo con los estudios de privación de sueño, forman parte de este la corteza cerebral y el hipocampo. El sistema ejecutor y el sistema beneficiario forman a su vez el sistema funcional del sueño. El sistema funcional está altamente auto-regulado: el sistema ejecutor contiene varios núcleos que promueven vigilia y varios que promueven sueño, si alguno falla, los otros tomarán su trabajo con el objetivo final de promover sueño o vigilia, reflejando la capacidad auto-regulada del sistema. Complementariamente, tanto los mecanismos compensadores que se activan durante la vigilia prolongada, como los mecanismos asociados al rebote de sueño reflejan la competencia auto-reguladora del sistema beneficiario.

### **6. 3 Propuesta metodológica**

La aproximación experimental a las funciones del sueño debe diseñarse tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- Existen efectos intrínsecos a la manipulación experimental (como el estrés), o dicho de otra forma, la PS tiene un componente de estrés inherente a la propia vigilia (espontánea o forzada).
- Al evaluar los efectos de la PS evaluamos los mecanismos compensadores ante la ausencia de sueño, los cuales podrían ser sistemas protectores de la

- En nuestras manipulaciones experimentales al modificar la vigilia se modifica el sueño y viceversa, si no dormimos se altera la forma habitual en que interactuamos con el ambiente durante la vigilia. Lo anterior hace difícil desenmascarar la función del sueño mientras no se estudien sueño y vigilia como partes de un solo sistema funcional.
- Dado los efectos generales del no dormir, solo podemos estar seguros de que la función del sueño se refleja en un funcionamiento óptimo del cerebro durante la vigilia. Así, la función última del sueño puede ser una adecuada interacción del sujeto con su ambiente, y en consecuencia debemos estudiar los mecanismos por los que ello es posible y en qué nivel/es del SNC ocurren.

Es indispensable definir los mecanismos celulares específicos que pueden evaluar la restauración celular, para lo cual es primordial delimitar una variable que indique si una célula tiene o no las condiciones adecuadas para su funcionamiento. La viabilidad celular es el mejor indicador de tales condiciones, ya que el éxito de una célula se reflejará en su sobrevivencia. La sobrevivencia y muerte celular están reguladas por múltiples señales como la cantidad adecuada de nutrientes, de iones y de radicales libres; o por la presencia de estímulos específicos de muerte (rayos UV, virus, bacterias, defectos génicos, estímulos mecánicos etc.).

Por ejemplo, si la actividad de las enzimas antioxidantes disminuye es probable que la célula entre en estrés oxidante y muera; lo mismo ocurre si el balance iónico se pierde o si la célula está activa por mucho tiempo (Ver Capítulo 3).

Si una célula está restaurada significa que está en homeostasis, de tal manera que la muerte celular nos indica si las células eran aptas o no y si tenían las condiciones para responder a los estímulos ambientales; es decir, es más probable la sobrevivencia de una célula mejor adaptada que la de aquella que no tiene las condiciones idóneas. En términos de sistemas neuronales mejor adaptada significa mayores conexiones funcionales con otras neuronas (Edelman, 2003). Como discutí en el Capítulo 3, la muerte y sobrevivencia celular son procesos altamente regulados, estudiar alguno de sus mecanismos de regulación nos indicaría que probabilidades tienen la célula de morir o no.

En este trabajo evalué la viabilidad celular cuantificando las células en proceso de muerte en diferentes estructuras del cerebro de la rata y cuantificando las proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) y Bax (pro-apoptótica); así como el índice Bcl-2/Bax; tanto en condiciones espontáneas como bajo condiciones forzadas.

Como sabemos, gran parte de los estudios sobre la función del sueño se diseñan con manipulaciones de PS, aportando datos sobre los mecanismos que el organismo activa cuando no duerme. Para distinguir estos mecanismos fisiológicos del organismo bajo condiciones forzadas de los mecanismos basales es de suma importancia estudiar nuestras variables en ambas condiciones, el objetivo es discernir los mecanismos que se activan por no dormir de los que se producen por dormir. Finalmente, las condiciones forzadas son las que llevan a los mecanismos al límite de su acción.

El diseño experimental de este trabajo incluye un análisis de la muerte celular y de los mecanismos reguladores mediado por la familia de proteínas Bcl-2: a) en condiciones espontáneas, a lo largo del ciclo luz oscuridad; asumiendo que la mayor cantidad de sueño corresponde a la fase de luz y cuando hay más presencia de vigilia es en la fase de oscuridad; y b) en condiciones forzadas, después de manipulaciones de sueño (PS y REB) y después de administrar un fármaco inductor de muerte celular en la fase de luz y en la fase de oscuridad.

En el siguiente apartado discutiré los datos obtenidos en el diseño experimental arriba planteado. La hipótesis central de este trabajo es: la viabilidad celular en el cerebro de la rata adulta esta facilitada durante el sueño en comparación con la vigilia. El objetivo fue evaluar sistemáticamente la función restauradora del sueño en el cerebro.

#### **6. 4 Muerte celular espontanea en el cerebro adulto**

Se analizaron 180 cortes de ratas intactas (nueve estructuras x lado x diez sujetos) en cuatro puntos del ciclo luz-oscuridad. De las ochos neuronas cuantificadas dos se encontraron en la unión del giro dentado, dos en el hipotálamo lateral, dos en el núcleo pedúnculo pontino tegmental, una en la corteza parietal y una en el locus coeruleus. No se observó distribución circadiana en el número basal de neuronas en proceso de muerte en el adulto, tampoco hubo alguna estructura cerebral particular más vulnerable que las demás para que sus neuronas se mueran. Estos datos sustentan la presencia de muerte neuronal en el cerebro adulto y muestran que su ocurrencia es escasa.

La apoptosis basal de las neuronas del adulto es casi ausente, en 10 sujetos se observaron 8 neuronas bajo apoptosis, en una equivalencia gruesa podemos suponer que se muere 1 neurona por cada sujeto en un lapso de 24 h. ¡Afortunadamente tenemos millones!

No fue posible asociar el periodo de luz-sueño con una muerte neuronal reducida. Al parecer, la muerte neuronal ocurrirá cuando la célula no pueda controlar las diversas señales bioquímicas que inducen muerte celular y el programa de apoptosis se active independientemente si el cerebro duerme (fase de luz) o está despierto (fase de oscuridad).

Es importante considerar que la viabilidad celular es modulada por el tipo y calidad de las conexiones neuronales del propio individuo; así como la presencia de diversos estímulos de muerte que el individuo enfrenta en su interacción con el ambiente. También debemos tener en cuenta la presencia de neurogénesis en el adulto.

## **6.5 Variaciones espontáneas y forzadas de Bcl-2, Bax y Bcl-2/Bax**

Tanto el Bcl-2 como el Bax, presentaron variaciones diurnas en el cerebro de la rata de forma estructura específica (Capítulo 5, Fig.2-5).

El Bcl-2 presentó variaciones diurnas en la corteza prefrontal, con los mayores niveles en el período de oscuridad que corresponde a la vigilia (Fig. 2). El aumento del Bcl-2 en la vigilia se observó también por inmunohistoquímica en el grupo administrado con PBS en los experimentos sobre Vulnerabilidad Celular (Fig. 15). Estos datos están de acuerdo con las variaciones diurnas del mensajero de BDNF en la corteza prefrontal de ratas, con un pico máximo en la oscuridad (Bova *et al.*, 1998); ya que el BDNF promueve la síntesis del Bcl-2 (Riccio *et al.*, 1999). Por el contrario, Bax no presentó variaciones diurnas; razón por la cual el índice de sobrevivencia fue mayor en la oscuridad (Fig. 2 y 7).

Los niveles del Bcl-2 aumentaron de manera significativa por la PS sobre su aumento espontáneo en la corteza prefrontal (los animales fueron sacrificados en el punto de las 9:00 h). Este incremento pudo ser provocado por el aumento del BDNF y el NGF observado en la corteza cerebral de ratas después de 8 y 6 h de PS (Cirelli et al., 2000; Brandt et al., 2000); ya que el NGF también promueve la síntesis de Bcl-2 (Liu, et al., 1999). El aumento de Bcl-2 en la corteza prefrontal por la PS fue corroborado por la detección mediante inmunohistoquímica. Se observó que es necesario un periodo mayor a 5 h de PS para observar el aumento de Bcl-2 (Ver Anexo).

Estos resultados indican que los sistema de protección celular están regulados a la alza en la corteza prefrontal durante el periodo de oscuridad-vigilia, al parecer por efecto de la vigilia y no de la oscuridad pues cuando la vigilia se prologa de manera aguda (hasta 24 h) estas moléculas aumentan su expresión, a pesar de que el ciclo de luz-oscuridad cambie. El grupo de Cirelli y Tononi también ha sugerido que en la corteza cerebral la vigilia (espontánea o prolongada) promueve moléculas que facilitan restauración celular y plasticidad sináptica como el BDNF (Cirelli y Tononi, 2000; Cirelli, 2006; Huber et al., 2006).

El hecho de que los niveles de moléculas tróficas están facilitados en la vigilia y no en el sueño en la corteza prefrontal es contrario a la hipótesis de la restauración celular durante el sueño. En esta estructura es la vigilia y no el sueño quien promueve la expresión de moléculas que participan en la sobrevivencia celular. La interpretación de estos datos adquiere lógica si pensamos que es durante la vigilia cuando los sistemas cerebrales de alerta y de defensa, de percepción o de anticipación, están trabajando al máximo; ya que el sujeto esta interactuando activamente con su contexto. La gran entrada de información del medio externo y las altas velocidades que se demanda al sistema por el complejo

procesamiento de información podría llevar a las células a un estado de hiper-excitabilidad y morir. En este contexto, la presencia de moléculas promotoras de sobrevivencia celular durante la vigilia adquiere un alto valor adaptativo. Estos datos indican que la vía del Bcl-2 es un mecanismo posible para evitar que la corteza cerebral presente estrés oxidante o muerte celular por la privación de sueño total (Cirelli et al., 1999, Hipólido et al., 2002, Montes-Rodríguez et al., 2004). Sin embargo, la reducción del índice de sobrevivencia celular por el aumento de Bax indica que esta proteína es altamente reactiva a la PS, promoviendo que la viabilidad celular disminuya; aunque como mencioné arriba, otros mecanismos positivos a la sobrevivencia celular pueden contrarrestar su efecto negativo sobre la viabilidad celular.

La disminución de la viabilidad celular en la CPF por la PS no se recuperó con el período de rebote (Fig. 2), sustentando la gran sensibilidad de esta estructura a los efectos de la PS, tal como otros autores han mostrado (Thomas et al., 2000; Chee and Choo, 2004; Mu et al., 2005; Wu et al., 2006; Yoo et al., 2007).

En el hipocampo, no se observaron variaciones diurnas de Bcl-2, Bax o el índice de sobrevivencia. Sin embargo, si fueron modificadas por las manipulaciones de sueño (Fig.11-13). Al igual que la corteza prefrontal, el hipocampo es una estructura sumamente afectada por la PS (Ver Capítulo 2). Ramanathan et al. (2002), Silva et al. (2004), Singh et al. (2008) han documentado la presencia de estrés oxidativo en el hipocampo pero no se han encontrado indicadores de apoptosis (Cirelli et al., 1999; Hipólido et al., 2002). El aumento en el índice de sobrevivencia celular observado después de la PS (Fig. 13) sugiere que la vía de las proteínas Bcl-2 puede estar protegiendo a las células hipocámpales de una probable muerte celular.

El aumento de Bcl-2 y la reducción de Bax después del rebote de sueño indica que el sueño facilita la viabilidad celular en el hipocampo, apoyando la noción de que el sueño es importante para la integridad celular del hipocampo y para los procesos cognoscitivos que dependen de él (McDermott y cols. 2003; Ruskin et al., 2004; Guzmán-Marín y cols., 2005; Hairston et al., 2005; Chen y cols., 2006; Yang et al., 2008). Estos datos sustentan el papel del hipocampo como beneficiario del dormir.

En el hipotálamo tanto el Bcl-2 como el Bax presentaron variaciones diurnas (Fig. 3). Como los cambios iban en el mismo sentido, no se observaron cambios en el índice de sobrevivencia celular. Por lo tanto, concluimos que la viabilidad celular en el hipotálamo no presenta variaciones diurnas. Las manipulaciones de sueño solo aumentaron ligeramente los niveles de Bax en el rebote de sueño. Al parecer, el análisis de los niveles de Bax muestra que aumentan por efecto del sueño; ya que los niveles espontáneos de Bax presentan sus valores máximos durante el período de luz-sueño (Fig. 7) y el rebote de sueño promueve un pequeño incremento de Bax (Fig. 12).

Sin embargo, estos resultados deben tomarse con reserva ya que la evaluación se hizo en el hipotálamo completo que como sabemos es una estructura muy heterogénea e incluye diversos núcleos promotores del sueño y de la vigilia (Capítulo 1). Es posible que cada núcleo presente un patrón diferente en los niveles de las proteínas evaluadas y que no veamos cambios claros por las manipulaciones de sueño. En este sentido, es necesario mejorar la técnica de disección y extracción del hipotálamo.

En el puente cerebral, los niveles de Bax cambiaron ligeramente a lo largo del ciclo luz-oscuridad (Fig. 4), que no se reflejaron en el índice de sobrevivencia celular; por lo tanto, creemos que la viabilidad celular no se modifica por el ciclo luz-oscuridad en esta estructura.

Los niveles de Bcl-2 y Bax fueron altamente reactivos a las manipulaciones de sueño (Fig. 11-13). Por ejemplo, el índice de sobrevivencia celular disminuyó durante la privación de sueño y también en el rebote. Estos datos indican que la viabilidad celular en el puente cerebral se compromete por la privación de sueño, y están de acuerdo con los estudios que documentan la ocurrencia de muerte celular en el LC, RD, PPT de ratas privadas de sueño MOR por 6 días (Biswas, 2006). Estos datos indican que el puente cerebral es una estructura que se beneficia del dormir. Este concepto lo ha sugerido previamente Datta (2000), quién muestra que el aprendizaje promueve procesos plásticos en el puente cerebral durante el sueño MOR.

En el estriado los niveles de Bcl-2 y Bax no se modificaron por las manipulaciones de sueño (Fig. 11-13) pero si por el ciclo luz-oscuridad (Fig. 5). La luz reprime la expresión de ambas proteínas presentando sus niveles máximos al final de la oscuridad. El aumento de Bax en la oscuridad provoca que el índice de sobrevivencia celular disminuya en esta misma fase; este patrón es contrario al observado en la corteza prefrontal (Fig. 6 y 7).

En términos generales, los niveles de Bax fueron los más reactivos al ciclo luz-oscuridad, ya que Bcl-2 solo cambio en la corteza prefrontal y dicho cambio está asociado a la vigilia más que a la oscuridad. Ambas proteínas fueron altamente reactivas a las manipulaciones de sueño; modificando sus niveles en la corteza prefrontal, el hipocampo y el puente cerebral, indicando que estas estructuras son beneficiarias del dormir. Los resultados obtenidos indican que cada estructura tiene una expresión particular de las proteínas y no se observó una relación clara entre el periodo de luz-sueño y la protección celular por un incremento en Bcl-2 y el índice de sobrevivencia.

Finalmente, la presencia de Bcl-2 y Bax en el cerebro adulto indica que deben participar cotidianamente en la regulación de la apoptosis al igual que en el cerebro en

desarrollo. De hecho, se ha mostrado que tanto Bcl-2 como Bax regulan importantemente la cantidad de nuevas neuronas en el adulto al inhibir o promover apoptosis. Bax promueve la muerte celular en dichas células, limitando la neurogénesis; mientras que, la sobreexpresión de Bcl-2 en ratones aumenta el número de nuevas neuronas en el hipocampo (Lindsten et al., 2003; Sun et al., 2004; Kuhn et al., 2005).

## **6.6 Proteína total**

Consideré importante conocer las modificaciones en la cantidad total de proteínas por las manipulaciones de sueño, para discernir si los efectos sobre el Bcl-2 y el Bax ocurren por una modificación en la síntesis de proteínas de tipo general o es un cambio específico. Además, se ha mostrado que la cantidad de proteína total en la formación reticular medial presenta variaciones cíclicas, con los niveles más altos durante el sueño MOR (Drucker-Colín et al., 1975). Los resultados mostraron que la cantidad de proteínas en el cerebro se modificaron por las manipulaciones de sueño de manera estructura específica. Se observó que la PS aumenta la cantidad total de proteínas en el puente cerebral y en el estriado; en el puente disminuyen durante el rebote de sueño aunque no alcanza sus niveles normales, mientras que en el estriado no regresan a niveles basales (Fig. 9). En la corteza prefrontal las proteínas disminuyen por el rebote de sueño (Fig. 9).

En conclusión, los cambios en las proteínas por las manipulaciones de sueño son particulares para cada estructura. Por ejemplo la  $\alpha$ - tubulina es una proteína estructural que aumentó con la PS y que regresó a niveles basales por el rebote de sueño en la corteza prefrontal y en el estriado (Fig. 10). El Bcl-2 y el Bax que regulan la sobrevivencia celular también se modifican diferencialmente entre las estructuras como ya hemos discutido

ampliamente. Estos datos indican que la privación y el rebote de sueño son manipulaciones que lleva a la activación de mecanismos alostáticos específicos para cada estructura cerebral. Es probable que esto se deba a que la manipulación afecta a múltiples niveles del organismo, desde el celular hasta el sistémico.

## **6.7 Vulnerabilidad celular**

La corteza cerebral y el hipocampo son las estructuras beneficiarias del dormir con más sustento experimental (Ver Capítulo2 y el apartado anterior), por esta razón se decidió evaluar la apoptosis inducida por la VIHgp120 y los cambios inducidos en Bcl-2 y Bax en la corteza prefrontal y parietal, en el hipocampo en CA3 y el giro dentado. Todo esto en la fase de luz y en la fase de oscuridad para evaluar si la vulnerabilidad celular cambia por efecto del ciclo. Los resultados indican que la VIHgp120 incrementó la muerte celular en todas las estructuras excepto en el giro dentado independientemente del ciclo luz oscuridad, los niveles de Bcl-2 y Bax cambiaron de manera estructura específica (Fig. 15-21).

En la corteza parietal, en CA3 y en el giro dentado se observó un aumento de Bax solo en la fase de oscuridad, reduciendo el índice de viabilidad celular solo en la corteza parietal. En la fase de luz se observó solo una tendencia de ambos efectos. Estos datos sugieren que Bax es más reactivo a aumentar en la fase de oscuridad ante condiciones forzadas; sin embargo, la muerte celular es la misma en ambas fases. El aumento de Bax asociado a la muerte celular en el cerebro adulto se ha observado con otros inductores de muerte neuronal (Korhonen et al., 2003).

Un dato interesante es que el índice de viabilidad celular es mayor en la fase de oscuridad que en la de luz en CA3 (Fig.19), lo que va de acuerdo a la ligera disminución

de Bax en la fase de oscuridad observada en el análisis de todo el hipocampo (Fig. 7). Es probable que este cambio ocurra en CA3 ya que en el grupo control se observó la tendencia de Bax a disminuir en la fase de oscuridad. Esto indicaría que CA3 tiene un tono de protección celular en la vigilia, esto se ha sugerido previamente con el aumento del TrkB en el hipocampo de la rata en la fase de oscuridad (Dolci et al., 2003).

En la corteza prefrontal Bax es parte de los mecanismos de la apoptosis inducida por la VIHgp120; ya que Bax y la muerte celular aumentaron en ambas fases del ciclo. Esta estructura fue la más sensible a la apoptosis inducida por la VIHgp120 (Fig.14-15), confirmando la aptencia de la VIHgp120 por inducir muerte celular principalmente en la corteza frontal (Everall et al. 1991). Además, se observó nuevamente que Bcl-2 aumenta en la fase de oscuridad con respecto a la de luz en los grupos control (Fig. 15).

Estos resultados indican que no hay diferencias en la protección del cerebro durante la fase de luz o de oscuridad ante la muerte celular provocada por la VIHgp120, al menos a las dosis de VIHgp120 que se usaron. Sin embargo, la respuesta del sistema de sobrevivencia celular no es exactamente la misma durante el ciclo luz-oscuridad. En la fase de oscuridad los niveles de Bcl-2 y el índice de viabilidad celular aumentan en la corteza prefrontal; el índice de viabilidad celular aumentó en CA3 en los grupos administrados con PBS. Sugiriendo que la viabilidad celular regulada por Bcl-2 y Bax está facilitada durante la vigilia en la corteza prefrontal y el hipocampo en condiciones espontaneas, esto apoya la discusión y conclusión del apartado anterior. El que esto no se refleje en la muerte celular evaluada en este trabajo no quiere decir que la protección celular no esté facilitada en la vigilia de la rata y que no tenga efecto ante otros estímulos de muerte.

Se demuestra también que Bax participan en la muerte celular inducida por la VIHgp120 tal como se ha sugerido previamente (Krajewski et al., 1997). El aumento de Bax inducido por la VIHgp120 en la fase de oscuridad sugiere que la viabilidad celular ante un estímulo de muerte es mayor en la fase de luz; sin embargo, como ya mencioné, el periodo de luz-sueño o el de oscuridad-vigilia no modifica la vulnerabilidad celular a morir. Las células mueren igual en ambas fases del ciclo luz-oscuridad. No podemos descartar que el aumento de Bax inducido por la VIHgp120 en la oscuridad tenga efectos sobre un aumento de la muerte celular en esta fase del ciclo. Esto podría observarse después de un tiempo más prolongado ya que los datos aquí discutidos se obtuvieron 24 h después de la administración del fármaco. Finalmente, los niveles de Bcl-2 no cambiaron por efecto de la muerte celular inducida por la VIHgp120

## 6.8 Conclusiones

La teoría restauradora del sueño surge a finales del siglo XIX y principio del XX, se sustenta básicamente en los efectos negativos que tiene la privación del sueño sobre el organismo, por ejemplo la muerte inminente ante la privación sostenida y prolongada de sueño. Como hemos argumentado, es necesario establecer una teoría general sobre la función restauradora del sueño que delimite conceptos como *función* y *restauración*; que tome en cuenta las consecuencias que las manipulaciones experimentales tienen sobre los datos obtenidos (principalmente en trabajos sobre PS); que delimite los mecanismos celulares que participan en la *restauración*, así como el nivel/es del Sistema Nervioso Central en que ocurre el beneficio del dormir.

Definimos *restaurar* como el proceso celular básico necesario para que las neuronas y las conexiones neuronales tengan las condiciones óptimas después de un período de uso y desgaste. Se refiere al mantenimiento de la homeostasis. Este concepto permitió delimitar una variable general que evalúa a la restauración celular, la viabilidad celular. El postulado básico indica que las neuronas más aptas sobrevivirán y estarán en homeostasis; esto también nos permite entender que la PS altera dicha homeostasis y promueve un estado de alostasis celular. Los mecanismos compensadores de la PS permiten la protección y adaptación del organismo. Por ejemplo, a pesar de que la PS induce estrés oxidante y pone en riesgo la viabilidad celular, la mayoría de los estudios no reporta un incremento en el número de neuronas bajo apoptosis o necrosis en sujetos privados de sueño por varios días; al parecer, los mecanismos compensadores activados por la PS inhiben la potencial muerte celular.

Estos planteamientos hacen referencia a la noción de *función*, que en sistemas biológicos se refiere a la actividad adaptativa del organismo dirigida al cumplimiento de una meta. En el caso del Sistema Nervioso Central es mejor utilizar el concepto de *sistemas funcionales*, el cual tiene la capacidad de auto-regularse y de intercambiar funciones entre los diferentes componentes para el cumplimiento de la meta. El sistema funcional en el sueño está formado por el sistema ejecutor y el sistema beneficiario del dormir. Al primero lo componen los núcleos promotores del sueño y de la vigilia; al segundo lo componen la corteza cerebral, el hipocampo y el puente cerebral. El fin último del sistema funcional del sueño es en beneficio del funcionamiento óptimo del cerebro; para conocer los beneficios del sistema en el cerebro, se requiere evaluar la relación entre el cerebro dormido y el cerebro despierto. Una de las ventajas de abordar el sueño como un sistema funcional, es la delimitación en el diseño experimental de las condiciones que dependen del sueño o de la vigilia, de la luz o la oscuridad, y de los efectos compensadores de la privación de sueño (o vigilia prolongada), así como de su posible interrelación.

La viabilidad celular es un adecuado indicador de la restauración celular, ya que el beneficio del cerebro como fin último debe realizarse en el nivel celular. En este estudio delimité la evaluación de la restauración celular en la cuantificación de la muerte celular, los niveles de Bcl-2, Bax y el índice de sobrevivencia celular (Bcl-2/Bax) en el cerebro de la rata adulta en condiciones espontáneas a lo largo del ciclo luz-oscuridad y en condiciones forzadas.

No se observaron variaciones diurnas en la muerte neuronal espontánea en el cerebro de la rata, de hecho prácticamente no se observaron células en proceso de muerte. Esto sugiere que la viabilidad celular no es dependiente del sueño y que las células deben estar continuamente preparadas contra los posibles estímulos de muerte. De la misma

manera, la facilitación de la viabilidad celular evaluada por Bcl-2 y Bax a lo largo del ciclo no se asoció de forma evidente al periodo de luz-sueño; cada estructura presentó una expresión particular.

En la corteza prefrontal la viabilidad celular esta facilitada durante la vigilia, mientras que en el hipocampo esta facilitada durante el sueño. El puente cerebral y la corteza prefrontal fueron las estructuras más afectadas por la privación de sueño. En el estriado los niveles de Bcl-2 y Bax son modificados por el ciclo luz-oscuridad pero no por el ciclo sueño vigilia.

Los experimentos sobre vulnerabilidad celular indicaron que la apoptosis inducida por la VIHgp120 en la corteza cerebral y el hipocampo es independiente del ciclo luz oscuridad. Sin embargo, la VIHgp120 incrementó los niveles de Bax en la fase de oscuridad, sugiriendo que la viabilidad celular ante este estímulo de muerte disminuye en la fase de oscuridad. Para saber si este cambio en la viabilidad celular tiene algún efecto ante otros estímulos de muerte es necesario realizar nuevos experimentos.

Finalmente, los resultados de los experimentos realizados en este trabajo no sustentan que la viabilidad celular en el cerebro de la rata adulta este facilitada durante el sueño. Los mecanismos de restauración celular se expresan de forma particular para cada estructura cerebral y no se presentan por el simple establecimiento del sueño.

En conclusión, la función del sueño no es la sobrevivencia de las células del cerebro. Si una célula recibe un estímulo de muerte va a protegerse o a suicidarse independientemente del período luz-sueño u oscuridad- vigilia; es difícil pensar que esperará horas para restaurarse. Los sistemas biológicos deben responder inmediatamente,

es parte de los mecanismos de supervivencia. Al definir *restauración* como la homeóstasis celular se debe entender que el rango temporal para mantener el balance homeostático es muy pequeño. Si se priva de sueño se puede alterar la homeóstasis y el organismo entra en alóstasis. La restauración ocurre en cada momento y no espera la instalación del sueño.

En última instancia, nuestros experimentos y el enfoque metodológico apuntan a que los mecanismos de restauración en cada estructura cerebral deben estar mediados por el tipo de conexiones y el tipo de información que es dependiente de la experiencia; dejando de manifiesto la gran capacidad plástica del sistema nervioso central.

## 6.9 Referencias

- Akerstedt T, Nilsson PM (2003) Sleep as restitution: an introduction *J Intern Med* 254: 6-12.
- Benington JH, Heller HC (1995) Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog. Neurobiol* 45: 347-370.
- Bentivoglio M, Grassi-Zucconi G (1997) The pioneering experimental studies on sleep deprivation. *Sleep* 20: 570-6.
- Biswas S, Mishra P, Mallick BN (2006) Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience*: 142:315-31.
- Bova R, Micheli MR, Qualadrucci P, Zucconi GG (1998) BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light-dark cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 57: 321-24.
- Brandt J, Churchill L, Guan Z, Fang J, Chen L, Krueger JM (2001) Sleep deprivation but not a whisker trim increases nerve growth factor within barrel cortical neurons. *Brain Res* 898: 105-12.
- Cirelli C (2006) Cellular consequences of sleep deprivation in the brain. *Sleep Med Rev* 10:307-21.
- Cirelli C, Shaw PJ, Rechtschaffen A, Tononi G (1999) No evidence of brain cell degeneration after long-term sleep deprivation in rats. *Brain Res* 840: 184-193.
- Cirelli C, Tononi G (2000) Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic System. *J Neurosci* 20: 9187-94.
- Datta S (2000) Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat: A mechanism for sleep-dependent plasticity. *J Neurosci* 20:8607-13
- Dew MA, Hoch CC, Buysse DJ, Monk TH, Begley AE, Houck PR, Hall M, Kupfer DJ, Reynolds CF (2003) Healthy older adults' sleep predicts all-cause mortality at 4 to 19 years of follow-up. *Psychosom Med* 65:63-73.
- Dolci C, Montaruli A, Roveda E, Barajon I, Vizzotto L, Zucconi GG, et al. (2003) Circadian variations in expression of the trkB receptor in adult rat hippocampus. *Brain Res* 994: 67– 72.
- Drucker-Colín RR, Spanis CW, Cotman CW, McGaugh JL (1975) Changes in protein levels in perfusates of freely moving cats: relation to behavioral state. *Science* 187:963-5.
- Edelman GM (2003) Naturalizing consciousness: a theoretical framework. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5520-4.

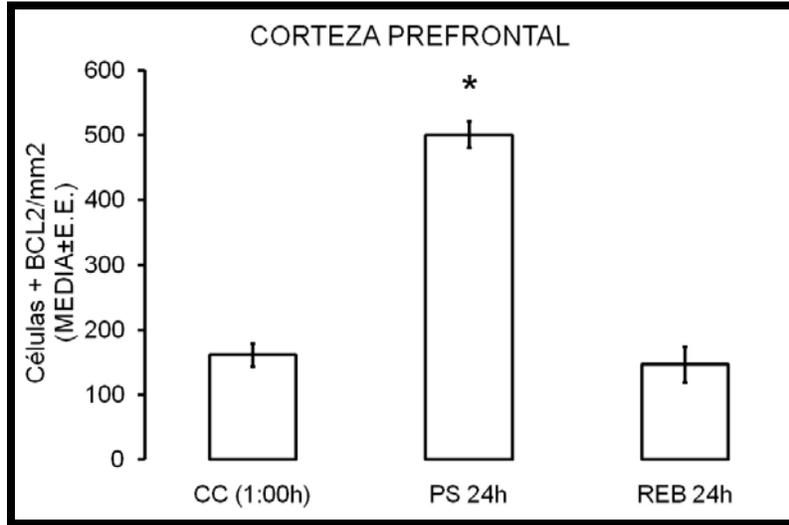
- Overall IP, Luthert PJ, Lantos PL (1991) Neuronal loss in the frontal cortex in HIV infection. *Lancet* 337:1119-21.
- Gally JA, Edelman GM (2004) Neural reapportionment: an hypothesis to account for the function of sleep. *C. R. Biologies* 327: 721-727.
- Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R, McGinty D (2005) Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 22:2111-6.
- Hairston IS, Little MT, Scanlon MD, Barakat MT, Palmer TD, Sapolsky RM, Heller HC (2005) Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. *J Neurophysiol* 94:4224-33.
- Hipólido DC, D'Almeida V, Raymond R, Tufik S, Nobrega J N (2002) Sleep deprivation does not affect indices of necrosis or apoptosis in rat brain. *Int J Neurosci* 112: 155-66.
- Howell WH (1913) *Le problème physiologique du Sommeil* by Henri Piéron. *Science*: 525-26.
- Huber R, Tononi G, Cirelli C (2007) Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis. *Sleep* 30:129-39.
- Inoué S, Honda K, Cómoda Y (1995) Sleep as neuronal detoxification and restitution. *Behav Brain Res* 69: 91- 6.
- Korhonen L, Belluardo N, Mudo G, Lindholm D (2003) Increase in Bcl-2 phosphorylation and reduced levels of BH3-only Bcl-2 family proteins in kainic acid-mediated neuronal death in the rat brain. *Eur J Neurosci* 18:1121-34.
- Krajewski S, James HJ, Ross J, Blumberg BM, Epstein LG, Gendelman HE, Gummuluru S, Dewhurst S, Sharer LR, Reed JC, Gelbard HA (1997) Expression of pro- and anti-apoptosis gene products in brains from paediatric patients with HIV-1 encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 242-53.
- Kuhn HG, Biebl M, Wilhelm D, Li M, Friedlander RM, Winkler J (2005) Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 22:1907-1915.
- Legendre R, Piéron H (1912) De la propriété hypnotoxique des humeurs développée au cours d'une veille prolongée *C.R. Société de Biologie de Paris* 70: 210-2
- Lindsten T, Zong WX, Thompson CB (2005) Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist* 11:10-5
- Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS (1999) Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 27: 2086-90.

- Luria AR (2000) Las funciones corticales superiores del hombre. México: Distribuciones Fontamara, S.A.
- Manacéine M (1897) Sleep: Its physiology, pathology, hygiene and psychology. London: Walter Scott Pub Co Ltd.
- McDermott CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazan NG, Magee JC (2003) Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23: 9687-95.
- Montes-Rodríguez C J, Alavez S, Helder J H, Haro R, Moran J, Prospéro-García O (2004) Prolonged waking reduce human immunodeficiency virus glycoprotein 120- or tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in the cerebral cortex of rats. *Neurosci Lett* 360: 133-6.
- Mu Q, Mishory A, Johnson KA, Nahas Z, Kozel FA, Yamanaka K, Bohning DE, George MS (2005) Decreased brain activation during a working memory task at rested baseline is associated with vulnerability to sleep deprivation. *Sleep* 28:433-46.
- Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK (2009) Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *Prog Cardiovasc Dis* 51:294-302.
- Reimund E(1994) The free radical flux theory of sleep. *Med Hypotheses* 43: 231-3.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286: 2358-61.
- Ruskin DN, Liu C, Dunn KE, Bazan NG, LaHoste GJ (2004) Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. *Eur J Neurosci* 19:3121-4.
- Schulze G (2004) Sleep protects excitatory cortical circuits against oxidative damage. *Med Hypotheses* 63: 203-7.
- Sun W, Winseck A, Vinsant S, Park OH, Kim H, Oppenheim RW (2004) Programmed cell death of adult-generated hippocampal neurons is mediated by the proapoptotic gene Bax. *J Neurosci* 24: 11205-13.
- Thomas M, Sing H, Belenky G, Holcomb H, Mayberg H, Dannals R, Wagner H, Thorne D, Popp K, Rowland L, Welsh A, Balwinski S, Redmond D (2000) Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness. I. Effects of 24 h of sleep deprivation on waking human regional brain activity. *J Sleep Res* 9:335-52.
- Wu JC, Gillin JC, Buchsbaum MS, Chen P, Keator DB, Khosla Wu N, Darnall LA, Fallon

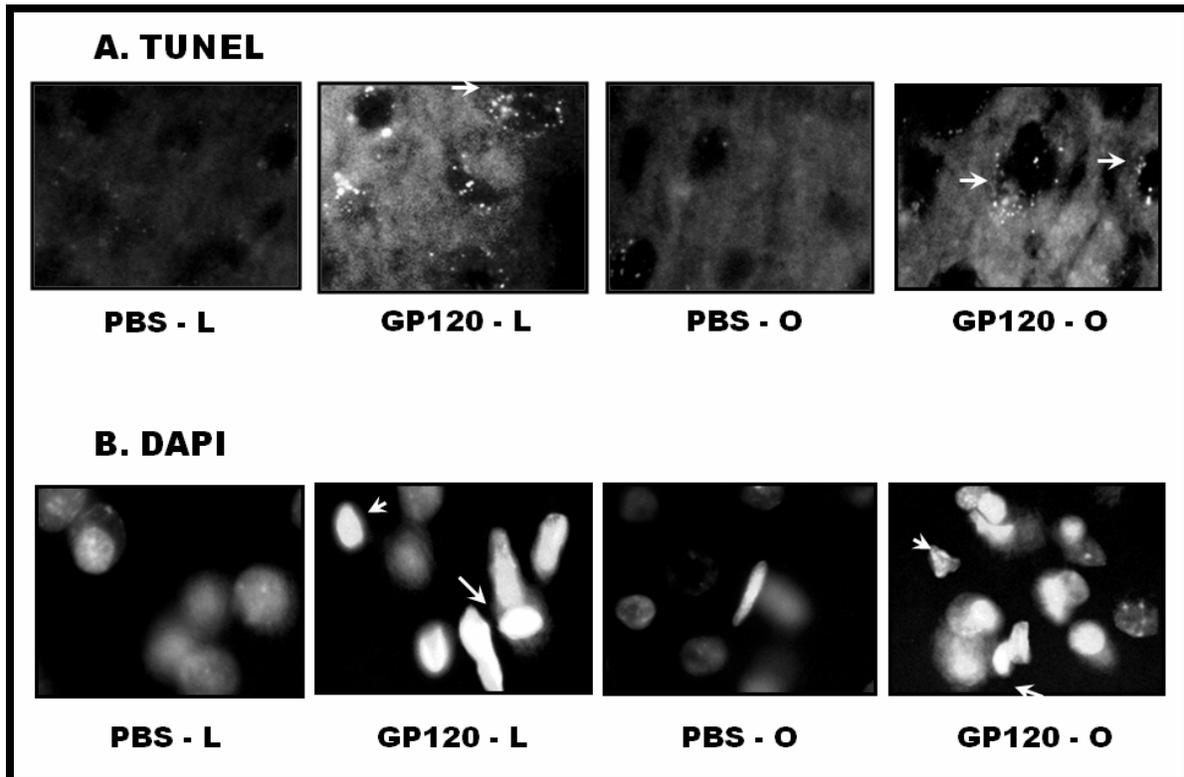
JH, Bunney WE (2006) Frontal lobe metabolic decreases with sleep deprivation not totally reversed by recovery sleep. *Neuropsychopharmacology* 31:2783-92.

- Yang RH, Hu SJ, Wang Y, Zhang WB, Luo WJ, Chen JY (2008) Paradoxical sleep deprivation impairs spatial learning and affects membrane excitability and mitochondrial protein in the hippocampus. *Brain Res* 1230:224-32.
- Yoo SS, Gujar N, Hu P, Jolesz FA, Walker MP (2007) The human emotional brain without sleep--a prefrontal amygdala disconnect. *Curr Biol* 17:R877-8

## ANEXO



**Figura 1.** Número de células inmunoreactivas a Bcl-2 en la corteza prefrontal des la rata adulta después de 24h de privación de sueño total PS. \* indican diferencias estadísticamente significativas. Obsérvese como que la privación de sueño aumenta las células inmunoreactivas a Bcl-2 y 24 h de rebote de sueño son suficientes para regresar a niveles basales.



**Figura 2.** Muerte celular en la corteza prefrontal evaluada por TUNEL (A) y DAPI (B) 24h después de administrar i.c.v. PBS o VIHgp120 (140ng/5µl) en la fase de Luz (L) o en la de Oscuridad (O). Las flechas indican células en proceso de apoptosis, en A se marcan los fragmentos de DNA con la fluoresceína, en B se cuantificaron los núcleos condensados.

# BCL-2 and BAX Proteins Expression Throughout the Light–dark Cycle and Modifications Induced by Sleep Deprivation and Rebound in Adult Rat Brain

Corinne J. Montes-Rodríguez,<sup>1\*</sup> Silvestre Alavez,<sup>2</sup> Edgar Soria-Gómez,<sup>1</sup> Pavel E. Rueda-Orozco,<sup>1</sup> Khalil Guzman,<sup>1</sup> Julio Moñ, <sup>2</sup> and Oscar Prospéro-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

<sup>2</sup>Depto. de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

It has been suggested that sleep has a restorative function; however, experimental support is limited. Hence, we investigated whether changes in the level of antiapoptotic BCL-2 protein and proapoptotic BAX protein occur during sleep deprivation (SD) and sleep rebound, and evaluated the spontaneous changes in these proteins, along the light–dark cycle, in the adult male Wistar rat. Estimations were made in the prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and pons. We observed that BCL-2 exhibited diurnal variations in the prefrontal cortex and striatum, whereas BAX varied in the striatum and showed only small variations in the pons as measured by immunoblotting. The BCL-2/BAX ratio exhibited diurnal variations in the prefrontal cortex and striatum. BCL-2 and BAX levels were affected by 24 hr of total SD and 24 hr of sleep rebound. SD decreased the BCL-2/BAX ratio in the prefrontal cortex and pons. Sleep rebound increased the BCL-2/BAX ratio in the hippocampus. In conclusion, the BCL-2/BAX ratio is high during the dark phase as compared with the light phase in the prefrontal cortex and during the light phase as compared with the dark phase in the striatum. SD decreased the BCL-2/BAX ratio in the prefrontal cortex and pons, whereas sleep rebound increased it in the hippocampus. These changes point out structures in the brain that express these proteins as a response to the light–dark cycle. Similarly, SD and sleep rebound seem to change these proteins expression in some other brain structures, suggesting that cellular vulnerability might be altered by these changes. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** sleep function; cellular vulnerability; BCL-2/BAX; diurnal variations; sleep deprivation

It is well known that sleep is a vital process because its chronic deprivation impairs brain and body function

and may become lethal to organisms (Everson et al., 1989a, 1989b; Kushida et al., 1989). Hence, many researchers have put forth the notion that sleep is a period in which the organism restores, replenishes, or reorganizes its brain (Pierón, 1913; Reimund, 1994; Benington and Heller, 1995; Drucker-Colín, 1995; Inoué et al., 1995; Krueger et al., 1995; Tononi and Cirelli, 2003; Gally and Edelman, 2004; Schulze, 2004). In this context, it seems likely to find some extent of cellular damage and apoptosis in the brain of animals under sleep deprivation (SD). However, most of the SD studies have failed to document a consistent cellular damage or apoptosis in the brain of animals subjected to different periods of SD (D'Almeida et al., 1997; Cirelli et al., 1999; Hipólido et al., 2002; Gopalakrishnan et al., 2004). The apoptotic common end pathway involves molecules such as caspases, mitochondrial factors, and the BCL-2 family of proteins (Hengartner, 2000; Yuan and Yanker, 2000; Benn and Woolf, 2004; Danial and Korsmeyer, 2004). These proteins have been proposed to act as critical determinants in the regulation of cell death and have been divided according to their anti- or proapoptotic actions (Reed, 1994, 2006; Burlacu, 2003; Danial and Korsmeyer, 2004; Sharpe et al., 2004; Cheng et al., 2006; Häcker and Weber, 2007). BCL-2 has been char-

AQ1

Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant number: IN230503 (to O.P.G.). Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant number: IN223107 (to J.M.).

\*Correspondence to: Oscar Prospéro-García, Grupo de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70–250, México, D.F., 04510, México. E-mail: opg@servidor.unam.mx

Received 13 August 2008; Revised 30 October 2008; Accepted 1 November 2008

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21987

## 2 Montes-Rodríguez et al.

acterized as an antiapoptotic protein factor, whereas BAX is considered proapoptotic (Deckwerth et al., 1996; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997; Marzo et al., 1998; Annis et al., 2005). BAX activation is prevented by BCL-2 and apparently the balance between BCL-2 and BAX may determine whether a cell will respond to a proapoptotic factor or not (Brenner et al., 2000; Tan et al., 2004; Chipuk et al., 2006; Dlugosz et al., 2006).

We evaluated BCL-2 and BAX protein levels and their relative proportions, as delineated by a BCL-2/BAX derived ratio, and how this ratio changes spontaneously along the light–dark cycle and as a response to SD and sleep rebound in structures of the adult rat brain.

We hypothesized that if sleep is a period for enhancing cellular viability in the brain, we would find: 1) the highest BCL-2 and the lowest BAX levels, and a high survival index (BCL-2/BAX) during the light phase, which corresponds to the sleep period of rats; 2) an increase in BAX levels, a decrease in BCL-2, and a reduction in the BCL-2/BAX ratio after 24 hr of total SD. The experimental support for these hypotheses would provide valuable information supporting the notion that sleep favors brain cells survival.

### MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (250–350 g) were maintained under constant temperature (23°C), humidity (52%), and a controlled 12:12 light–dark cycle (lights on at 08:00 hr) with food and water ad libitum.

Thirty rats were used to detect diurnal variations in BCL-2 and BAX protein levels in the prefrontal cortex, hippocampus, pons, and striatum by Western blot testing. Twenty-seven additional animals were used to evaluate BCL-2 and BAX levels in the same brain structures after SD or after sleep rebound.

We evaluated the pons because it regulates the occurrence and maintenance of the sleep–waking cycle (Saper et al., 2005). The prefrontal cortex and the hippocampus were chosen because they are highly sensitive to SD (Drummond and Brown, 2001; McDermott et al., 2003) and the striatum was considered a control structure because no consistent data are available in the literature directly involving the striatum in sleep–waking regulation.

Animals were treated in accordance to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* established by the National Institutes of Health and the principles presented in the *Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research* by the Society for Neuroscience. Additionally, our protocol was approved by the Committee of Research and Ethics of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

### Procedure

In order to evaluate putative diurnal variations, rats were decapitated and brains extracted at different times of the light–dark cycle: 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, and 5:00 hr.

Thus, six samples obtained from each of six different rats were analyzed in every single gel, one lane per each time to cover all the samples of a 24-hr period.

For sleep manipulations experiments, we used a control cage group (CC,  $N = 9$ ) that was allowed to sleep freely; a 24-hr period of total SD group (TSD,  $N = 9$ ); and a TSD + 24 hr of sleep rebound group (REB,  $N = 9$ ).

**Tissue sample collection.** After decapitation, brains were removed and washed with saline solution. The entire manipulation of the brain was made on ice. To dissect the pons, we retired the cerebellum and separated the brainstem from the cerebral hemispheres; then, we proceeded to cut at the junction between the midbrain and pons. We performed a last cut at the pontomedullary junction level. To dissect the prefrontal cortex, the hippocampus, and the striatum we cut at the brain's midline to separate the cerebral hemispheres. To obtain the prefrontal cortex, we separated the olfactory bulb and made a vertical cut right in front of the corpus callosum's genu. To obtain the hippocampus, we cut the fimbria–fornix bundle and with the aid of a spatula removed it quite easily. Once the hippocampus was removed, the striatum was readily visualized. We proceeded to separate the head that is also easy to remove. Tissue samples were immediately homogenized and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  (see below for details).

**Sleep manipulations.** SD was achieved by gentle handling and the REB group was allowed to sleep for 24 hr after the 24-hr TSD period.

During the initial 4 to 6 hr of SD, waking was seldom enforced because we initiated the manipulation at the dark phase onset when rats are spontaneously active. We decided to start the SD at the dark phase onset because it resembles the way humans frequently start their SD: after a period of waking. For the following hours, rats were maintained awake by gently touching them, shaking the cages, or by introducing new objects into the cage. We also changed them to different cages to stimulate them with a novel environment. The last resource was to hold them in our hands to gently shake them. The gentle handling was performed by four persons along the 24 hr. A 24-hr period of SD has been frequently used in different SD studies; hence we used it to be able to compare our data with an ample scientific literature on this matter. Also, we used this particular method because it has been proven to be the less stressful method for SD. We know it does not increase corticosterone; one of the main molecules mediating stress response (Fenzl et al., 2007). Finally, CC rats were free to sleep undisturbed in their home cages. They were kept under the same environmental conditions of light, temperature, humidity, food and water access. The animals in the REB group could sleep during 24 hr after SD under environmental conditions similar to those used for CC rats. All animals (CC, TSD, and REB) were killed at 21:00 hr.

### Western Blot Test

To evaluate BCL-2 (26 kDa) and BAX (23 kDa) levels, immunoblotting assays were run separately for each rat.

The prefrontal cortex, hippocampus, pons, and striatum from each rat were dissected, washed, and homogenized in lysis buffer (Tris–NaCl, pH 7.4, 2% IGEPAL, 0.2% sodium

**TABLE I. Statistical Values for Spontaneous Variations of BCL-2, BAX, and BCL-2/BAX Ratio in Adult Rat Brain\***

Site	ANOVA (LSD)		<i>t</i> -test	
	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>
Prefrontal cortex				
BCL-2	0.014	3.331	0.002	-3.313
BAX	0.747	0.536	0.342	0.962
BCL-2/BAX	0.035	2.787	0.002	-3.390
Hippocampus				
BCL-2	0.415	1.035	0.069	1.881
BAX	0.283	1.299	0.043	2.077
BCL-2/BAX	0.883	0.343	0.868	0.168
Pons				
BCL-2	0.723	0.596	0.989	-0.0139
BAX	0.013	3.699	0.618	-0.503
BCL-2/BAX	0.165	1.737	0.618	-0.503
Striatum				
BCL-2	0.021	3.155	0.759	-0.309
BAX	<0.001	6.094	0.006	-2.937
BCL-2/BAX	0.042	2.661	0.006	2.903

\*ANOVA was used for diurnal variation analyses and LSD as post hoc *t*-test to compare the average values of light and dark cycles. For details, see Materials and Methods.

dodecyl sulfate, and protease inhibitors). Homogenates from each rat were centrifuged at 14,000 rpm (4°C) for 10 min and the supernatant collected and frozen. Proteins were quantified by the Bradford method and 60 µg from each tissue homogenate was run in 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then transferred to PVDF membranes (Millipore) for immunoblotting. The blot was incubated with Tris-NaCl and nonfat dry milk (5%) for 30 min at room temperature, followed by incubation with the monoclonal antibodies against BCL-2 or BAX (1:200, Santa Cruz Biotechnology) for 24 hr. Upon completing this period and after washing thoroughly, the blot was incubated for 1 hr with the alkaline-phosphatase conjugate goat anti-mouse secondary antibody (1:30,000, Sigma). The CDP-Star Chemiluminescent method (New England Biolabs) was used for signal detection and the arbitrary density units of bands were calculated by ImageJ 1.38x software (National Institutes of Health). To verify that protein samples were not degraded and that equivalent amounts of protein had been loaded in wells, the blots were restained by Ponceau's solution (Sigma).

**Analyses**

For diurnal variations experiments, we used one sample from a particular brain structure per rat in each well. Each blot shows the levels of BCL-2 or BAX of six different rats at six different times (*N* = 6 per structure). Density units obtained from one blot with six different samples (one sample per hour) were averaged and the resulting mean value used as 100% reference. All the values were rescaled using this 100% as the reference value, as we have previously reported (Martínez-Vargas et al., 2003).

We calculated the ratio of these proteins by dividing the BCL-2 value by the BAX value per rat throughout the light-dark cycle. Additionally; we obtained the mean value of

**TABLE II. Statistical Values of BCL-2, BAX, and BCL-2/BAX Ratio in Adult Rat Brain After Sleep Manipulations\***

Site	<i>P</i>	F/H	Test
Prefrontal cortex			
BCL-2	0.003	6.871	ANOVA
BAX	0.001	16.497	ANOVA on ranks
BCL-2/BAX	0.004	6.742	ANOVA
Hippocampus			
BCL-2	0.019	7.889	ANOVA on ranks
BAX	0.001	10.694	ANOVA
BCL-2/BAX	<0.001	36.128	ANOVA
Pons			
BCL-2	0.028	4.155	ANOVA
BAX	0.003	7.275	ANOVA
BCL-2/BAX	0.005	6.658	ANOVA
Striatum			
BCL-2	0.401	0.950	ANOVA
BAX	0.115	2.375	ANOVA
BCL-2/BAX	0.431	0.872	ANOVA

\*Student-Newman-Keuls method was used as post hoc for ANOVA and Dunn's method for ANOVA on ranks when *P* < 0.05 among CC, TSD, and REB groups. For details, see Materials and Methods.

BCL-2 or BAX during the light (values from 9:00, 13:00, and 17:00 hr) or during the dark phase (values from 21:00, 1:00, and 5:00 hr), and the mean of their ratio.

For sleep manipulations, three samples of the same structure were run, i.e., prefrontal cortex for each group (CC, TSD, and REB) in each blot. The final arrangement was: nine samples per blot (with three samples per group) and three blots per structure (*N* = 9), per antibody (BCL-2 or BAX). As mentioned, we calculated the mean value of density units from nine samples in each blot and it was used as 100% reference. This 100% reference value was compared with the density units obtained from each well and, at the end; we determined a relative value for each sample (Martínez-Vargas et al., 2003). The BCL-2/BAX ratio was calculated on the basis of these values.

**Statistics**

Results are reported as mean + standard error (SE). Significant differences were obtained by one-way analysis of variance (ANOVA), ANOVA on ranks, and *t*-test. We used LSD for ANOVA as a post hoc test in the diurnal variations study and *t*-test for comparing the mean values of the light and dark cycles. Student-Newman-Keuls method for ANOVA and Dunn's method for ANOVA on ranks were used in the sleep manipulations study. We considered *P* ≤ 0.05 as statistically significant. Tables I and II provide information about the statistical tests used in each study condition and for *P* and *F*/*H* values.

**RESULTS**

**Spontaneous Variations of BCL-2 and BAX Levels**

The antiapoptotic protein, BCL-2, exhibited marked diurnal variations in the prefrontal cortex. BCL-

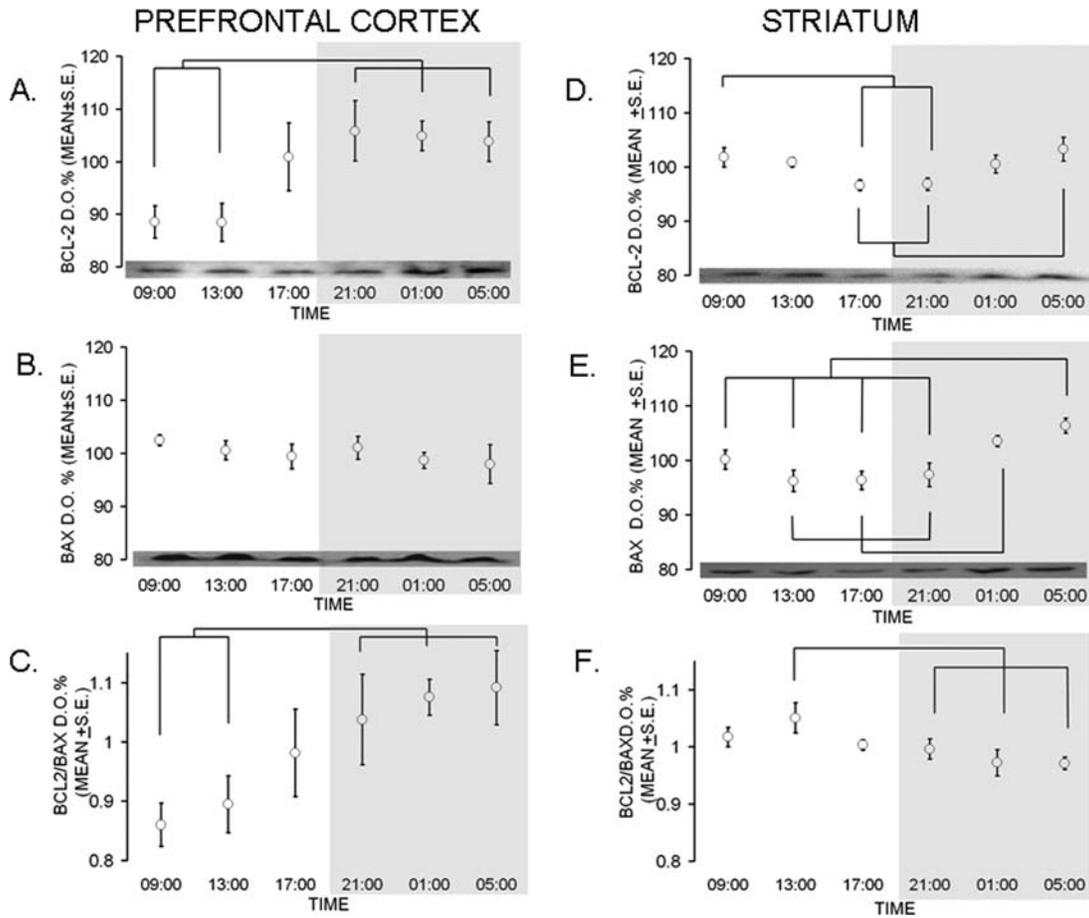


Fig. 1. BCL-2, BAX, and BCL-2/BAX ratio diurnal variations in the prefrontal cortex (A,B,C, respectively) and in the striatum (D-F) of adult rats. Representative Western immunoblots of BCL-2 and BAX are shown in the bottom of the graphs. Data are presented as mean ± SE of densitometry units percentage. For details of the analysis, see Materials and Methods. Lines indicate  $P < 0.05$ .

Author Proof

F1 2 levels showed a 16% increase during the dark phase at 21:00, 1:00, and 5:00 hr with respect to the light phase at 9:00 and 13:00 hr (Fig. 1a). In contrast, proapoptotic protein BAX remained unchanged along the light-dark cycle (Fig. 1b). Moreover, diurnal BCL-2 variations are reflected in the BCL-2/BAX ratio. This ratio was 25% higher at 21:00, 1:00, and 5:00 hr than at 9:00 and 13:00 hr (Fig. 1c).

Both, BCL-2 and BAX, protein levels showed diurnal variations in the striatum (Fig. 1d,e). The lowest levels of BCL-2 were observed in the light-to-dark phase transition at 17:00 and 21:00 hr as compared with the dark-to-light transition at 5:00 and 9:00 hr (7% of change; Fig. 1d). In the same way, BAX exhibited the highest levels at the end of the dark cycle at 1:00 and 5:00 hr and the lowest levels in the light-to-dark transition at 13:00, 17:00, and 21:00 hr (10% of change; Fig. 1e). We observed diurnal variations in BCL-2/BAX ratio, the highest value was observed at 13:00 hr and the lowest at 21:00, 1:00, and 5:00 hr (Fig. 1f).

In the hippocampus, BCL-2, BAX, or BCL-2/BAX ratio did not exhibit diurnal variation (data not shown).

In the pons, the highest levels of BAX were observed at 13:00 hr as compared with those at 21:00 hr. This fluctuation represented an 8% change. However, BCL-2 and BCL-2/BAX ratio did not show diurnal variations (data not shown).

The mean value for BCL-2 during the light or dark cycle was different only in the prefrontal cortex; it was 12.22% higher in the dark than in the light phase (Fig. 2a). In the striatum, the mean value of BAX during the dark was higher than during the light phase by about 5% (Fig. 2b). In addition, the mean value of BAX levels during the dark decreased by 3% with respect to the light phase in the hippocampus (data not shown).

The mean value for BCL-2/BAX ratio differed during the light and dark phases in the prefrontal cortex and striatum. In the prefrontal cortex, it was higher during the dark than during the light phase by about 15%,

F2

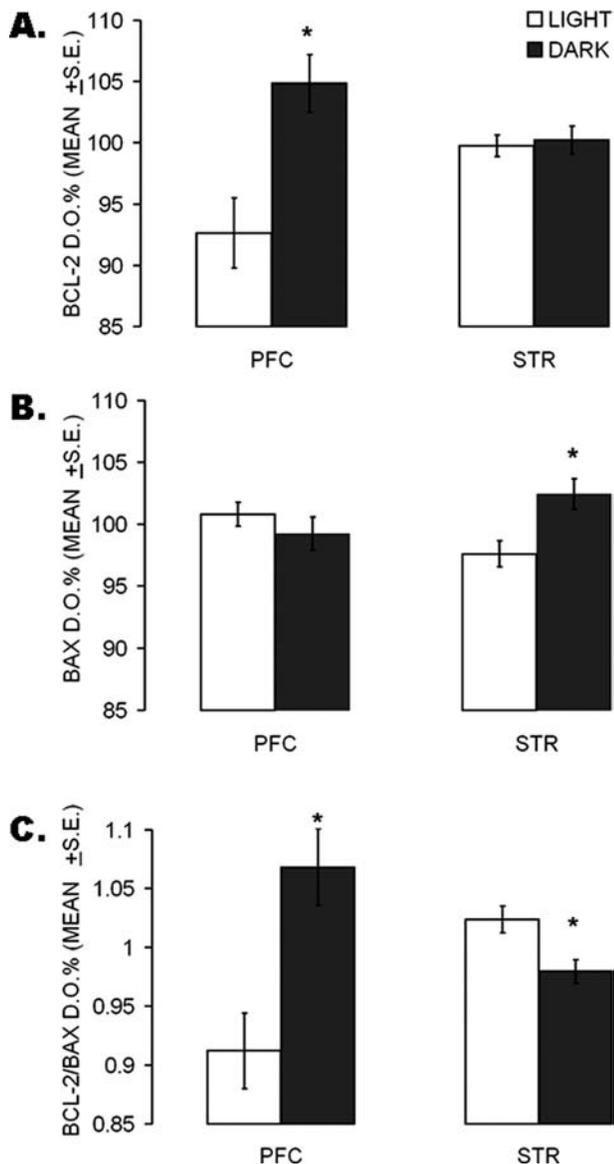


Fig. 2. Average BCL-2, BAX, and BCL-2/BAX ratio of densitometry units % during the dark or light phase in the prefrontal cortex and striatum of adult rats. **A:** BCL-2 levels. **B:** BAX levels. **C:** BCL-2/BAX ratio. PFC, prefrontal cortex; STR, striatum. Data are presented as mean  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ . For details of the analysis, see Materials and Methods.

whereas in the striatum it was 5% higher during the light than during the dark phase (Fig. 2c).

### BCL-2 and BAX Levels After Sleep Manipulations

In the prefrontal cortex, the BCL-2 and BAX levels increased as a result of TSD, but REB did not suffice to return levels to the basal values (Fig. 3a-c). The TSD-induced increase in BAX (8%) reduced the BCL-2/BAX ratio with respect to the CC group albeit the sleep rebound did not restore the BCL-2/BAX ratio (Fig. 3c). In the striatum, sleep manipulations did not

affect BCL-2, BAX, and BCL-2/BAX ratio (data not shown).

In the hippocampus, we did not observe significant changes in BCL-2 or BAX levels induced by the TSD manipulation (Fig. 3d,e); however, the BCL-2/BAX ratio exhibited a small increase of about 3% as compared with the CC group (Fig. 3f). During REB, BCL-2 increased with respect to the CC group (Fig. 3d); whereas BAX decreased during REB compared with CC and TSD groups (Fig. 3e). Hence, BCL-2/BAX ratio increased as a result of REB compared with CC and TSD groups (Fig. 5f).

In the pons, BAX increased in the TSD group as compared with CC and returned to basal levels after REB (Fig. 3h). BCL-2 remained unchanged after TSD but decreased after REB (Fig. 3g); hence, the BCL-2/BAX ratio was diminished by both TSD and REB (Fig. 3i).

### DISCUSSION

We sought to determine a potential healing role of sleep, in the sense that sleep could protect brain cells, as proposed by several authors but not entirely proven (Reimund, 1994; Benington and Heller, 1995; Drucker-Colín, 1995; Inoué et al., 1995; Krueger et al., 1995; Tononi and Cirelli, 2003; Gally and Edelman, 2004; Schulze, 2004). In this context, if sleep promotes cellular restoration in the brain, we expected to see an increase in antiapoptotic BCL-2 protein during the light phase of the cycle when rats mostly sleep. In contrast, during SD we expected to see an increase in BAX because proapoptotic proteins may be more active. Finally, we assumed that sleep rebound would increase drastically the expression of BCL-2 because BCL-2 and associated antiapoptotic proteins might struggle to restore the brain homeostasis altered by the prolonged waking and the simultaneous absence of sleep. All those changes would be reflected in the BCL-2/BAX ratio.

We did not observe consistent changes across brain in BCL-2 and BAX levels in diurnal variations or in sleep manipulations. Rather each region exhibited distinctive patterns. The prefrontal cortex was the most sensitive structure for both diurnal variations and sleep manipulation. The increased BCL-2 and BCL-2/BAX ratio during the dark period suggests a survival tone during the waking period (Fig. 1a,c). This event can be correlated with the increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression during the dark phase in the cortex of rats (Bova et al., 1998). BDNF can trigger the antiapoptotic actions of BCL-2 (Liu et al., 1999). BCL-2 and BDNF findings suggest a potential proapoptotic activity triggered during wakefulness by stress, as in our experimental conditions, induce an immediate antiapoptotic response mediated at least by these two molecules. In addition, active waking has been associated with an increase in BDNF expression in the cerebral cortex of rats (Huber et al., 2007).

During the sleep manipulation studies, we observed that the prefrontal cortex was critically affected by TSD

F3

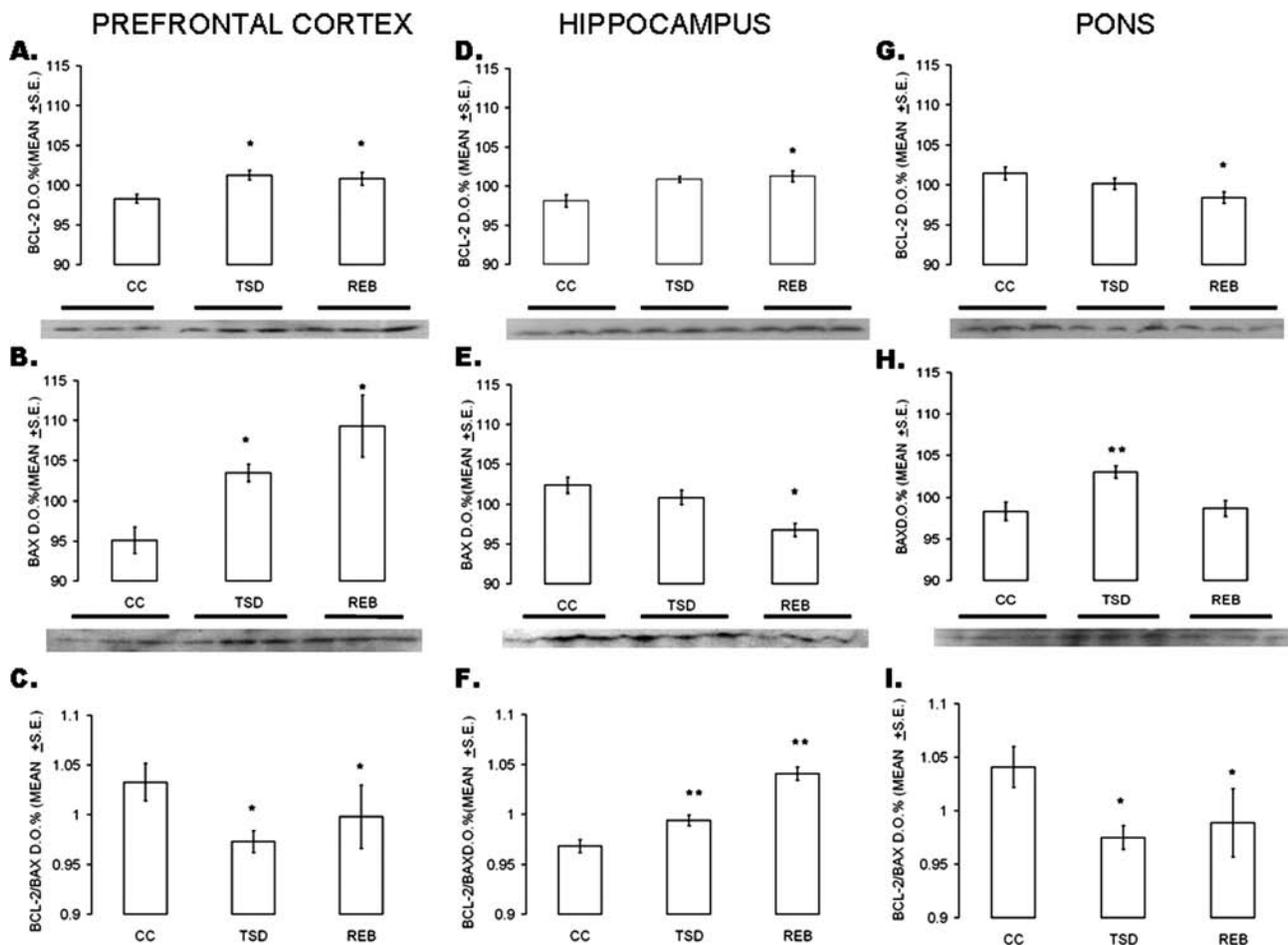


Fig. 3. BCL-2, BAX, and BCL-2/BAX ratio after total SD and after sleep rebound in prefrontal cortex (A,B,C, respectively); hippocampus (D-F) and pons (G-I) of adult rats. Representative Western immunoblots of BCL-2 and BAX are shown in the bottom of graphs; each line contains three independent samples for each sleep condition. CC, control cage; TSD, total SD, 24 hr; REB, sleep rebound,

24 hr; PFC, prefrontal cortex; HC, hippocampus; P, pons. Data are presented as mean  $\pm$  SE of densitometry units % (for analysis details see the Method section). \* $P < 0.05$  with respect to CC, \*\* $P < 0.05$  as compared with CC and TSD groups or with CC and REB groups.

because BAX increased and BCL-2/BAX ratio was diminished (Fig. 3b,c). These data support the notion that sleep is important for prefrontal cortex functioning, just as suggested by other authors (Drummond and Brown, 2001; Muzur et al., 2002). Several works indicate that the execution of prefrontal cortex-dependent tasks is deteriorated by TSD in humans (Harrison and Horne, 1998; Killgore et al., 2006; Nilsson et al., 2005), this poor execution is accompanied by a decrease in frontal activity (Thomas et al., 2000; Chee and Choo, 2004; Mu et al., 2005; Wu et al., 2006; Yoo et al., 2007). The deterioration imposed by SD to the prefrontal cortex was not reversed by the 24-hr-sleep-rebound period because BAX, BCL-2, and BCL-2/BAX ratio did not return to basal levels (Fig. 3a-c). It is possible that SD effects on the prefrontal cortex are long-lasting and more time is required for complete recovery, as

indicated by Wu et al. (2006). Our data suggest that BCL-2 and BAX proteins are highly sensitive to SD in the prefrontal cortex but their detailed functional actions require further experiments. In this part of our study, animals were killed at 21:00 hr. At this time of the day, BCL-2 was detected at its highest basal level. TSD further increased these levels (Figs. 1a and 3a), suggesting a cellular reaction caused by this condition. Interestingly, previous studies have not shown oxidative stress or apoptosis in the cerebral cortex caused by TSD or by REM-SD (D'Almeida et al., 1997, 1998; Cirelli et al., 1999; Eiland et al., 2002; Hipólido et al., 2002; Ramanathan et al., 2002; Gopalakrishnan et al., 2004; Biswas et al., 2006). However, these results do not exclude the possibility that the observed decrease in the BCL-2/BAX ratio could make neurons susceptible to a proapoptotic stimulus, as suggested by Piéron's SD studies

almost a century ago (Pierón, 1913). He reported that TSD sustained for 30 to 500 hr promotes degenerative changes in the PFC of dogs. It is also possible that either the BCL-2 increase suffices to inhibit BAX-mediated apoptosis or there is another survival pathway responding to TSD-imposed stress. In fact, acute SD enhances the presence of restorative and survival molecules, such as BDNF and NGF (Cirelli and Tononi, 2000; Brandt et al., 2001; Cirelli et al., 2004), suggesting the activation of a process that counteracts the consequences of cellular stress caused by SD.

The hippocampal activity is affected by SD, and although several conditions associated with oxidative stress have been documented (Ramanathan et al., 2002; Singh et al., 2008) no apoptosis markers have been found (Cirelli et al., 1999; Hipólido et al., 2002). TSD increased slightly the BCL-2/BAX ratio (Fig. 3f), suggesting that the BCL-2 family of proteins is a candidate pathway for inhibiting apoptosis in the hippocampus, under SD conditions. Sleep may increase cellular viability in the hippocampus because sleep rebound augmented the BCL-2/BAX ratio because BCL-2 increased and BAX decreased (Fig. 3d–f). These data indicate that sleep promotes cell viability in the hippocampus through the BCL-2 pathway. Regarding changes in the pons, although we did not observe clear spontaneous diurnal variations in BCL-2 and BAX levels, sleep manipulations actually induced changes. TSD reduced BCL2/BAX ratio by augmenting BAX but sleep rebound shifted back BAX levels (Fig. 3h,i). However, BCL2/BAX ratio diminished with respect to the control group because REB decreased BCL-2 levels (Fig 3g,i). These data suggest that cell viability in the pons is compromised after TSD through BAX actions. This finding agrees with those showing that a 5- to 11-day period of TSD diminishes superoxide dismutase activity in the brainstem (Ramanathan et al., 2002) and a 6-day period of REMSD induces apoptosis in PPT/LDT, LC, and RD (Biswas et al., 2006). In the striatum, the increase in both proteins, BCL-2 and BAX, during the dark phase suggests their repression by light (Fig. 1d–f). The increased BCL-2/BAX ratio during the light phase (Fig. 2c) suggests a facilitation of cellular viability during this period. These proteins did not exhibit changes in this structure caused by sleep manipulations, suggesting that the changes in these protein levels, detected in this structure, are possibly induced by the light–dark cycle but not by the sleep–waking cycle.

In conclusion, the changes in BCL-2 and BAX levels along the light–dark cycle and by sleep manipulations depend on the brain structure. Prefrontal cortex and pons are actually reactive to sleep manipulations. The prefrontal cortex was the most sensitive structure to sleep manipulations, evidencing that sleep is important for its function (Muzur et al., 2002). The hippocampus, in turn, seems to benefit from sleep because the BCL-2/BAX ratio increased during sleep rebound. BCL-2 and BAX are reactive to the light–dark cycle in the striatum, but remain unresponsive to sleep manipulations. We

consider it important to be aware that SD is by itself a stressful condition, and we cannot discard the stress component in our sleep manipulations.

Finally, a main and very novel additional finding is the description of spontaneous variations in BCL-2 expression in the prefrontal cortex along the light–dark cycle. We believe this fluctuation accounts for a very minute control in cellular survival of this brain region.

## ACKNOWLEDGMENTS

C.J.M.R. was supported by a fellowship from CONACyT. C.J.M.R. is enrolled in the Biomedical Research Program, UNAM, to obtain her PhD degree. We thank Alette Ortega and Marina Cisneros for their technical assistance.

## REFERENCES

- Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ, Leber B, Andrews DW. 2005. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 24: 2096–2103
- Benington JH, Heller HC. 1995. Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 45:347–370.
- Benn SC, Woolf CJ. 2004. Adult neuron survival strategies—slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 9:686–700.
- Biswas S, Mishra P, Mallick BN. 2006. Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience* 142:315–331.
- Bova R, Micheli MR, Qualadrucci P, Zucconi GG. 1998. BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light–dark cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 57:321–324.
- Brandt J, Churchill L, Guan Z, Fang J, Chen L, Krueger JM. 2001. Sleep deprivation but not a whisker trim increases nerve growth factor within barrel cortical neurons. *Brain Res* 898:105–112.
- Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouier H, Reed JC, Kroemer G. 2000. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19:329–336
- Burlacu A. 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 7:249–257.
- Chee MW, Choo WC. 2004. Functional imaging of working memory after 24 hr of total sleep deprivation. *J Neurosci* 24:4560–4567.
- Cheng WC, Berman SB, Ivanovska I, Jonas EA, Lee SJ, Chen Y, Kaczmarek LK, Pineda F, Hardwick JM. 2006. Mitochondrial factors with dual roles in death and survival. *Oncogene* 25:4697–4705.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396–1402.
- Cirelli C, Tononi G. 2000. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J Neurosci* 20:9187–9194.
- Cirelli C, Shaw PJ, Rechtschaffen A, Tononi G. 1999. No evidence of brain cell degeneration after long-term sleep deprivation in rats. *Brain Res* 840:184–193.
- Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G. 2004. Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron* 41:35–43.
- D'Almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira V, Tufik S. 1997. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* 235:25–28.
- D'Almeida V, Lobo LL, Hipólido DC, de Oliveira AC, Nobrega JN, Tufik S. 1998. Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport* 9:2853–2856.

AQ3

AQ4

## 8 Montes-Rodríguez et al.

- Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116:205–219.
- Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM, Snider WD, Korsmeyer SJ. 1996. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17:401–411.
- Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhun W, Zhang Z, Lin J, Leber B, Andrews DW. 2006. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J* 25:2287–2296.
- Drucker-Colín R. 1995. The function of sleep is to regulate brain excitability in order to satisfy the requirements imposed by waking. *Behav Brain Res* 69:117–124.
- Drummond SP, Brown GG. 2001. The effects of total sleep deprivation on cerebral responses to cognitive performance. *Neuropsychopharmacology* 25:S68–S73.
- Eiland MM, Ramanathan L, Gulyani S, Gilliland M, Bergmann BM, Rechtschaffen A, Siegel JM. 2002. Increases in amino-cupric-silver staining of the supraoptic nucleus after sleep deprivation. *Brain Res* 945:1–8.
- Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. 1989a. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 12:13–21.
- Everson CA, Guillian MA, Kushida CA, Pilcher JJ, Fang VS, Refetoff S, Bergmann BM, Rechtschaffen A. 1989b. Sleep deprivation in the rat: IX. Recovery. *Sleep* 12:60–27.
- Fenzl T, Romanowski CP, Flachskamm C, Honsberg K, Boll E, Hoehne A, Kimura M. 2007. Fully automated sleep deprivation in mice as a tool in sleep research. *J Neurosci Methods* 166:229–235.
- Gally JA, Edelman GM. 2004. Neural reapportionment: a hypothesis to account for the function of sleep. *C R Biologies* 327:721–727.
- Gopalakrishnan A, Ji LL, Cirelli C. 2004. Sleep deprivation and cellular response to oxidative stress. *Sleep* 27:27–35.
- Häcker G, Weber A. 2007. BH3-only proteins trigger cytochrome *c* release but how? *Arch Biochem Biophys* 462:150–155.
- Harrison Y, Horne JA. 1998. Sleep loss impairs short and novel language tasks having a prefrontal focus. *J Sleep Res* 7:95–100.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776.
- Hipólido DC, D'Almeida V, Raymond R, Tufik S, Nobrega JN. 2002. Sleep deprivation does not affect indices of necrosis or apoptosis in rat brain. *Int J Neurosci* 112:155–166.
- Huber R, Tononi G, Cirelli C. 2007. Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis. *Sleep* 30:129–139.
- Inoué S, Honda K, Cómoda Y. 1995. Sleep as neuronal detoxification and restitution. *Behav Brain Res* 69:91–96.
- Killgore WD, Balkin TJ, Wesensten NJ. 2006. Impaired decision making following 49 h of sleep deprivation. *J Sleep Res* 15:7–13.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132–1136.
- Krueger JM, Obl F, Kapš L, Fang J. 1995. Brain organization and sleep function. *Behav Brain Res* 69:177–185.
- Kushida CA, Bergman BM, Rechtschaffen A. 1989. Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* 12:22–30.
- Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS. 1999. Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 27:2086–2090.
- Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, González-Rivera R, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospero-García O, Navarro L. 2003. Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience* 117:197–201.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prévost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281:2027–2031.
- McDermott CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazan NG, Magee JC. 2003. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23:9687–9695.
- Mu Q, Mishory A, Johnson KA, Nahas Z, Kozel FA, Yamanaka K, Bohning DE, George MS. 2005. Decreased brain activation during a working memory task at rested baseline is associated with vulnerability to sleep deprivation. *Sleep* 28:433–446.
- Muzur A, Pace-Schott EF, Hobson JA. 2002. The prefrontal cortex in sleep. *Trends Cogn Sci* 6:475–481.
- Nilsson JP, Söderström M, Karlsson AU, Lekander M, Akerstedt T, Lindroth NE, Axelsson J. 2005. Less effective executive functioning after one night's sleep deprivation. *J Sleep Res* 14:1–6.
- Pierón H. 1913. *Le probleme physiologique de sommeil*. Paris: Masson.
- Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM. 2002. Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *NeuroReport* 13:1387–1390.
- Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124:1–6.
- Reed JC. 2006. Proapoptotic multidomain Bcl/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 13:1378–1386.
- Reimund E. 1994. The free radical flux theory of sleep. *Med Hypotheses* 43:231–233.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J. 2005. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437:1257–1263.
- Schulze G. 2004. Sleep protects excitatory cortical circuits against oxidative damage. *Med Hypotheses* 63:203–207.
- Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. 2004. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644:107–113.
- Singh R, Kiloung J, Singh S, Sharma D. 2008. Effect of paradoxical sleep deprivation on oxidative stress parameter in brain regions of adult and old rats. *Biogerontology* 9:153–162.
- Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, Zhang Z, Lapolla SM, Plafker SM, Andrews DW, Lin J. 2004. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem* 281:14764–14775.
- Thomas M, Sing H, Belenky G, Holcomb H, Mayberg H, Dannals R, Wagner H, Thorne D, Popp K, Rowland L, Welsh A, Balwinski S, Redmond D. 2000. Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness. I. Effects of 24 h of sleep deprivation on waking human regional brain activity. *J Sleep Res* 9:335–352.
- Tononi G, Cirelli C. 2003. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res Bull* 62:143–150.
- Wu JC, Gillin JC, Buchsbaum MS, Chen P, Keator DB, Khosla Wu N, Darnall LA, Fallon JH, Bunney WE. 2006. Frontal lobe metabolic decreases with sleep deprivation not totally reversed by recovery sleep. *Neuropsychopharmacology* 31:2783–2792.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science* 275:1129–1132.
- Yoo SS, Gujar N, Hu P, Jolesz FA, Walker MP. 2007. The human emotional brain without sleep—a prefrontal amygdala disconnect. *Curr Biol* 17:R877–R878.
- Yuan J, Yanker BA. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802–809.

AQ5

# De la restauración neuronal a la reorganización de los circuitos neuronales: una aproximación a las funciones del sueño

C.J. Montes-Rodríguez<sup>a</sup>, P.E. Rueda-Orozco<sup>a</sup>, E. Urteaga-Urías<sup>a</sup>,  
R. Aguilar-Roblero<sup>b</sup>, O. Prospero-García<sup>a</sup>

## FROM NEURONAL RECOVERY TO THE REORGANISATION OF NEURONAL CIRCUITS: A REVIEW OF THE FUNCTIONS OF SLEEP

**Summary.** Aim. To analyse the data and concepts that have been produced in relation to one of the functions that have been suggested for sleep, namely, neuronal recovery. Development. Sleep is a state of consciousness that is different to that of arousal. Mammals devote an important part of their lives to sleeping; for example, as humans, we sleep for a third of our lives, but why do we spend so much time in a state where we lose contact with our surroundings? What would happen if we didn't sleep? Total sleep deprivation alters cognitive processes such as memory or attention, and if this deprivation is prolonged, the individual deteriorates and dies. It has been suggested that sleep provides the organism with time to recover from the wear and tear that occurs during the waking state and, given that the first effects of the absence of sleep are seen to affect processes that are directly dependent on the brain, it has been claimed that its main purpose is to allow neuronal recovery. In this work we analyse some of the studies on the effects of total sleep deprivation in humans and rats, as well as the relationship between sleep and the neurotrophin system, which promotes neuronal survival and recovery. Finally, the latest theories about the function of sleep are discussed. Conclusions. Neuron recovery is not the ultimate purpose of sleep; rather it is to allow for maintenance and reorganisation of neuronal circuits, including new synapse formation, which enables existing neuronal networks to be modified by the effect of experience, and all this makes it possible for the brain to work properly and to adapt itself to the environment. [REV NEUROL 2006; 43: 409-15]

**Key words.** Functions of sleep. Neuronal recovery. Neuronal survival. Neurotrophins. Sleep deprivation.

## INTRODUCCIÓN

Los humanos adultos dormimos ocho horas diarias en promedio, lo que equivale a una tercera parte del día, ¿para qué pasar la tercera parte de nuestra vida dormidos? Por experiencia sabemos que si una noche no dormimos, la vigilia del día siguiente será desagradable, estaremos somnolientos, no atenderemos bien a los diferentes estímulos y la capacidad para retener información estará disminuida. Consecuentemente, nuestra capacidad para generar y emitir respuestas adaptativas estará deteriorada [1-4]. Estos síntomas desaparecen tan sólo con dormir. ¿Qué ha pasado durante la vigilia prolongada?, ¿qué sucede cuando dormimos? Numerosas personas aseguran que el sueño sirve para descansar y, a pesar de que esto puede ser cierto, los científicos que estudiamos el sueño difícilmente podríamos explicar lo que significa 'descansar' en términos fisiológicos, y menos aún, si este descanso ocurre durante el sueño. Por mucho tiempo se ha propuesto que el sueño sirve para restaurar, principalmente al cerebro y a sus neuronas, del desgaste ocurrido durante la vigilia [5-7], en base a los efectos que tienen diferentes períodos de privación de sueño sobre el organismo [6-9]. Sin em-

bargo, los datos obtenidos hasta ahora no son suficientes para sustentar que la restauración neuronal es dependiente del sueño y, mucho menos, cuáles son los potenciales mecanismos por los que se llevaría a cabo.

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es abordar las funciones del sueño. Primordialmente se discute que la restauración neuronal no es la única función del sueño, sino, aún más importante, que es la reorganización funcional de los circuitos neuronales. Esto sugiere el fortalecimiento de conexiones neuronales existentes y la formación de nuevas. Es decir, la formación de nuevas sinapsis. Para ello, primero debe revisarse qué es el sueño y algunos conceptos generales en torno a él; posteriormente, se analizan los efectos de la privación de sueño y la relación entre las neurotrofinas y el sueño. Finalmente, se abordan teorías propuestas para la función del sueño.

## ¿QUÉ ES EL SUEÑO?

El sueño se ha definido como un estado de quietud conductual de los organismos, acompañado de una postura de inmovilidad o reposo (propia de la especie), con una disminución en la capacidad de responder a los estímulos externos [10] (Fig. 1).

El sueño forma parte del ciclo sueño-vigilia. Durante la vigilia percibimos e interpretamos los estímulos, por lo que decimos que somos conscientes del mundo externo, interactuamos con él y respondemos a él, incluso modificándolo. En este sentido, estamos equiparando la conciencia con la vigilia con fines operacionales. En tal contexto, la esencia fundamental del sueño es retirarnos de dicha interacción con el ambiente [10]. Esto supone que la interacción cognición-ambiente, considerada por

Aceptado tras revisión externa: 24.05.06.

<sup>a</sup> Grupo de Neurociencias. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. <sup>b</sup> Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, México.

Correspondencia: Dr. Óscar Prospero García. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-250. México DF, 04510, México. Fax: (+52 55) 5622 5607. E-mail: opg@servidor.unam.mx

Este trabajo contó con la beca DGAPA-UNAM IN230503, otorgada a OPG.

Agradecimientos. A los psicólogos K. Guzmán, por la realización de la figura 1, y E. Soria-Gómez, por la revisión crítica de este manuscrito.

© 2006, REVISTA DE NEUROLOGÍA

algunos autores como el estado de conciencia, ocurre durante la vigilia [11], pero no durante el sueño, presentándose entonces un estado de 'inconsciencia' donde la interacción ambiente-cerebro ocurre aunque de forma disminuida, pero no así la interacción conciencia-ambiente.

Desde la perspectiva anterior, el estado de conciencia y vigilia, así como el de inconsciencia y sueño, son producto de la activación e interacción de sistemas cerebrales, de los cuales unos se activan para producir nuestra conciencia, mientras que, simultáneamente, otros se inhiben. Algunos de ellos se pondrán en marcha cuando dormimos, con la simultánea inactivación de los sistemas que estuvieron activos durante la vigilia [12-15].

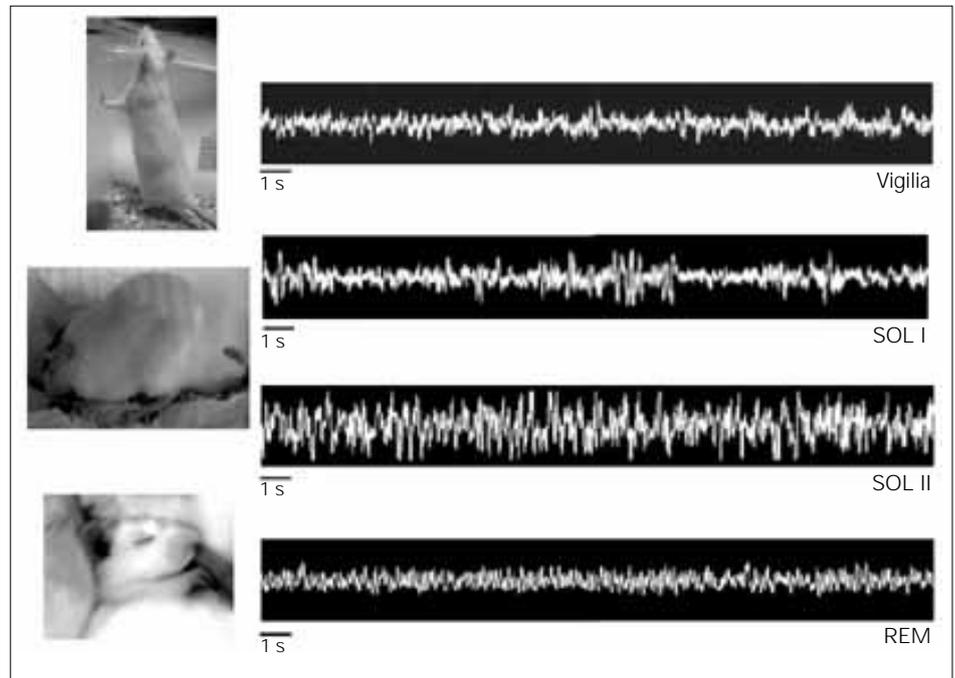
### SUEÑO REM, NO REM Y VIGILIA

El registro de la actividad electroencefalográfica ha permitido realizar una clasificación de los estados de vigilancia en mamíferos: vigilia y sueño. El sueño se ha dividido en dos grandes fases: la fase de sueño con movimientos oculares rápidos (REM, del inglés *rapid eye movements*) y la fase sin ellos (no REM) [10,12].

La vigilia se caracteriza por un ritmo de actividad eléctrica cerebral rápida y de bajo voltaje; se puede registrar actividad tan rápida hasta de 40 Hz (ritmo  $\gamma$ ), el cual puede interrumpirse por estímulos auditivos [13]. Este ritmo se supone que está generado por la actividad del asa corteza cerebral-tálamo-corteza cerebral. Hay movimientos oculares coordinados, se observa la presencia de tono muscular y una clara interacción del sujeto con su medio externo [10,12] (Fig. 1).

El sueño no REM se caracteriza por una disminución en la velocidad de la actividad eléctrica cerebral, llegando a ser lenta y de gran amplitud, por lo que se conoce como sueño de ondas lentas. Hay ausencia de ritmo  $\gamma$  (aunque la estimulación auditiva puede provocarlo) [13], el tono muscular está disminuido en comparación con la vigilia y los movimientos oculares son lentos y asincrónicos. La mayor cantidad de sueño no REM en humanos se presenta en la primera mitad de la noche [10,12].

El sueño REM se caracteriza por una actividad eléctrica cerebral rápida y de bajo voltaje, y con presencia de ritmo  $\gamma$ . Este ritmo no puede interrumpirse con la estimulación auditiva que lo interrumpe en la vigilia [13]. La presencia de respuesta a potenciales provocados a lo largo del ciclo sueño-vigilia, así como la actividad unitaria a lo largo del sistema auditivo durante el sueño, indican que el sistema talamocortical es sensible a la entrada sensorial. Sin embargo, como se señaló anteriormente, el estímulo auditivo que interrumpe el ritmo  $\gamma$  durante la vigilia, no lo hace durante el sueño REM, lo que indica que la entrada sensorial se selecciona en el tálamo durante el sueño REM de una manera diferente a como sucede durante la vigilia [16]. Huelga decir que estos estímulos auditivos no interrumpen la fase de sueño REM como tal.



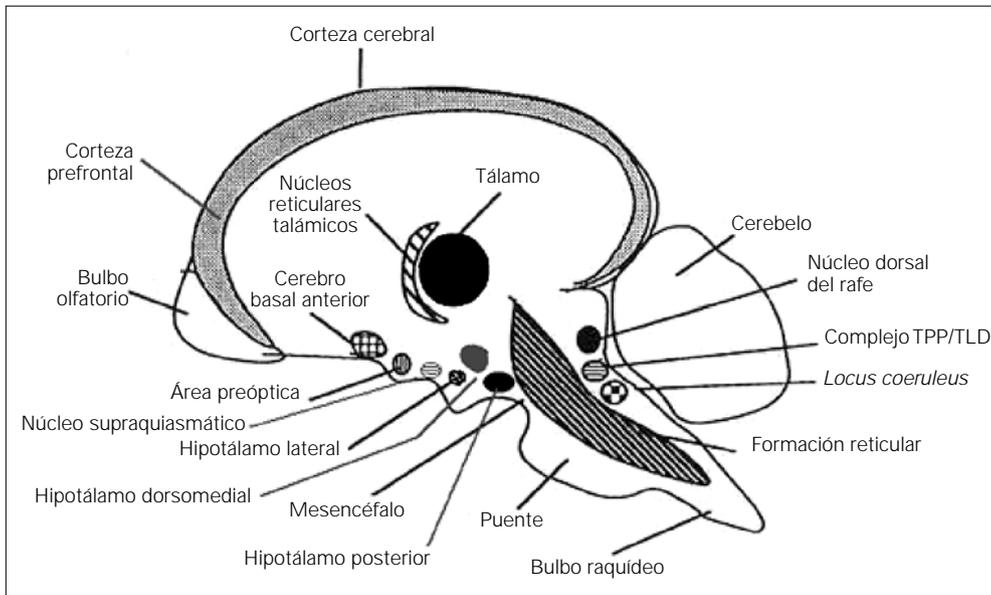
**Figura 1.** Actividad eléctrica cerebral de la rata a través de las fases del ciclo sueño-vigilia. SOL: sueño de ondas lentas; REM: sueño de movimientos oculares rápidos.

Hay ausencia de tono muscular y presencia de movimientos oculares rápidos. La mayor parte del sueño REM se presenta en la segunda mitad de la noche y se ha relacionado con las ensoñaciones en el humano [10,12].

### ESTRUCTURAS CEREBRALES Y SUEÑO

La actividad eléctrica cerebral de las neuronas de varias estructuras cerebrales es diferente a lo largo de la vigilia, el sueño no REM y el sueño REM. Para la detección de los grupos neuronales que se activan en estos estados de vigilancia se han usado indicadores metabólicos de dicha activación. Así, mediante tomografía por emisión de positrones se ha demostrado que la actividad metabólica cerebral es mínima durante el sueño no REM, en comparación con la observada durante la vigilia, principalmente en estructuras como el tálamo, los núcleos de la base, el hipotálamo y la corteza prefrontal, parietal y temporomedial. En esta fase, el cerebro presenta una actividad tan baja, que parece estar 'desconectado' del medio externo [17,18]. Adicionalmente, no se presenta de forma espontánea el ritmo de 40 Hz, que se ha asociado con procesos cognitivos [13]. En contraste, en el sueño REM se observa una intensa actividad en el tallo cerebral, el tálamo, la corteza occipital, los lóbulos prefrontales en su parte media-basal, y el sistema límbico (amígdala, hipocampo y circunvolución del cíngulo). Por el contrario, la actividad de la corteza parietal, prefrontal dorsolateral y la del cíngulo posterior disminuye [18]. Curiosamente, presenta 40 Hz, aunque no es reactivo a los estímulos auditivos, como en la vigilia [13]. Durante la vigilia siempre existe una gran actividad en la corteza prefrontal, el lóbulo occipital y el lóbulo parietal (principalmente en el izquierdo), además de la corteza del cíngulo y la amígdala [18].

La actividad de algunas estructuras como la corteza prefrontal se ha asociado con el despliegue de estrategias de un organismo para responder a los diferentes estímulos ambientales du-



**Figura 2.** Principales estructuras cerebrales que regulan el ciclo sueño-vigilia. Sueño no REM: área preóptica y núcleos intralaminares talámicos. Sueño REM: núcleo pedunculopontino tegmental y laterodorsal (TPP/TLD). Vigilia: formación reticular, locus coeruleus, núcleo dorsal del rafe, tálamo e hipotálamo (modificado de [12]).

durante la vigilia [19]. Durante el sueño, estas estructuras disminuyen su actividad [17,18], no responden al medio, no dan señales de estar analizando los estímulos del medio, es como si 'durmieran'. Mientras tanto, podemos detectar la activación de otras estructuras [17,18] que parecen mantener al cerebro en estado 'durmiente'. Esta especificidad en la actividad neuronal sugiere la existencia de dos cerebros: uno está activo en la vigilia y permite una adecuada interacción del sujeto con su ambiente (para adaptarnos, para ser creativos y productivos, para reproducirnos o para buscar alimento). Cuando este cerebro reduce su actividad, hay otro que se despierta, y es al que responsabilizamos de la actividad de dormir. A pesar de que muchos detalles de los mecanismos de acción de este cerebro ejecutor del sueño se conocen con razonable precisión, aún no sabemos qué persigue, cuál es su fin, su función...

Si el sueño y la vigilia son un ciclo, esto querría decir que el sueño beneficia a la vigilia, y viceversa. En términos de los dos cerebros, el de la vigilia tiene funciones que nos es fácil observar, aunque sus mecanismos estén aún por elucidarse. Comer, beber, aparearse, pensar y relacionarse con los semejantes son funciones de este cerebro. Sin embargo, el cerebro del sueño cumple una función que no queda clara. En este contexto, sólo dos verdades son irrefutables: el cerebro del dormir reclama una parte del día para ejercer su función, y algo hace que beneficia al cerebro de la vigilia (Fig. 2).

## PRIVACIÓN DE SUEÑO

El estudio de las funciones del sueño ha utilizado, clásicamente, manipulaciones experimentales que brindan datos muy generales sobre las consecuencias de la pérdida de sueño sobre el organismo.

El grupo de Rechtschaffen [20] observó que la privación de sueño total (PST) en ratas las conduce a una muerte inevitable en un promedio de tres semanas. En el ínterin, las ratas exhibieron un importante deterioro físico, con ulceraciones en la piel, en la cola y en las patas, alteraciones en la coordinación motora y pos-

tural (ataxia), aumento en la ingesta de alimento acompañada de una pérdida de peso considerable, e incremento en la energía expedita. Además, durante las últimas 24 horas, algunas ratas cursaron con una disminución drástica de la temperatura corporal.

Estos trabajos sugieren que el cerebro del sueño beneficia de manera crucial al de la vigilia, por lo que es indispensable para la vida. Evidentemente, estos estudios indican que surge un desequilibrio homeostático por no dormir, originando una descompensación en el metabolismo de los animales bajo una PST crónica. Los autores de estos trabajos argumentan que no hubo fallos en el metabolismo intermedio de las ratas, pero

sí un catabolismo acelerado. Esto se infirió por el aumento de urea y la disminución de albúmina circulantes. Además, el incremento en la energía expedita, el aumento de la ingesta de alimento y la ausencia de tejido graso indican un uso acelerado de nutrientes y la absorción anormal de grasas [20,21]. Así, estos autores concluyen que el bajo peso de las ratas no puede explicarse por una mala absorción de nutrientes o deshidratación, y por sí solo no explica la muerte de las ratas. Con base en el síndrome inducido por la PST y seguido de la consecuente muerte de los animales, se ha propuesto que la función del sueño consiste en 'restaurar' al organismo del desgaste ocurrido en la vigilia [5-9]. Sin embargo, estos efectos observados por la PST crónica son muy generales y no se propone un mecanismo que explique la razón de la muerte de estos animales. Además, la PST es una vigilia forzada que no se asemeja a la vigilia espontánea de las ratas [22].

Para privar de sueño total a las ratas, éstas se colocan en una plataforma que rota cada vez que el animal presenta una actividad cerebral de ondas lentas, que sugiere que el animal se está quedando dormido [22]. Esta condición es muy diferente a su ambiente natural o a la vigilia espontánea, ya que al menos está matizada por un aumento en el estrés que la rata debe de manejar. Bergmann et al [21] observaron un aumento en los niveles de la hormona adrenocorticotropina y de corticosteroides en los animales con PST comparados con sus controles. Además, comunicaron que algunas ratas bajo PST presentaron puntos de erosión en el estómago y glándulas suprarrenales más grandes; los autores argumentaron un estrés terminal. A partir de estas manipulaciones se ha dicho que un organismo muere por no dormir y que, por lo tanto, el sueño debe servir para restaurar. Sin embargo, se han soslayado los mecanismos subyacentes que tienen relación con la calidad de la vigilia y no con la ausencia del sueño. Tendríamos primero que descartar el efecto del estrés que obliga a considerar que los animales no han muerto por la falta de sueño, sino por el exceso de vigilia y de mala vigilia, es decir, 'llenos' de estímulos estresantes que demandan un esfuerzo extraordinario del organismo y su cerebro.

Estudios realizados en humanos privados de sueño durante 24 y 36 horas informan que éstos exhiben un déficit moderado en la ejecución de pruebas que evalúan tareas cognitivas como memoria, atención y aprendizaje, además de una drástica disminución en el tiempo de reacción para realizar las tareas [1-4]. La eficiencia para resolver estas tareas se recupera con el simple hecho de dormir. Estos datos sugieren que el órgano que se afectó en primera instancia por la privación de sueño es el cerebro. Mediante estudios de resonancia magnética funcional podemos corroborar esta idea. La ejecución de un sujeto en una tarea que evalúa memoria trabajando se deteriora después de 24 horas de PST, lo cual correlaciona con una disminución en la captación de oxígeno en la corteza frontal anterior medial [1]. También disminuye la captación de oxígeno en la corteza cingulada posterior [1]. Si no dormimos, se alteran funciones cognitivas indispensables para la interacción del sujeto con el ambiente, lo que sugiere que la restauración del cerebro es la principal diana de la actividad neuronal que instala el sueño [5-9].

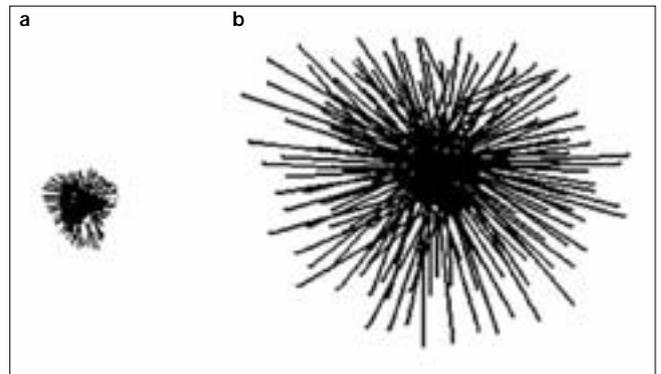
### SUPERVIVENCIA NEURONAL Y NEUROTROFINAS

En la década de los cuarenta, Levi-Montalcini y Hamburger [23] aislaron una molécula capaz de promover la supervivencia y crecimiento de neuronas. A esta molécula la denominaron factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nervous growth factor*). Observaron que la supervivencia de neuronas sensoriales y simpáticas durante el desarrollo embrionario depende del NGF. En ausencia de este factor o de su receptor de alta afinidad, las neuronas mueren. Además, el tratamiento con NGF exógeno mantiene vivas neuronas que normalmente morirían (Fig. 3).

Esta observación llevó a la hipótesis neurotrófica, la cual propone que las neuronas inmaduras compiten por células diana proveedoras de factores tróficos que se suministran limitadamente. Sólo las neuronas que tienen éxito en establecer las conexiones sinápticas correctas para la obtención del factor trófico sobrevivirán; las neuronas no exitosas morirán [23,24]. No parece que el suministro limitado de los factores tróficos sea aleatorio, sino que se persigue rescatar sólo las neuronas más aptas. La supervivencia de la neuronas por la obtención del factor trófico ejemplifica parte del proceso que Edelman denomina 'darwinismo neuronal' [25], el cual propone que ocurre una selección de grupos neuronales en base al establecimiento de nuevas sinapsis y al uso de las conexiones establecidas entre los grupos neuronales. Estas conexiones crean redes neuronales que originan la emergencia de mapas cognitivos para la interacción con el ambiente. Edelman incluso propone que estos arreglos neuronales complejos generan la conciencia como una función emergente [26].

Se han descrito cuatro neurotrofinas: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) y las neurotrofinas 3 (NT3) y 4 (NT4) [23,24]. En el sistema nervioso central adulto, las neurotrofinas facilitan diversos fenómenos plásticos como la eficiencia sináptica [24,27,28], fundamental para la adquisición de nueva información en la interacción del sujeto con su ambiente.

Si es verdad que el sueño sirve para restaurar al cerebro, las neurotrofinas son idóneas para hacerlo o, al menos, deben contribuir en parte. En este contexto se revisan algunos experimentos realizados al respecto.



**Figura 3.** Esquema que ejemplifica la acción de las neurotrofinas en las neuronas: a) Neurona sin neurotrofinas, la cual muere; b) Neurona con neurotrofinas. Obsérvese el crecimiento de neuritas por acción de las neurotrofinas (dibujo realizado con base en [23]).

### Neurotrofinas y sueño

Diversos experimentos han mostrado la capacidad de las neurotrofinas para inducir sueño y el incremento en la expresión de éstas por efecto de la PST.

La administración de NGF en el ventrículo cerebral de conejos les provoca un incremento en el sueño REM y no REM [29]. La administración intracerebroventricular de BDNF modifica la cantidad de sueño en ratas y conejos. En ratas se observa un incremento en el sueño no REM, y en conejos, un aumento en el sueño no REM y REM [30]. La NT-3 y la NT-4 administradas intracerebroventricularmente en conejos incrementan la cantidad de sueño no REM [31].

Por otro lado, se ha observado que la PST provoca un aumento en la expresión de BDNF y NGF en la corteza cerebral de ratas. El BDNF se incrementa con una PST de 8 horas [32], y el NGF, con una PST de 6 horas [33]. Adicionalmente, la PST durante 24 horas reduce la muerte neuronal inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y la glucoproteína 120 derivada del virus de inmunodeficiencia humana, en la corteza cerebral de ratas [34], lo que sugiere una protección neuronal por la PST. Con base en estos experimentos, algunos autores han sugerido que las neurotrofinas participan en los mecanismos que regulan el sueño [29-31,33], principalmente por su capacidad de inducir sueño cuando se administran en el cerebro de los animales. Sin embargo, los datos sobre las neurotrofinas y el sueño no resultan suficientes para explicar de qué forma éstas actúan durante el sueño.

### ¿El cerebro durmiente utiliza las neurotrofinas para restaurar al cerebro despierto?

Las neurotrofinas podrían actuar como factores inductores de sueño. La teoría señala que estos factores se acumulan durante la vigilia y disminuyen durante el sueño. Además, si se administran a un organismo pueden inducir sueño, aun cuando éste se encuentre saciado de sueño. Complementariamente, si se priva de sueño a un organismo, los factores inductores de sueño se incrementan [35].

En el cerebro de la rata durante la vigilia o la PST se observa una mayor expresión del BDNF y su receptor, pero no durante el sueño [32]. Si pensamos que la PST es una vigilia prolongada y que cuando se evalúan los niveles del BDNF en el animal, éste se encuentra despierto, la interpretación podría ser diferente. Hay más neurotrofinas en la vigilia de los organismos

que durante el sueño. Las neurotrofinas promueven la transmisión sináptica, la potenciación a largo plazo y la liberación de neurotransmisores [24,27,28], eventos de plasticidad cerebral que ocurren principalmente durante la vigilia, como resultado de la interacción del sujeto con su ambiente.

Se ha mostrado que la expresión de los mensajeros del BDNF y de su receptor trkB (receptor con actividad de tirosina cinasa-B) presentan cambios a lo largo del ciclo luz-oscuridad (variaciones diurnas) en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas. La máxima manifestación del mensajero del BDNF es en la fase de oscuridad (vigilia de la rata), mientras que el mensajero del trkB es más alto en la fase de luz (sueño de la rata) [36]. La expresión del trkB en el hipocampo de ratas es mayor durante la fase de oscuridad [37], y el del BDNF, mayor en la corteza cerebral de ratas en la fase de oscuridad [32].

Si el trkB varía a lo largo del ciclo luz-oscuridad, probablemente las moléculas intracelulares dependientes de los receptores con actividad de tirosina deben, consecuentemente, exhibir variaciones diurnas. Por ejemplo, Bcl-2 es una proteína intracelular que promueve la supervivencia celular y que es dependiente de los receptores con actividad de tirosina. En nuestro laboratorio hemos observado la expresión de Bcl-2 a lo largo del ciclo luz-oscuridad en la corteza cerebral de ratas. Los datos preliminares muestran que hay más Bcl-2 durante la fase de oscuridad. Así, la expresión de Bcl-2 es mayor durante la vigilia de la rata, como el trkB y el BDNF, lo que correlaciona con la máxima actividad de la corteza cerebral, la cual, como se mencionó anteriormente, origina en parte el patrón de actividad cerebral característico de la vigilia.

La expresión de neurotrofinas depende de la actividad neuronal [24,36-38]; la pregunta que surge de ello es: ¿con qué se relaciona la protección celular dada por estas moléculas, con el sueño o con la vigilia? En el hipocampo o en la corteza cerebral de ratas, la disponibilidad de moléculas que promueven la supervivencia celular como BDNF, trkB y Bcl-2 resulta mayor durante la fase de oscuridad, que corresponde a la vigilia del animal. Este sistema de restauración parece permanecer activo cuando las estructuras cerebrales están a su vez más activas. Probablemente, la reparación de las células es un evento tan importante que se produce en el momento mismo en que se están 'desgastando'.

Sin embargo, el mensajero del trkB en la corteza cerebral y el hipocampo es mayor en la fase de luz (fase de sueño) [36]. La síntesis de este receptor durante la fase de luz puede sugerir que es en el sueño cuando parte de la maquinaria para la supervivencia de las neuronas debe recargarse.

### ***Entonces, ¿es la restauración neuronal una función del sueño?***

Para abordar la restauración neuronal como una función del sueño primero debe definirse qué significa 'restaurar' y qué restauraría el sueño.

El término 'restaurar' se define como recuperar, colocar una 'cosa' en el estado o circunstancia en que se encontraba anteriormente, por lo que, hablando de sistemas cerebrales, 'restaurar' sería el proceso celular básico que llevaría a dichos sistemas a permanecer sin cambios, regresándolos al estado original. Este fenómeno no solamente no ocurre, sino que no es deseable desde un punto de vista adaptativo. Sin embargo, cierta restauración resulta necesaria para que las neuronas tengan las condiciones óptimas después de un período de uso y desgaste, todo ello para el buen funcionamiento del cerebro. El sustrato específico de la restauración serían las neuronas.

El sistema neuroquímico idóneo de restauración neuronal pareciera ser el de las neurotrofinas, por sus propiedades inductoras de crecimiento y supervivencia neuronal antes descritas. Sin embargo, los datos aquí presentados descartan esta idea. La restauración vía neurotrofinas no parece ocurrir durante el sueño, y por el contrario, la acción de las neurotrofinas sobre las neuronas parece suceder cuando hay una mayor actividad de éstas, y ello es generalmente durante la vigilia. Si nos restringimos a definir la restauración como lo hemos hecho, entonces ésta se lleva a cabo en cualquier momento del día. ¿Cuál sería entonces la función del cerebro del sueño? Pensamos que podría ser, preferentemente, el mantenimiento y la reorganización de los circuitos neuronales.

### **CÓMO SE REORGANIZAN LAS NEURONAS Y SUS CONEXIONES**

Si la restauración cerebral, como hemos dicho, se refiere a la restitución de las condiciones óptimas para el buen funcionamiento de las neuronas, el buen funcionamiento del cerebro depende del mantenimiento y la reorganización de sus sistemas. El término 'reorganizar' se refiere a 'organizar algo de manera distinta y de forma que resulte más eficiente'. Dicha reorganización tendría que ocurrir en las conexiones neuronales y llevarse a cabo mientras dormimos, ya que es cuando disminuimos nuestra interacción con el medio ambiente. De esta forma trabajamos con lo que hemos adquirido y no incluimos información de estímulos que ocurren en ese preciso instante. Por ejemplo, Krueger et al [39] proponen la teoría de los grupos neuronales, retomando la teoría del darwinismo neuronal [25,26]. Estos autores plantean que el sueño resulta del uso y mantenimiento de las sinapsis que se estimularon insuficientemente durante la vigilia, por lo que la función del sueño sería preservar una constancia en la superestructura sináptica. Lo limitante de esta hipótesis es que se descarta la neoformación de sinapsis, un fenómeno que ampliamente se ha demostrado que sucede en el cerebro y forma parte del sustrato de la memoria y el aprendizaje. Por ello, la propuesta de Tononi et al [40] de que la función del sueño es mantener una homeostasis sináptica resulta más interesante. Por ejemplo, Tononi et al sugieren que durante la vigilia hay una actividad cerebral dada que permite la formación de nuevas sinapsis por efecto del aprendizaje. La disminución y sincronización de la actividad de la corteza cerebral que ocurre en el sueño no REM permite una reducción en la cantidad de sinapsis, por lo que la función del sueño no REM sería conservar una homeostasis sináptica [37]. Es decir, constituye un proceso de 'desaprendizaje', un deshacerse de la 'basura' cognitiva. Esto ya lo habían formulado Crick et al [41], quienes propusieron que ésta era una función del sueño REM. La teoría de los grupos neuronales propuesta por Krueger et al [39] y la hipótesis de la homeostasis sináptica de Tononi et al [40] adjudican al sueño la responsabilidad de la reorganización de las conexiones neuronales. Sin embargo, aún no hay evidencias experimentales que respalden totalmente estas propuestas.

Aunque la función del sueño no es clara, puede afirmarse que el sueño es modulado por la vigilia y las actividades ocurridas en ella [42,43]. Así, un nuevo aprendizaje incrementa la amplitud de las ondas lentas presentes en el sueño no REM, y las estructuras que generan este incremento son aquellas que se activan por la tarea aprendida durante la vigilia. Por ejemplo, una tarea visuomotora provoca un incremento en la actividad de

la corteza parietal durante el sueño de ondas lentas, incrementando la amplitud de éstas [44]. Además, una rata que durante la vigilia aprendió a evitar un choque eléctrico, cuando duerme presenta episodios de ondas lentas más largos que una rata que sólo estuvo en su jaula durante la vigilia [45]. Otros estudios indican que durante el sueño REM ocurre un reprocesamiento de la información adquirida durante la vigilia [46]: se ha observado que el patrón de actividad eléctrica de células del hipocampo de una rata que resuelve un laberinto circular durante la vigilia resulta similar al patrón de actividad que presentan las mismas células cuando la rata duerme en sueño REM [46]. De acuerdo con estos experimentos, las actividades realizadas durante la vigilia por el organismo se reflejan en su actividad cerebral presente en el sueño [39,40]. En este contexto suponemos que, al dormir, el cerebro reprocesa la información obtenida en la vigilia, tal vez para consolidarla o para categorizarla. Ello implicaría el fortalecimiento de sinapsis existentes y la activación de sinapsis silentes, e incluso la neoformación de sinapsis. El resultado global sería un cerebro despierto más apto para lidiar con las demandas del medio por la adecuada organización de sus circuitos neuronales.

## CONCLUSIONES

No creemos que la restauración de las neuronas sea el fin único del sueño porque ello significaría retornar las conexiones a su estado basal cada vez que se instala la fase del dormir; sería no aprender, no memorizar, regresar cada mañana a aprender lo aprendido el día anterior. Cada día despertaríamos sin recuerdos. Sin embargo, interpretamos que, al dormir, puede ocurrir la restauración de las neuronas, aunque está claro que dicha restauración también ocurre en la vigilia. El fin último del sueño es el funcionamiento óptimo del cerebro. Si no dormimos, nuestras habilidades cognitivas se verán alteradas al día siguiente, esto es, el mal funcionamiento del cerebro es el coste de la ausencia de descanso nocturno [1-4]. Lo que parece resultar de un período de sueño es la formación de la organización neuronal adecuada para ganarle la delantera al medio, con las sinapsis necesarias para que el sujeto pueda desplegar estrategias que prevean, por así decirlo, el futuro, garantizando su supervivencia. De forma sutil, el cerebro inconsciente del sueño es una pieza clave que afecta los procesos cognitivos que emprende el cerebro consciente de la vigilia. El sueño hace que no seamos los mismos a la mañana siguiente, sino por el contrario, diferentes y más aptos para la vida.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chee MWL, Choo CW. Functional imaging of working memory after 24 hours of total sleep deprivation. *J Neurosci* 2004; 24: 4560-7.
- Harrison Y, Horne JA. Sleep loss and temporal memory. *Q J Exp Psychol* 2000; 53: 271-9.
- Drummond SPA, Brown GG. The effects of total sleep deprivation on cerebral response to cognitive performance. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: S68-73.
- Drummond SPA, Brown GG, Guillin JC, Stricker JL, Wong EC, Buxton RB. Altered brain response to verbal learning following sleep deprivation. *Nature* 2000; 403: 655-7.
- Inoué S, Honda K, Komoda Y. Sleep as neuronal detoxification and restitution. *Behav Brain Res* 1995; 69: 91-6.
- Benington JH, Heller C. Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Progr Neurobiol* 1995; 45: 347-60.
- Akerstedt T, Nilsson PM. Sleep as restitution: an introduction. *J Intern Med* 2003; 254: 6-12.
- Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM. Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *NeuroReport* 2002; 13: 1387-90.
- Eiland MM, Ramanathan L, Gulyani S, Gilliland M, Bergmann BM, Rechtschaffen, et al. Increase in amino-cupric-silver staining of the supraoptic nucleus after sleep deprivation. *Brain Res* 2002; 945: 1-8.
- Astrobis J, Balter M, Battles J, Berger R, Bliwise D, Carskadon M, et al. Basics of sleep behavior. Los Angeles, CA: Sleep Research Society; 1993.
- Zeman A. Consciousness. *Brain* 2001; 124: 1263-89.
- Prospero-García O, Drucker-Colin R. Control neural del ciclo vigilia-sueño: mecanismos neurofisiológicos y neuroquímicos. Factores inductores del sueño. In Ramos-Platón, MJ, ed. Sueño y procesos cognitivos. Madrid: Síntesis; 1996. p. 131-60.
- Llinás R, Ribary U. Consciousness and the brain. The thalamocortical dialogue in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 929: 166-75.
- Barriga-Ibars C, Rodríguez-Moratinos AB, Esteban S, Rial RV. Interrelaciones entre el sueño y el sistema inmune. *Rev Neurol* 2005; 40: 548-56.
- Pedemonte M, Velluti RA, Del Cid-Pellitero E, Garzón-García M. El procesamiento sensorial podría estar organizado en el tiempo por ritmos cerebrales ultradianos. *Rev Neurol* 2005; 40: 166-72.
- Velluti RA, Pedemonte M. El sistema auditivo en el ciclo sueño-vigilia. *Rev Neurol* 2005; 41: 280-6.
- Maquet P, Degueldre C, Delfiore G, Aerts J, Péters JM, Luxen A, et al. Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. *J Neurosci* 1997; 17: 2807-12.
- Braun AR, Balkin TJ, Wesensten NJ, Carson MV, Baldwin P, Selbie S, et al. Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. *Brain* 1997; 120: 1173-97.
- Duncan J, Seitz RJ, Kolodny J, Bor D, Herzog H, Ahmed A, et al. A neural basis for general intelligence. *Science* 2000; 21: 456-60.
- Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 1989; 12: 13-21.
- Bergmann BM, Rechtschaffen A, Everson CA, Kushida CA, Fang VS, Leitch CA, et al. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and medication. *Sleep* 1989; 12: 31-41.
- Bergmann BM, Kushida CA, Rechtschaffen A, Everson CA, Gilliland MA, Obermeyer W, et al. Sleep deprivation in the rat: II. Methodology. *Sleep* 1989; 12: 5-12.
- Cowan MW. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci* 2000; 24: 551-600.
- Zigmond MJ, Blom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. Fundamental neuroscience. San Diego, CA: Academic Press; 1999.
- Edelman GM. Building a picture of the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 882: 68-89.
- Edelman GM. Naturalizing consciousness: a theoretical framework. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5520-4.
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 381-91.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 2001; 21: 4249-58.
- Takahashi P, Krueger JM. Nerve growth factor enhances sleep in rabbit. *Neurosci Lett* 1999; 264: 149-52.
- Kushikata T, Fang J, Krueger JM. Brain-derived neurotrophic factor enhances spontaneous sleep in rats and rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1999; 276: R1334-8.
- Kushikata T, Kubota T, Fang J, Krueger, JM. Neurotrophins 3 and 4 enhance non-rapid eye movement sleep in rabbits. *Neurosci Lett* 2003; 346: 161-4.
- Cirelli C, Tononi G. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J Neurosci* 2000; 20: 9187-94.
- Brandt J, Churchill L, Guan Z, Fang J, Chen L, Krueger JM. Sleep deprivation but not a whisker trim increases nerve growth factor within barrel cortical neurons. *Brain Res* 2001; 898: 105-12.
- Montes-Rodríguez CJ, Alavez S, Helder JH, Haro R, Morán J, Prospero-García O. Prolonged waking reduce human immunodeficiency virus glycoprotein 120- or tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in the cerebral cortex of rats. *Neurosci Lett* 2004; 360: 133-6.
- Prospero-García O, Méndez-Díaz M, Navarro L. Los endocannabinoides y el sueño. *Vigilia Sueño* 2001; 13: 177-86.
- Bova R, Micheli MR, Qualadrucci P, Zucconi GG. BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light-dark cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 57: 321-4.
- Dolci C, Montaruli A, Roveda E, Barajon I, Vizzotto L, Zucconi GG, et al. Circadian variations in expression of the trkB receptor in adult rat hippocampus. *Brain Res* 2003; 994: 67-72.
- Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Åkerman KEO, Stoilov P, Stamm S, et

- al. Regulation of trkB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated trkB isoforms. *J Biol Chem* 2002; 45: 43160-7.
39. Krueger JM, Obál F, Kapás L, Fang J. Brain organization and sleep function. *Behav Brain Res* 1995; 69: 177-85.
40. Tononi G, Cirelli C. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res Bull* 2003; 62: 143-50.
41. Crick F, Mitchison G. The function of dream sleep. *Nature* 1983; 302: 111-4.
42. Drucker-Colin R. The function of sleep is to regulate brain excitability in order to satisfy the requirements imposed by waking. *Behav Brain Res* 1995; 69: 117-24.
43. García-García F, Drucker-Colin R. Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Prog Neurobiol* 1999; 58: 297-314.
44. Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G. Local sleep and learning. *Nature* 2004; 430: 78-81.
45. Ambrosini MV, Sadile AG, Gironi-Carnevale UA, Mattiaccio M, Giuditta A. The sequential hypothesis on sleep function: I. Evidence that the structure of sleep depends on the nature of the previous waking experience. *Physiol Behav* 1988; 43: 325-37.
46. Louie K, Wilson MA. Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* 2001; 29: 145-56.

**DE LA RESTAURACIÓN NEURONAL A LA REORGANIZACIÓN DE LOS CIRCUITOS NEURONALES: UNA APROXIMACIÓN A LAS FUNCIONES DEL SUEÑO**

**Resumen.** *Objetivo.* Analizar datos y conceptos que se han generado en torno a una de las funciones propuestas para el sueño: la restauración neuronal. *Desarrollo.* El sueño es un estado de conciencia diferente de la vigilia. Los mamíferos invierten una buena parte de su vida en dormir; por ejemplo, los humanos dormimos una tercera parte de nuestra vida, pero ¿para qué invertir tanto tiempo en un estado donde perdemos contacto con el entorno?, ¿qué pasaría si no durmiéramos? La privación de sueño total altera procesos cognitivos, como la memoria o la atención; si esta privación se prolonga, el sujeto se deteriora y muere. Se ha propuesto que el sueño sirve para restaurar a los organismos del desgaste ocurrido durante la vigilia y, dado que los primeros efectos de la ausencia de sueño se observan en procesos que dependen directamente del cerebro, se ha sugerido que la restauración neuronal es su principal objetivo. En este trabajo se analizan algunos estudios sobre los efectos de la privación de sueño total en humanos y ratas, así como la relación entre el sueño y el sistema de las neurotrofinas, el cual promueve la supervivencia y la restauración neuronal. Finalmente, se discuten teorías recientes sobre la función del sueño. *Conclusiones.* La restauración de las neuronas no es el fin último del sueño, sino mantener y reorganizar los circuitos neuronales, incluyendo la neoformación de sinapsis, que permiten modificar redes neuronales existentes, por efecto de la experiencia, y todo esto para el adecuado funcionamiento del cerebro y su adaptación al ambiente. [REV NEUROL 2006; 43: 409-15]

**Palabras clave.** Función del sueño. Neurotrofinas. Privación de sueño. Restauración neuronal. Supervivencia neuronal.

**DA RESTAURAÇÃO NEUROLÓGICA À REORGANIZAÇÃO DOS CIRCUITOS NEUROLÓGICOS: UMA APROXIMAÇÃO ÀS FUNÇÕES DO SONO**

**Resumo.** *Objetivo.* Analisar dados e conceitos que têm sido gerados em torno de uma das funções propostas para o sono: a restauração neurológica. *Desenvolvimento.* O sono é um estado de consciência diferente da vigília. Os mamíferos passam uma boa parte da sua vida a dormir; por exemplo, nós humanos dormimos um terço da nossa vida, mas para quê passar tanto tempo num estado onde perdemos o contacto com o meio envolvente? O que aconteceria se não dormíssemos? A privação de sono total altera processos cognitivos, como a memória ou a atenção; se esta privação se prolongar, o indivíduo deteriora-se e morre. Tem sido proposto que o sono serve para restaurar os organismos do desgaste ocorrido durante a vigília e, dado que os primeiros efeitos da ausência de sono se observam em processos que dependem directamente do cérebro, foi sugerido que a restauração neurológica é o seu principal objetivo. Neste trabalho são analisados alguns estudos sobre os efeitos da privação de sono total em humanos e ratos, assim como a relação entre o sono e o sistema das neurotrofinas, o que promove a sobrevivência e a restauração neurológica. Finalmente, são discutidas teorias recentes sobre a função do sono. *Conclusões.* A restauração dos neurónios não é o último fim do sono, mas antes manter e reorganizar os circuitos neurológicos, incluindo a neoformação de sinapses, que permitem modificar redes neurológicas existentes, através do efeito da experiência, e tudo isto para o adequado funcionamento do cérebro e para a sua adaptação ao ambiente. [REV NEUROL 2006; 43: 409-15]

**Palavras chave.** Função do sono. Neurotrofinas. Privação de sono. Restauração neurológica. Supervivência neurológica.



ELSEVIER

Neuroscience Letters 360 (2004) 133–136

Neuroscience  
Letters

[www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)

## Prolonged waking reduces human immunodeficiency virus glycoprotein 120- or tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in the cerebral cortex of rats

Corinne J. Montes-Rodríguez<sup>a</sup>, Silvestre Alavez<sup>b,1</sup>, John H. Elder<sup>c</sup>, Reyes Haro<sup>a</sup>,  
Julio Morán<sup>b,\*</sup>, Oscar Prospéro-García<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

<sup>b</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

<sup>c</sup>Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

Received 21 October 2003; received in revised form 17 February 2004; accepted 20 February 2004

### Abstract

The human immunodeficiency virus (HIV) induces neuronal death, presumably by apoptosis. This effect may be triggered by the glycoprotein 120 (HIVgp120) released by HIV when infecting a cell, and mediated by tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), a pro-inflammatory cytokine. Both molecules, HIVgp120 and TNF $\alpha$ , increase sleep when administered acutely in the brain. On the other hand, sleep deprivation increases the levels of several growth factors. In this context, we challenged rats with HIVgp120 or TNF $\alpha$  simultaneously with sleep deprivation. Our results indicate that both HIVgp120 and TNF $\alpha$  increase neuronal death in the rat cerebral cortex, but not hippocampus, and that this effect is completely prevented by total deprivation of sleep. These results suggest that acute total deprivation of sleep protects against the HIVgp120 and TNF $\alpha$  deleterious effects.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Apoptosis; Cytokines; Human immunodeficiency virus; Neuroprotection; Neurotrophic factors; Total deprivation of sleep

It has been shown that the human immunodeficiency virus (HIV) invades the brain producing several deleterious effects, including neuronal death. This neuronal death is very likely contributing to the deterioration of cognitive and motor processes that are expressed as neuropsychiatric symptoms in these patients. The HIV mechanism that induces neuronal death remains unclear but it is possible that it occurs as a result of apoptosis [7,8].

The HIV invades microglia but not neurons. As a consequence of this invasion a number of immunological molecules, i.e. cytokines, are released in high amounts that become neurotoxic [7]. Moreover, the glycoprotein 120 (HIVgp120), released by the HIV during the invasive

process, seems to amplify this effect by triggering the release of immunological molecules, i.e. tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) [2,6,8]. This statement is based on extensive observations made in several laboratories using in vitro and in vivo models including freely moving animals. In all of these models, HIVgp120 has exhibited a potent neurotoxic action. The reported effects range from neuronal death in cell cultures to behavioral and electrophysiological abnormalities in freely moving rats [18].

The HIVgp120 mechanism of action is not totally clear but most observations involve an increase in Ca<sup>2+</sup> conductance and cytokines release. This observed Ca<sup>2+</sup> influx might be a consequence of NMDA receptor activation, as suggested by experiments showing that NMDA receptor blockers decrease HIVgp120-induced Ca<sup>2+</sup> influx. However, other possible mechanisms responsible for the increase in Ca<sup>2+</sup> conductance could also be involved [8,12].

On the other hand, one of the major effects of HIVgp120 on rat behavior is an increase of delta and rapid-eye-movement sleep after an acute administration [13], as well as a reduction

\* Corresponding author. Departamento de Neurociencias, Lab. BL-302, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-253, México 04510, D.F., México. Tel.: +52-55-5622-5616/5588; fax: +52-55-5622-5607.

E-mail address: [jmoran@ifc.unam.mx](mailto:jmoran@ifc.unam.mx) (J. Morán).

<sup>1</sup> This author contributed to the generation of the data with an effort equal to the first author.

of both sleep stages after a semi-chronic administration of the protein for 5 days [14]. These effects of HIVgp120 on sleep could be either a direct action of this molecule or an action mediated by TNF $\alpha$ . This assumption is in line with the notion that TNF $\alpha$  is related to sleep. For example, its administration, systemic or directly into the brain parenchyma, induces sleep [10]. Blockade of the TNF $\alpha$  receptors after total sleep deprivation prevents sleep rebound [17]. Some other reports indicate that TNF $\alpha$  undergoes fluctuations during sleep in humans, exhibiting a direct relationship with the expression of slow waves in the electroencephalogram of sleeping subjects [5]. TNF $\alpha$  is a molecule predominantly expressed by macrophages and T cells and its action is mediated via two cell surface receptors: TNFR1 and TNFR2. The former mediates cytotoxicity, whereas the latter mediates cell proliferation [19].

In addition, other molecules related to the regulation of cell survival and proliferation, such as the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neuronal growth factor (NGF), enhance sleep [11,16]. Recent findings by Krueger [3] and Cirelli [4] reported that the synthesis of these trophic factors is increased as a result of prolonged waking. In cultured cerebellar neurons, BDNF prevents the activation of caspase 3 and reduces neuronal death triggered by HIVgp120 [1].

In this context, the aim of this study was to challenge the brain with HIVgp120 or TNF $\alpha$  in animals under sleep deprivation in order to obtain evidence about a potential trophic activity taking place during prolonged waking.

Forty six adult (250–350 g) Wistar rats were used in this study. They were stereotactically implanted with a stainless steel cannula aimed at the right lateral ventricle (bregma: P = 0.8 mm, L = 1.5 mm, V = 3.8 mm). Rats were housed individually and maintained under constant temperature (23 °C), humidity (52%) and a controlled reverse light/dark cycle (lights went off at 9:00 am). Ten days after the surgery, 20 rats were used to characterize apoptotic death in a TNF $\alpha$  dose–response curve. These rats were divided into five groups ( $n = 4$ ) and received an intracerebroventricular (i.c.v.) microinjection of 5  $\mu$ l at a rate of 1  $\mu$ l/min, with the aid of a Kd Scientific pump, of either saline or TNF $\alpha$  at doses of 20, 40, 80, or 160 ng/ $\mu$ l. Twenty four hours after the saline or TNF $\alpha$  injection rats were anesthetized with pentobarbital and transcardially perfused with 200 ml of PBS (0.01 M) followed by 200 ml of paraformaldehyde (4%). Brains were removed, prepared for slicing (30  $\mu$ m) and processed for cresyl violet, TUNEL and Hoechst staining. Slices were analyzed under a fluorescence microscope. Both TUNEL-positive cells and condensed nuclei were considered as belonging to neurons undergoing apoptosis.

In the second part of the experiment, three groups of rats were used. Each group received an i.c.v. microinjection of 5  $\mu$ l of saline ( $n = 13$  rats), TNF $\alpha$  (800 ng/5  $\mu$ l,  $n = 10$ ), or HIVgp120 (140 ng/5  $\mu$ l,  $n = 11$ ). After treatment, seven rats from the saline group, five from the TNF $\alpha$  group, and

six from the HIVgp120 group were totally deprived of sleep for 24 h. Rats from all the groups were killed 24 h after the i.c.v. injection. Brains were removed and prepared for Hoechst and TUNEL staining. Stained slices were observed under a fluorescence microscope. Three areas of the brain were analyzed to evaluate potential apoptosis: the cerebral cortex, the hippocampus, and the dentate gyrus.

In sleep deprivation studies rats were maintained in their home cage and totally deprived of sleep by gentle manipulation. In brief, this method consists of constantly observing the rats, and if the researcher detected any sign of drowsiness, the rats were gently manipulated to awaken them. This procedure was followed for 24 h.

Statistical significance was obtained through two-way ANOVA and a post-hoc LSD test.

The thickness of the cellular layers of cerebral cortex and hippocampus was evaluated in slices stained with cresyl violet. This gross evaluation did not show clearly any potential massive cellular death in treated animals (data not shown). However, with Hoechst staining, the number of cells exhibiting nuclei with condensed chromatin detected in cerebral cortex was significantly increased when rats were treated with 160 ng/ $\mu$ l of TNF $\alpha$  (Fig. 1).

These results were similar to those found when DNA fragmentation (TUNEL) was evaluated (Fig. 2). Despite a marked tendency, HIVgp120 did not significantly increase the number of cells with nuclear condensed chromatin (Fig. 2A); however, this treatment significantly increased the number of cells with fragmented DNA (Fig. 2B). The observed increase in condensed and fragmented nuclei elicited by both TNF $\alpha$  and HIVgp120 was completely blocked in sleep deprived rats (Fig. 2A,B).

In the hippocampus, the results were different. TNF $\alpha$  did not modify the number of cells with condensed nuclei (Hoechst) or fragmented DNA (TUNEL) (data not shown). HIVgp120 showed a tendency to reduce the basal number of cells with condensed nuclei but not with fragmented DNA. Interestingly, sleep deprivation increased the number of cells with condensed nuclei but not fragmented chromatin in

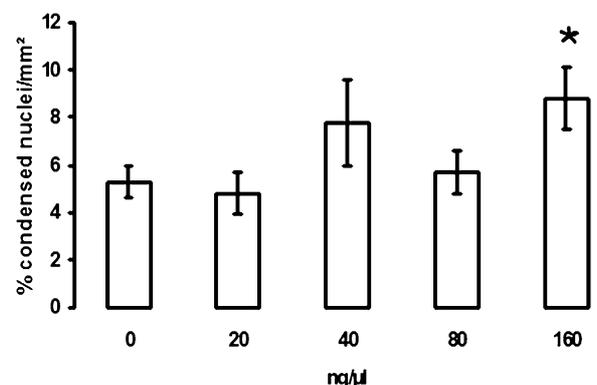


Fig. 1. Number of cells showing a nucleus with condensed chromatin in the cerebral cortex of rats associated with the administration of four doses of TNF $\alpha$ , suggesting an apoptosis process. The highest TNF $\alpha$  dose induced an increase in the number of these cells. \* $P < 0.05$ .

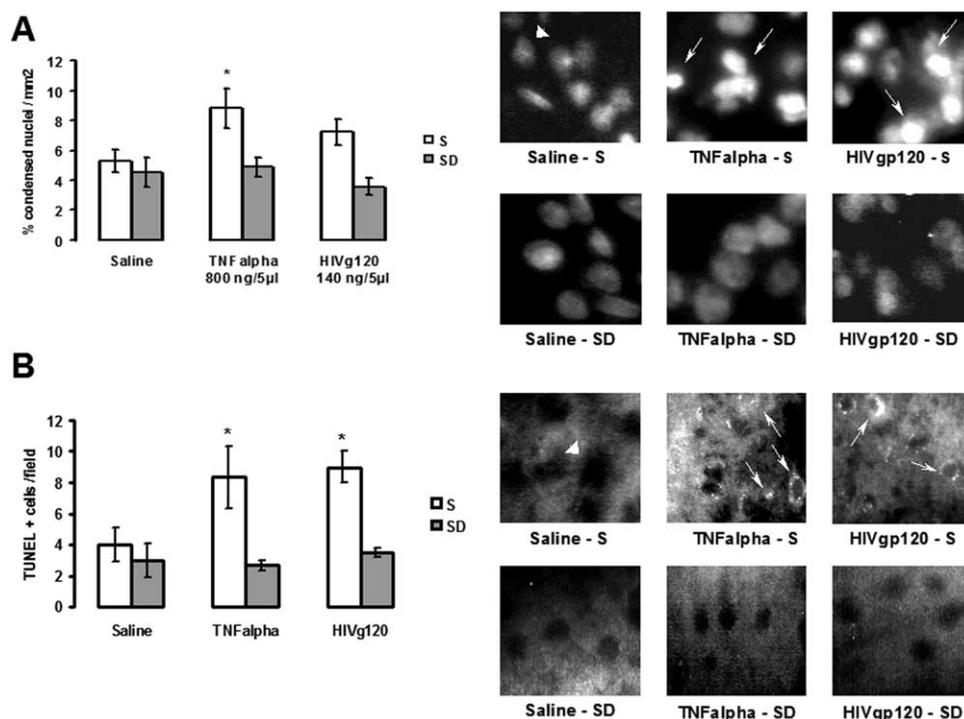


Fig. 2. Effect of TNF $\alpha$  on the number of cells showing nuclei with condensed (A) or fragmented (B) chromatin. Additionally, the protective effect of total sleep deprivation can be appreciated. (Top-right) Six pictures illustrating cells with condensed chromatin of non-sleep deprived (S) and sleep deprived (SD) animals. (Bottom-right) Six pictures depicting cells with fragmented chromatin in rats with non-sleep deprivation (S) and with sleep deprivation (SD). Arrows, condensed or fragmented nuclei. Arrowheads, intact nuclei. \* $P < 0.05$ , in (A): TNF $\alpha$  vs. the other groups but HIVgp120 S; in (B): TNF $\alpha$  S and HIVgp120 S vs. the other groups.

animals treated with TNF $\alpha$ , but not with HIVgp120. No significant changes were detected under any experimental condition in the dentate gyrus (data not shown).

In summary, both HIVgp120 and TNF $\alpha$  cause chromatin condensation and DNA fragmentation in neural cells from the cerebral cortex, as shown by other authors [1]. Although we are assuming that these nuclei belong to neurons, we can not discard that some of them may belong to glia. A noticeable finding of this work was that prolonged waking prevented the effect of both HIVgp120 and TNF $\alpha$  to induce apoptosis. Changes in the hippocampus and the dentate gyrus were less consistent with these findings.

The effect of sleep deprivation on the potency of HIVgp120 and TNF $\alpha$  to induce cell death may be due to an increase in the levels of anti-inflammatory cytokines, IL-4, IL-10, and IL-13. There is evidence indicating that anti-inflammatory cytokines are facilitators of waking [9]. However, to our knowledge it has not been shown yet that these cytokines are increased in the brain in association with sleep deprivation. Changes in the expression of TNF $\alpha$  receptors resulting from sleep deprivation have not been documented either. The only experimental evidence indicates that the soluble TNF $\alpha$ RI and TNF $\alpha$ RII do not change in the peripheral blood of humans after 24 h of total sleep deprivation [15]. If that were the case for rats, then the

reduction in the potency of TNF $\alpha$  due to a reduction of its receptor could be discarded.

An increase of trophic factors, such as NGF and BDNF, may also be involved in the observed effect of sleep deprivation. It has been shown that BDNF and NGF increase their expression during total deprivation of sleep suggesting also the release of these trophic factors under these conditions [3,4]. Based on this assumption, we suggest that the neurochemical consequences of prolonged waking that protect, at least transiently, against the neuronal insult caused by HIVgp120 or TNF $\alpha$  could be mediated by any of these trophic factors. Additionally, the fact that BDNF protects against the HIVgp120-induced neuronal death in vitro [1] strongly supports our results.

One additional noteworthy remark is that our results indicate that there is spontaneous neuronal death in the rat brain. However, since our control rats were not free of manipulation, this finding requires further confirmation.

#### Acknowledgements

This research was supported by grants IN207799 from DGAPA-UNAM to O.P.G. and 36235-N from CONACyT and IN203400 from DGAPA-UNAM to J.M.

## References

- [1] A. Bachis, E.O. Major, I. Mocchiatti, Brain-derived neurotrophic factor inhibits human immunodeficiency virus-1/gp120-mediated cerebellar granule cell death by preventing gp120 internalization, *J. Neurosci.* 23 (2003) 5715–5722.
- [2] O. Barak, I. Goshen, T. Ben-Hur, J. Weidenfeld, A.N. Taylor, R. Yirmiya, Involvement of brain cytokines in the neurobehavioral disturbances induced by HIV-1 glycoprotein120, *Brain Res.* 933 (2002) 98–108.
- [3] J. Brandt, L. Churchill, Z. Guan, J. Fang, L. Chen, J.M. Krueger, Sleep deprivation but not a whisker trim increase nerve growth factor within barrel cortical neurons, *Brain Res.* 898 (2001) 105–112.
- [4] C. Cirelli, G. Tononi, Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system, *J. Neurosci.* 20 (2000) 9187–9194.
- [5] D.F. Darko, J.C. Miller, C. Gallen, J. White, J. Koziol, S.J. Brown, R. Hayduk, J.H. Atkinson, J. Assmus, D.T. Munnell, P. Naitoh, J.A. McCutchan, M.M. Mitler, Sleep electroencephalogram delta-frequency amplitude, night plasma levels of tumor necrosis factor  $\alpha$ , and human immunodeficiency virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 12080–12084.
- [6] S.K. De, K. Devadas, A.L. Notkins, Elevated levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice: prevention of death by antibody to TNF- $\alpha$ , *J. Virol.* 76 (2002) 11710–11714.
- [7] S. Gartner, Y. Liu, Insights into the role of immune activation in HIV neuropathogenesis, *J. Neurovirol.* 8 (2002) 69–75.
- [8] M. Kaul, G.A. Garden, S.A. Lipton, Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia, *Nature* 410 (2001) 988–994.
- [9] J.M. Krueger, F. Obal Jr., J. Fang, T. Kubota, P. Taishi, The role of cytokines in physiological sleep regulation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933 (2001) 211–221.
- [10] T. Kubota, N. Li, Z. Guan, R.A. Brown, J.M. Krueger, Intrapreoptic microinjection of TNF-alpha enhances non-REM sleep in rats, *Brain Res.* 932 (2002) 37–44.
- [11] T. Kushikata, J. Fang, J.M. Krueger, Brain-derived neurotrophic factor enhances spontaneous sleep in rats and rabbits, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) R839–R845.
- [12] S.A. Lipton, Neuronal injury associated with HIV-1: approaches to treatment, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 159–175.
- [13] M. Opp, R.L. Peter, T.K. Hughes Jr., P. Cadet, S.K. Tying, E.M. Smith, Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120 alters sleep and induces cytokines mRNA expression in rats, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) R963–R970.
- [14] M. Sánchez-Alavez, J. Criado, M. Gómez-Chavarín, A. Jiménez-Anguiano, L. Navarro, O. Díaz-Ruiz, O. Galicia, F. Sánchez-Narváez, E. Murillo-Rodríguez, S.J. Henriksen, J.H. Elder, O. Prospéro-García, HIV- and FIV-derived gp120 alter spatial memory, LTP, and sleep in rats, *Neurobiol. Dis.* 7 (2000) 384–394.
- [15] W.T. Shearer, J.M. Reuben, J.M. Mullington, N.J. Princes, B.N. Lee, E.O. Smith, M.P. Szuba, H.P.A. Van Dongen, D.F. Dinges, Soluble TNF- $\alpha$  receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of space flight, *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 (2001) 165–170.
- [16] P. Takahashi, J.M. Krueger, Nerve growth factor enhances sleep in rabbit, *Neurosci. Lett.* 264 (1999) 149–152.
- [17] S. Takahashi, L. Kapás, J.M. Seyer, Y. Wang, J.M. Krueger, Inhibition of tumor necrosis factor attenuates physiological sleep in rabbits, *NeuroReport* 7 (1996) 642–646.
- [18] M. Tiziana Corasaniti, M. Maccarrone, R. Nistico, W. Malomi, D. Rotiroti, G. Bagetta, Exploitation of the HIV-1 coat glycoprotein, gp120, in neurodegenerative studies in vivo, *J. Neurochem.* 79 (2001) 1–8.
- [19] H.D. Venters, R. Dantzer, K.W. Kelley, A new concept in neurodegeneration: TNF $\alpha$  is a silencer of survival signals, *Trends Neurosci.* 23 (2000) 175–180.