



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACIÓN DEL
RECEPTOR SEROTONINÉRGICO
5-HT_{1A} EN EL INCREMENTO DE SUEÑO
MOR PRODUCTO DE ESTRÉS POR
INMOVILIZACIÓN

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ANGELA MARÍA PÁRAMO BRANDO

TUTOR PRINCIPAL: DR. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA

COMITÉ TUTOR: DRA. MÓNICA MENDEZ DÍAZ
DRA. MARIA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2010



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/515/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de agosto de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **PARAMO BRANDO ANGELA MARIA** con número de cuenta **509451875** con la tesis titulada "**Participación del receptor serotoninérgico 5-HT1a en el incremento de sueño MOR producto de estrés por inmovilización**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. JAVIER VELAZQUEZ MOCTEZUMA**:

Presidente: DRA. PILAR DURAN HERNANDEZ
Vocal: DRA. MONICA MENDEZ DIAZ
Secretario: DR. JAVIER VELAZQUEZ MOCTEZUMA
Suplente: DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DIAZ
Suplente: DRA. MARIA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.



Atentamente **DIVISION DE ESTUDIOS**
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU" **POSGRADO**
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de octubre de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

JNF/DCRV/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por haberme permitido ser su estudiante, formarme en sus aulas y bajo la dirección de sus docentes. Como también al personal administrativo y directivo que siempre estuvo dispuesto a brindarme su apoyo y orientación.

Agradezco el apoyo económico recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, ya que sin este habría sido casi imposible el logro de esta meta.

A su vez, agradezco profundamente el apoyo, guía, escucha y orientación recibidos de mi tutor principal, el Dr. Javier Velázquez Moctezuma y mi comité tutor, la Dra. Mónica Méndez Díaz y la Dra. Luz Navarro Angulo.

TABLA DE CONTENIDO

	PAG
I. RESUMEN	8
II. ABSTRAC	9
III.INTRODUCCIÓN	10
IV. ANTECEDENTES	10
1. RESEÑA DE LA HISTORIA DE LA INVESTIGACIÓN DEL SUEÑO	10
2. SUEÑO Y VIGILIA	15
2.1. EL CICLO DE SUEÑO-VIGILIA Y SUS MECANISMOS NEUROFISIOLÓGICOS	15
2.2. ETAPAS DEL CICLO SUEÑO – VIGILIA	17
2.3. CONTROL NEURAL DEL SUEÑO MOR	21
3. UNA MIRADA A LA SEROTONINA	27
3.1 SEROTONINA Y SU ACCION EN EL SUEÑO	30
3.2. ACCIÓN DEL RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT1A EN EL SUEÑO MOR	33
4. EL ESTRÉS MODIFICA LA ARQUITECTURA DEL SUEÑO	39
4.1 ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN Y SUEÑO MOR	40
4.2 ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN, SEROTONINA Y SUEÑO MOR	43
4.3. VIAS DE NEUROTRASMISIÓN IMPLICADAS EN EL INCREMENTO DE SUEÑO MOR PRODUCTO DE ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN	46

V. JUSTIFICACIÓN	48
VI. HIPOTESIS	48
VII. OBJETIVOS	49
1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	49
VIII. MATERIALES Y METODOS	49
1. ANIMALES	49
2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA EL IMPLANTE DE ELECTRODOS	50
3. FÁRMACO Y TRATAMIENTOS	51
4. REGISTRO Y ANALISIS DE RESULTADOS	52
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
IX. RESULTADOS	53
X. DISCUSIÓN	58
XI. CONCLUSIONES	62
XII. REFERENCIAS	63

I. RESUMEN

Diversos estudios han demostrado que el estrés por inmovilización es el paradigma de estrés que mayores alteraciones produce en la arquitectura del sueño en animales de experimentación, generando un aumento significativo en la fase de movimientos oculares rápidos (MOR) y disminución en la latencia de sueño y de sueño MOR.

Se ha estudiado la participación de diversas vías de neurotransmisión en la repuesta al estrés por inmovilización en el sueño, pero se desconocía la participación del receptor a serotonina 5-HT_{1A} en la alteración de la arquitectura del sueño producto del estrés. En este estudio evaluamos la participación de este receptor en el incremento de sueño MOR producto de estrés por inmovilización, mediante su estimulación con el fármaco agonista selectivo 8-hydroxy-2-(n-dipropylamino)tetralin (8-OH-DPAT), en ratas Wistar machos. Se realizaron cinco tratamientos: controles intactos, 2 horas de inmovilización, 2 horas de inmovilización y suministro subcutáneo de vehículo, suministro subcutáneo de fármaco y suministro subcutáneo del fármaco seguido de 2 horas de inmovilización. Posteriormente se sometió a los animales a 8 horas continuas de registro polisomnográfico del ciclo sueño – vigilia, seguido de su correspondiente calificación y análisis de resultados. Para el análisis estadístico del porcentaje promedio de cada una de las etapas del ciclo-sueño vigilia y el promedio de tiempo de latencia a sueño de ondas lentas y a sueño MOR se realizó un análisis de Varianza ANOVA seguido por la prueba *post-hoc* LSD.

Como resultado obtuvimos que la estimulación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} luego de someter al animal a estrés por inmovilización, anula el efecto del estrés en la arquitectura del sueño, inhibiendo el incremento de sueño MOR y aumentando la latencia a sueño de ondas lentas y a sueño MOR. Estos resultados indican que el receptor 5-HT_{1A} participa en la alteración de la arquitectura de sueño como respuesta al estrés por inmovilización.

II. ABSTRACT

Several studies have shown that restraint stress is stress paradigm that produced greater alterations in sleep architecture in experimental animals, resulting in a significant increase in the phase of rapid eye movement (REM) sleep and decreased slow wave sleep latency and REM sleep latency.

Several studies have shown the involvement of various neurotransmitter pathways in the response to restraint stress on sleep, but it was not the involvement of serotonin receptor 5-HT_{1A} in the alteration of sleep architecture product of stress. In this study we evaluated the involvement of this receptor in the increase of REM sleep restraint stress product, by stimulation with the selective agonist drug 8-hydroxy-2-(n-dipropylamino) tetralin (8-OH-DPAT) in male Wistar rats. There were five treatments: intact controls, 2 hours of restraint, 2 hours of restraint and subcutaneous delivery vehicles, subcutaneous drug delivery and subcutaneous drug delivery followed by 2 hours of immobilization. Subsequently subjected the animals to 8 hours of continuous polysomnographic recording of sleep - wake cycle, followed by a corresponding rating and analysis of results. For statistical analysis, the average percentage of each of the stages of sleep-wake cycle and the average latency to slow wave sleep and REM sleep was applied an analysis of variance ANOVA followed by post-hoc LSD test.

As a result we obtained that stimulation of serotonin 5-HT_{1A} receptor after subjecting the animal to immobilization, void the effect of stress on sleep architecture, inhibiting the increase of REM sleep, and increased the latency of slow wave sleep and sleep MOR. These results indicate that 5-HT_{1A} receptor is involved in the alteration of sleep architecture in response to restraint stress.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

1. RESEÑA DE LA HISTORIA DE LA INVESTIGACIÓN DEL SUEÑO

Antiguamente la mitología griega, atribuía el sueño a *Hipnos*, hijo de la diosa de la noche *Nyx* y hermano gemelo de *Tanatos* (dios de la muerte). *Hipnos* se encargaba de inducir el sueño, proceso que ya se consideraba como reversible, mientras que *Tanatos* inducía el sueño eterno el cual era irreversible. Así para los grecorromanos, el sueño es hermano gemelo de la muerte (Pérez R, Salín R, Valencia M, Castorena A, 2009).

Para Aristóteles, la remoción de la sensopercepción es un proceso necesario para el inicio del sueño y la ingestión de los alimentos es un factor clave en la regulación del inicio del sueño, él mencionaba que al comer la esencia que emana de los alimentos, asciende por las venas y es impulsada por el corazón para calentar el cerebro, esto lo mencionó en su libro *Parva Naturalia* (Pérez R, Salín R, Valencia M, Castorena A. 2009).

Hasta comienzos del siglo XX se consideraba el sueño como un fenómeno generado por la reducción de la actividad cerebral e inducido por un estado de fatiga. En ese entonces, los científicos que investigaban el sueño pensaban que la vigilia era un estado mantenido por la estimulación sensorial constante y que por lo tanto, se conciliaba el sueño cuando al sentir fatiga, la estimulación sensorial disminuía (Kandel 2000).

Para este momento, las dos corrientes que imperaban en el campo científico del sueño, postulaban dos hipótesis, por un lado que este consistía en un proceso de deaferentación sensorial que daba explicación al sueño como un proceso pasivo y, por otro, que el sueño era un proceso activo coordinado por diferentes centros neurales (Pérez R, Salín R, Valencia M, Castorena A. 2009).

En 1929 Hans Berger en Alemania, registra la actividad eléctrica cerebral en humanos mediante electrodos colocados sobre el cuero cabelludo, descubre el ritmo alfa (actividad de 8 -12 cps rápida y de bajo voltaje). También observó que el ritmo electroencefalografico que se presentaba durante el sueño era diferente al de la vigilia.

Berger basó sus observaciones en las efectuadas por Richard Caton y Adolf Beck a finales del siglo XIX, quienes realizaron los primeros registros de la actividad eléctrica cerebral en distintas especies de animales, reconociendo diferentes oscilaciones eléctricas rítmicas durante la vigilia y el sueño.

Fue así como en 1930, Von Economo psiquiatra y neurólogo, estudió los cerebros de pacientes que murieron por encefalitis letárgica, enfermedad ocasionada por una epidemia conocida como la influenza española, que llevó a la muerte de millones de personas en el continente europeo durante los años finales de la primera guerra mundial. En esta enfermedad las personas contagiadas, entraban en estado de coma y terminaban muriendo ó en algunos casos, aquellos que sobrevivían presentaban un estado de rigidez similar a la que se presenta en la enfermedad de Parkinson. Durante su transcurso, los pacientes reportaban somnolencia o insomnio excesivo (Siegel J. 2002).

Mediante técnicas de tinción histológica, Von Economo descubrió una gran pérdida de neuronas en el hipotálamo posterior y en la formación reticular mesencefálica en los pacientes que habían reportado somnolencia excesiva. A su vez, estudió el cerebro de pacientes que presentaron insomnio o dificultad para dormir. En estos cerebros se presentaba una pérdida de neuronas del hipotálamo anterior y del área preóptica. De este modo concluyó que el hipotálamo posterior y el mesencefalo parecen ser necesarios para la vigilia y el hipotálamo anterior y el área preóptica, necesarias para la generación del sueño (Fig 1.1). Estos hallazgos fueron la primera evidencia de áreas cerebrales específicas responsables del sueño y la vigilia.

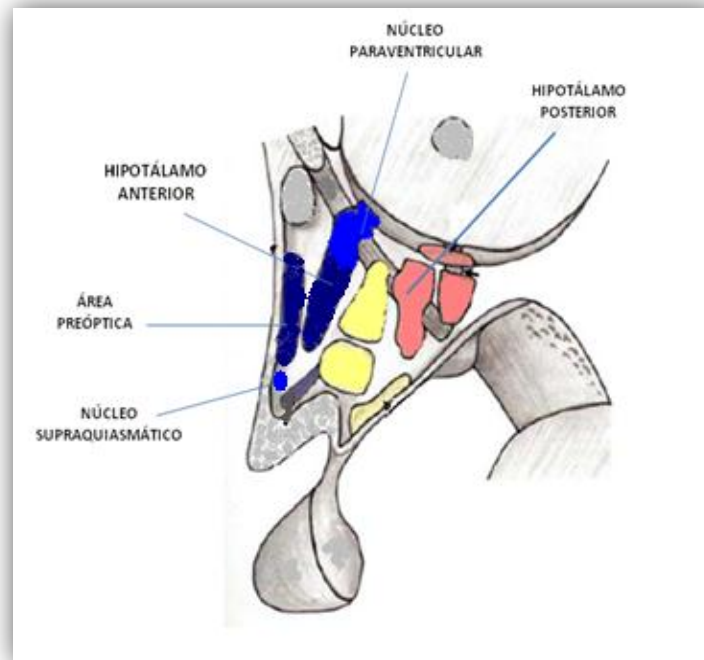


FIG 1.1. Ilustración del hipotálamo y algunos de sus núcleos que participan en el ciclo sueño-vigilia como lo mencionó Von Economo en los años 30s. Imagen tomada y modificada de Ojeda y Ricardo 2004.

En 1935 y 1936, Frederick Bremer desarrolló dos procedimientos quirúrgicos en gatos. El primero de estos consistió en aislar la cabeza y el cerebro del resto del cuerpo, realizando un corte a nivel de la vértebra cervical C1 o C2; esta preparación tuvo el nombre de Encéfalo aislado. Luego de la cirugía, Bremer realizó registros encefalográficos del ciclo sueño-vigilia en estos animales, demostrando que el animal presentaba un ciclo normal. A partir de esto concluyó que los mecanismos neurales responsables del sueño y la vigilia, no requerían de la participación de la médula espinal (Siegel J. 2002).

El segundo procedimiento quirúrgico, consistió en realizar un corte del neuroeje a nivel del mesencéfalo rostral, separando al telencéfalo y al diencéfalo del tallo cerebral; este procedimiento fue llamado Cerebro aislado. Ambos cortes se observan en la figura 1.2.

Bremer observó que la actividad eléctrica cerebral luego de esta cirugía, presentaba un estado de sueño constante. El concluyó que todos los nervios sensitivos, a excepción de la vista y el olfato, se encontraban atrás del corte y no tenían acceso al tálamo o a la corteza cerebral; por lo tanto el estado de alerta o de vigilia requiere de la estimulación

sensorial y que el sueño es producido y mantenido por una suspensión de las entradas sensoriales hacia el diencefalo y la corteza cerebral (Siegel 2002).

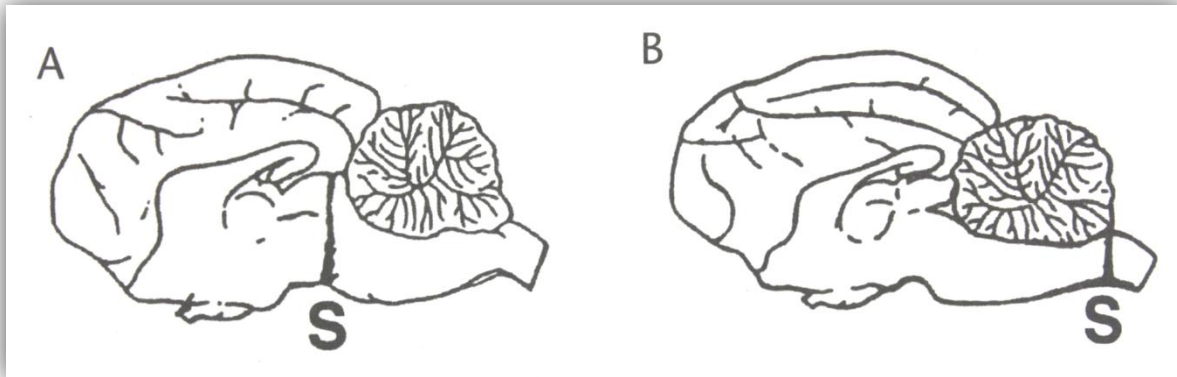


FIGURA 1.2. Representación de las dos preparaciones de Bremer en un corte sagital de cerebro de gato: A) Muestra el corte a nivel del mesencéfalo característica de la preparación de cerebro aislado (Cerveau isolé), B) Muestra el corte a través de la médula espinal representando la preparación de del encéfalo aislado (encéphale isolé). (tomado de Siegel 2002)

En la misma época, Walter Hess en Zurich, encontró que la estimulación eléctrica del III ventrículo y del haz del núcleo solitario en el IV ventrículo, inducían sueño. Al cabo de un rato, los animales despertaban normalmente (Pérez R, Salín R, Valencia M, Castorena A. 2009).

Años más tarde en 1949, Horace Magoun y Giuseppe Moruzzi siguiendo el procedimiento quirúrgico de *encéfalo aislado* desarrollado por Bremer, estimularon en gatos, el pedúnculo cerebeloso superior que se encuentra ubicado entre los dos planos de corte de ambos procedimientos seguidos por Bremer. Las fibras del pedúnculo cerebeloso superior tienen conexiones con células del mesencéfalo y la formación reticular póntina. Durante su experimento, descubrieron que al estimular eléctricamente esta región cuando el EEG mostraba un ritmo sincronizado (es decir, actividad propia del sueño), inmediatamente la actividad EEG cambiaba a un ritmo desincronizado presentando ondas de mayor frecuencia y menor amplitud (es decir, actividad propia de la vigilia), patrón de activación que fue evidente en toda la corteza cerebral (fig 1.3). De este modo descubrieron la existencia de un sistema reticular ascendente (SRAA) que activa la corteza cerebral y ejerce un control preciso sobre la generación del estado de alerta (Siegel J. 2002).

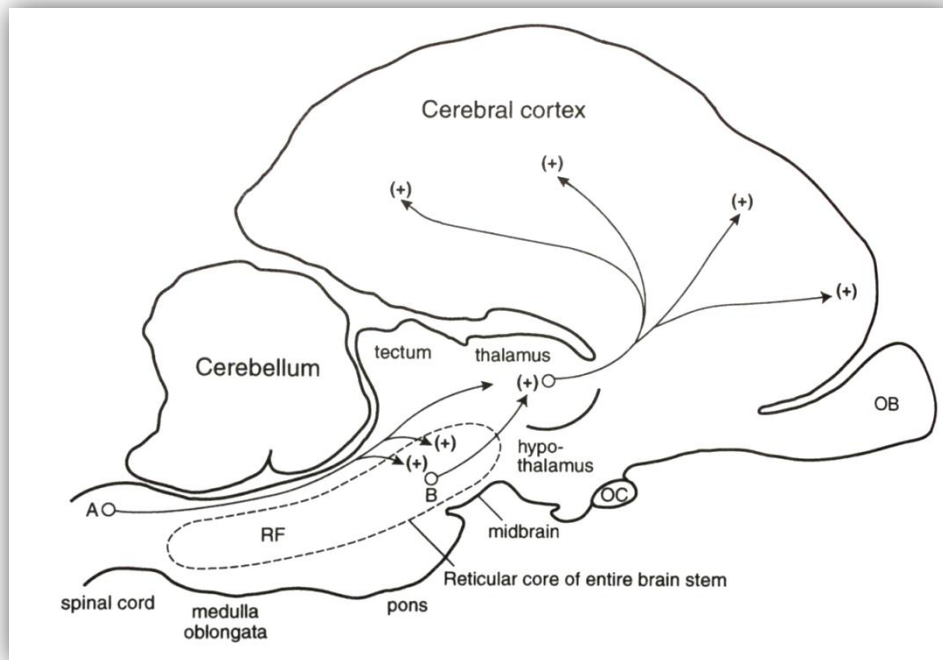


FIGURA 1.3. Vista sagital del cerebro de gato que muestra la formación reticular a través de todo el tallo cerebral y una representación de las vías ascendentes sensitivas (A) al tálamo. También representa la vía de excitación a las células de la formación reticular y la formación retículo talámica (B) y las vías de activación tálamo corticales. La acetilcolina a nivel de la formación reticular mesencefálica, activa al tálamo y al hipotálamo anterior y a la corteza cerebral. Abreviaciones: OB, bulbo olfatorio; OC, quiasma óptico; RF, formación reticular. (tomado de Siegel J. 2002).

En 1953 Eugene Aserinsky bajo la tutoría de Nataniel Kleitman, describen los movimientos oculares rápidos característicos del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR ó Rapid Eye Movements conocido en inglés como REM), mediante un registro de sueño y vigilia que realizó Aserinsky en uno de sus hijos pequeños. Al mantener los electrodos que se encargaban de registrar los movimientos de los ojos colocados en la piel del niño, observó que los movimientos lentos de los ojos al inicio del sueño, de repente cambiaban haciéndose rápidos, coincidiendo con la reducción del movimiento corporal. Estos datos concordaron con los encontrados en registros que más adelante realizaron en sujetos adultos. Su hallazgo se publicó en la revista Science en ese mismo año (Pérez R, Salín R, Valencia M, Castorena A 2009, Siegel J. 2002).

En 1957 Kleitman junto con uno de sus estudiantes William Dement, publican un artículo donde detallan la relación entre la etapa de movimientos oculares rápidos y las ensueños. Su proyecto consistió en despertar a los voluntarios durante varios

periodos de sueño (determinados bajo registro de sueño y vigilia mediante electrodos superficiales) y preguntarles si habían soñado, determinando que era en la etapa de movimientos oculares donde los voluntarios reportaban que habían tenido ensoñaciones (Siegel, J. 2002). A continuación en 1958, Michael Jouvet y Nataniel Kleitman describieron la atonía muscular en el sueño MOR utilizando un electromiograma (Pérez R, Salín R, Valencia M, Castorena A 2009), acto que hasta la fecha no se había realizado.

2. SUEÑO Y VIGILIA

2.1. EL CICLO DE SUEÑO-VIGILIA Y SUS MECANISMOS NEUROFISIOLÓGICOS

Michael Jouvet en 1964, definió el sueño como, “la disminución natural, periódica y reversible de la percepción del medio externo, conservando cierto grado de reactividad y de las funciones autónomas”. En esta definición al mencionar que el sueño es un estado reversible, lo diferencia del estado de coma que en muchos casos llega a ser irreversible.

A su vez, el ciclo del sueño y la vigilia completa el dominio de la actividad cerebral; el control de las fluctuaciones de cada una de las etapas de este ciclo, va a depender de la modulación del tálamo y la corteza por el tronco encefálico (Culebras, A. 1996). Este circuito tálamocortical que modula la función cerebral a lo largo de la serie continua de sueño profundo hasta alerta máxima, está compuesto principalmente por los núcleos colinérgicos de la formación pontina como el núcleo Latero Dorsal Tegmental (LDT) y el núcleo Pontino Pedunculo Tegmental (PPT), las células noradrérgicas del *Locus coeruleus* (LC) en la protuberancia y los núcleos serotoninérgicos del Rafe. Estos núcleos tienen proyecciones a la corteza y al tálamo (Fig 2.1), donde van a generar efectos directos e indirectos sobre la función cortical (Jimenez A, Velázquez J, 2010).

Del mismo modo, estos neurotransmisores tienen una participación activa en la vigilia y deben estar inhibidos durante el sueño, especialmente durante la fase de sueño MOR, donde a las neuronas que los sintetizan se les ha dado el nombre de REM-off puesto que se encuentran apagadas durante el sueño MOR.

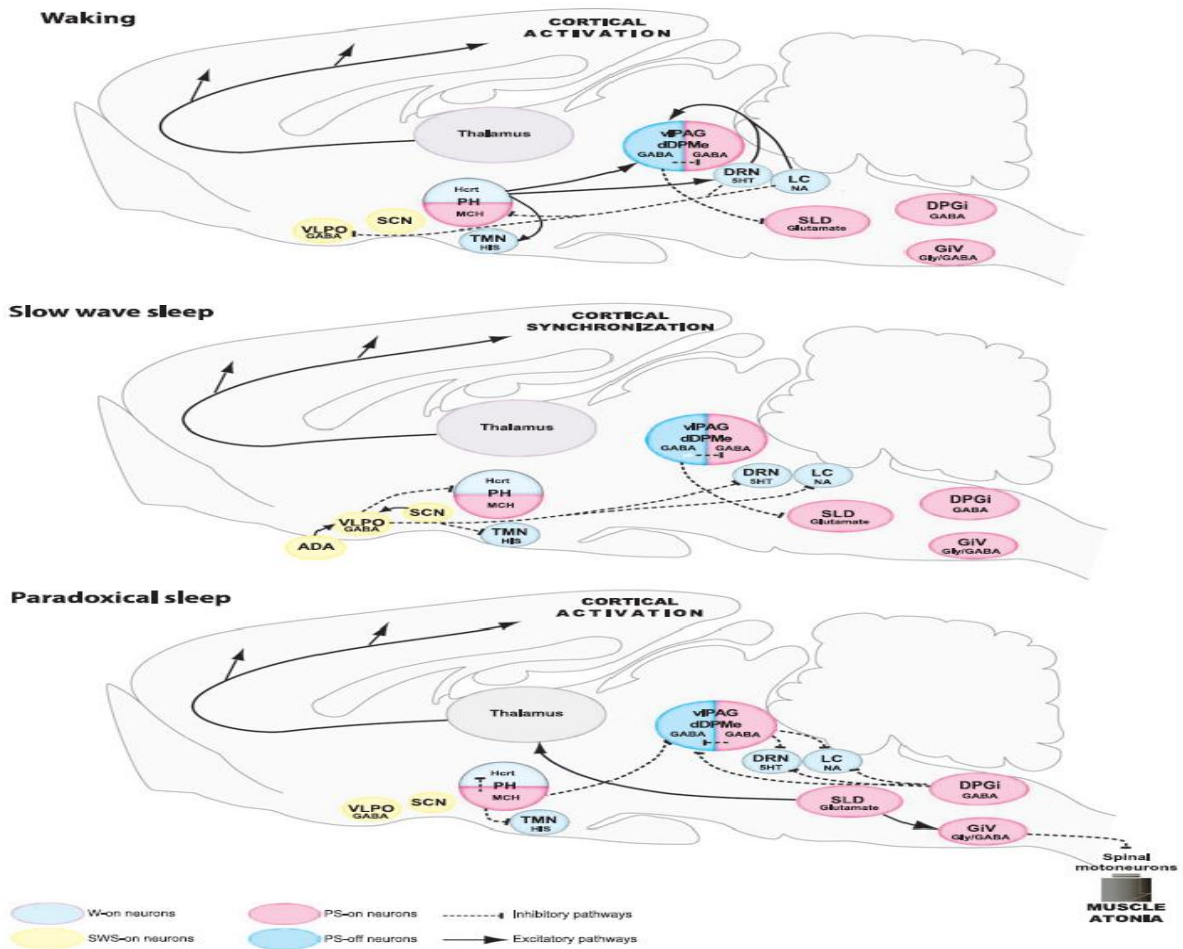


Figura 2.1. Se observa el modelo de rata las redes neurales responsables de la vigilia (Waking), el sueño de ondas lentas (slow wave sleep) y el sueño MOR (paradoxical sleep). Abreviaturas: ADA, adenosina; DPGi, núcleo reticular paragigantocelular; dDPMe, núcleo reticular mesencefálico profundo; DRN, núcleo rafe dorsal; GiV, núcleo reticular gigantocelular ventral; Gly, glicina; Hort, neuronas que sintetizan orexinas; HIS, histamina; LC, Locus coeruleus; MCH, neuronas que sintetizan MCH; PH, hipotálamo posterior; SCN, núcleo supraquiasmático; SLD, núcleo sublaterodorsal; TMN, núcleo tuberomamilar; VIPAG, periacueductal ventrolateral gris; VLPO, núcleo preóptico ventrolateral. Cortical Activation, activación cortical; Cortical Synchronization sincronización cortical; Spinal motoneurons, motoneuronas de la médula espinal; Muscle atonía, atonía muscular; W-on neurons, neuronas que se encuentran activas durante la vigilia; SWS-on neurons, neuronas que se encuentran activas durante el sueño de ondas lentas; PS-on neurons, neuronas que están activas durante el sueño MOR; PS-off neurons, neuronas que están inactivas durante el sueño MOR; inhibitory pathways, vías inhibitorias; Excitatory pathways, vías excitatorias. Imagen tomada de, Fort. P y cols, 2009.

Para el inicio y mantenimiento del sueño, en especial del sueño de no movimientos oculares rápidos (No MOR), que definiré más adelante, se ha propuesto la participación de algunos neurotransmisores como la adenosina, el GABA y diferentes neuropéptidos.

Como también se ha propuesto la participación de diversas estructuras neuroanatómicas como son: el hipotálamo anterior y el área preóptica ventro lateral (VLPO), la cual inhibe los núcleos mencionados anteriormente, encargados del mantenimiento de la vigilia; los núcleos del Rafe del tallo cerebral debido a que la serotonina sintetizada en estos núcleos disminuye las aferencias sensoriales e inhibe la actividad motora, promoviendo la aparición de las ondas lentas en la actividad eléctrica cortical; también participan, el núcleo del tracto solitario de la médula, el núcleo reticular del tálamo, los núcleos basales y la corteza orbitofrontal (Culebras A, 1996).

2.2. ETAPAS DEL CICLO SUEÑO – VIGILIA

El ciclo sueño-vigilia consiste en la alternancia de tres estados de vigilancia: despierto, sueño sin movimientos oculares rápidos (NMOR) y sueño con movimientos oculares rápidos (MOR). El patrón neurofisiológico y conductual difiere de tal modo en cada uno de estos estados que podríamos considerar que es como si tuviésemos 3 cerebros, uno que está despierto, otro que duerme y otro que sueña. Esta alternancia ocurre cada 24 horas, por lo tanto podemos decir que el ciclo de sueño-vigilia tiene un patrón circadiano (ciclo de 24 horas).

La actividad eléctrica cerebral de la vigilia tanto en humanos como en modelos animales (rata y gato), es caracterizada por la presencia en el registro polisomnográfico de ondas beta, es decir que tiene un voltaje entre 5-10 μV y una frecuencia de 20-40 Hz. En el humano se observa que al pasar de la vigilia atenta al reposo con los ojos cerrados, cambia la actividad eléctrica cerebral a una frecuencia de 8-12 Hz, conocido como ritmo alfa. La actividad del estado de alerta y de vigilia en reposo se observa en la figura 2.2.

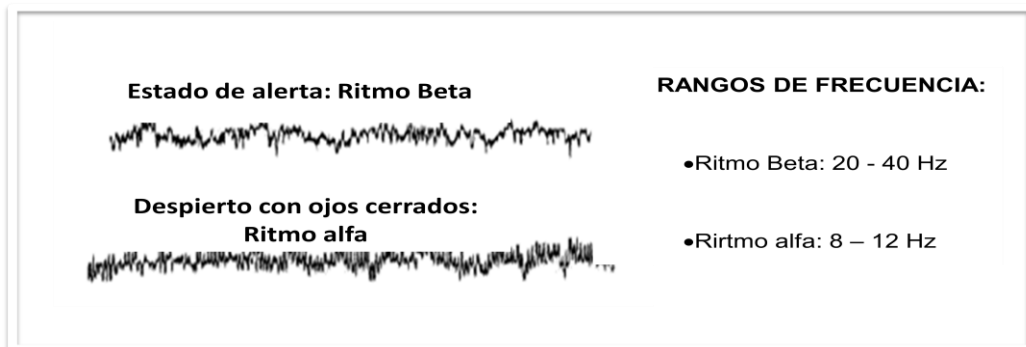


FIGURA 2.2. Actividad EEG durante la vigilia, (Tomada de Siegel J, 2002).

El sueño se divide en dos etapas fundamentales: en el humano se divide en sueño de no movimientos oculares rápidos o NMOR y sueño de movimientos oculares rápidos o sueño MOR. En modelos animales se divide en sueño de ondas lentas (SOL) y sueño MOR. Durante el sueño, las fases NMOR (SOL en modelos animales), MOR y vigilia alternan cíclicamente durante las horas continuas del ciclo sueño-vigilia.

A su vez, en humanos el sueño NMOR se ha dividido en 3 etapas según su patrón electroencefalográfico (EEG), el cual se describe a continuación y se observa en la figura 2.3 y 2.4:

- NMOR1: Este estado es considerado como la transición de la vigilia hacia el sueño. Durante esta fase la actividad se caracteriza por un ritmo más lento que el de la vigilia y de baja amplitud, llamado ritmo theta de 4-7Hz, mezclada con ritmo beta 20-40Hz. Los grafoelementos que se presentan en esta fase son las ondas agudas del vertex en la actividad EEG y cierta actividad muscular.

El ritmo theta es actividad generada en el hipocampo, mientras el ritmo beta es producido por la corteza cerebral.

- NMOR2: En esta etapa del sueño el EEG presenta “disparos” de 12-14 Hz de frecuencia y una duración de 0.5-1.5 seg llamados “husos del sueño” por ser un grafoelemento cuya forma es similar a la de un huso. También en el EEG se presentan ondas con un mayor voltaje bifásico llamados complejos K.
- NMOR3 o sueño de ondas lentas: La actividad del EEG cambia a un ritmo delta con ondas de mayor amplitud alrededor de 70 a 90 μ V y con frecuencia de 0.5-3.0Hz. Esta actividad también es conocida como sueño sincronizado, debido a que la actividad del EEG muestra un patrón sincrónico a diferencia del que se manifiesta en los otros estados.

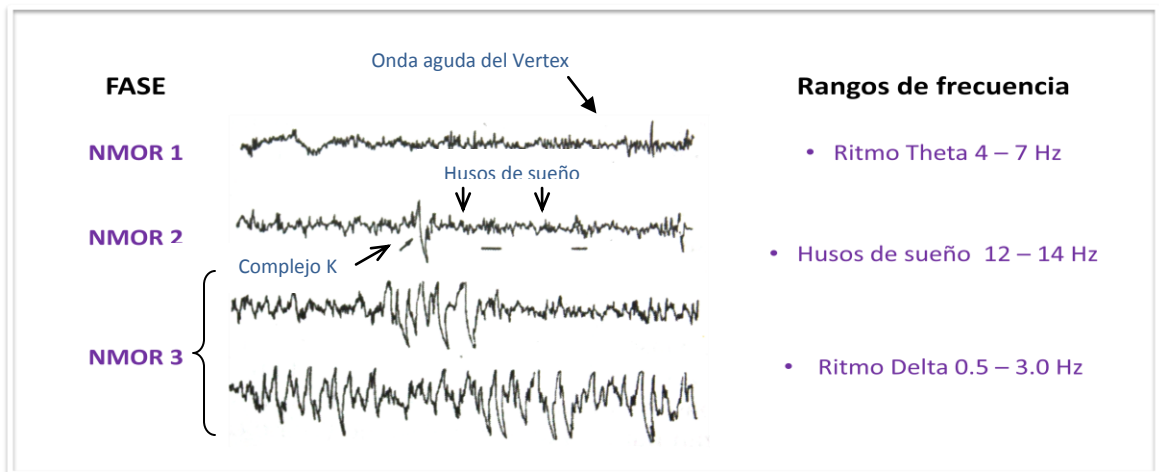


FIGURA 2.3. Actividad EEG durante cada una de las fases del sueño NMOR. (Salin- Pascual R, 2010)

En estas etapas la actividad neuronal disminuye, desciende la temperatura cerebral y corporal, la frecuencia cardíaca y la presión arterial. La actividad respiratoria varía en cada una de estas etapas, durante las etapas 1 y 2 del sueño No MOR provocan un ritmo respiratorio inestable con sucesivas hipoventilaciones e hiperventilaciones denominadas “ventilación periódica”. En la etapas 3, la ventilación se vuelve regular, de mayor amplitud y menor frecuencia respiratoria, y se produce un leve descenso del volumen por minuto (Velázquez J, Teran G, 2010).

El sueño MOR, es también conocido como sueño desincronizado o paradójico por su similitud en el patrón EEG con el de la vigilia. Se caracteriza por una constelación de fenómenos aparentemente no relacionados, originados en el tallo cerebral y en estructuras del cerebro medio (lo cual se detallará en el capítulo siguiente), como lo son: Desincronización de la actividad eléctrica cortical, atonía muscular, Espigas PGO (Ponto genículo occipitales) las cuales son generadas por disparos neuronales que se presentan de manera más intensa que durante la vigilia, movimientos oculares rápidos, mioclonías, fluctuaciones cardiorrespiratorias, generación de ensoñaciones, pupilas contraídas, suspensión de la termorregulación, entre otros. En humanos, el sueño MOR tiene una fase tónica y otra fásica, la primera incluye las espigas PGO, movimientos oculares rápidos e irregularidad cardiorrespiratoria, atonía muscular y la segunda se caracteriza por no presentar movimientos oculares rápidos (Culebras A, 1996). En el humano patrón EEG del sueño MOR, se caracteriza por presentar frecuencias mixtas (ritmo theta, beta, alfa y complejos K), y ondas en “diente de sierra”, las cuales se asemejan a las del ritmo theta solo que más agudas. En el modelo de rata el patrón EEG característico de esta fase del sueño es el ritmo theta.

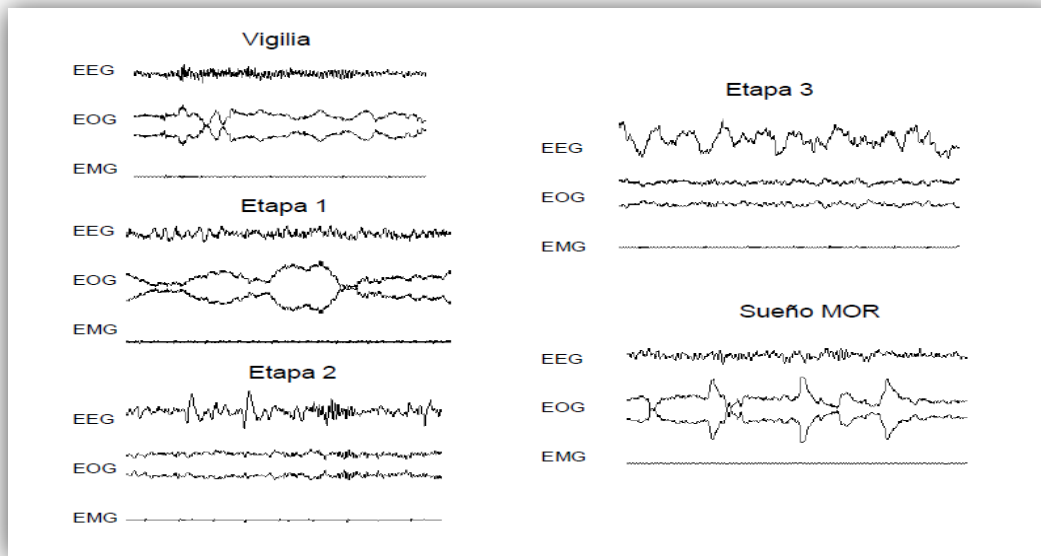


FIGURA 2.4. Descripción de las diferentes etapas del ciclo sueño – vigilia en humanos (Tomada De Velázquez J, Terán G, 2010)

La desincronización eléctrica cortical se produce como resultado de la activación de las neuronas de la formación reticular del cerebro medio. De igual manera, el ritmo hipocampal caracterizado por una mayor sincronización de la actividad eléctrica (Ritmo theta), se presenta durante todo el estado de sueño MOR. En modelos animales, estudios con electrodos de profundidad han demostrado esta actividad es generada en las células piramidales de CA1 en el giro dentado y en el córtex medial entorhinal del hipocampo (Culebras A, 1996).

El ciclo sueño y vigilia en el modelo de rata, se divide en vigilia; sueño de ondas lentas I (o sueño ligero), que se caracteriza por presentar un patrón EEG de ondas de mayor voltaje y menor frecuencia (ondas lentas) de menos del 50% de la época; sueño de ondas lentas II (sueño profundo), caracterizado por presentar un patrón EEG de ondas lentas del 50% o más de la época y sueño MOR (Takeuchi E, 1970), lo cual se observa en la figura 2.5.

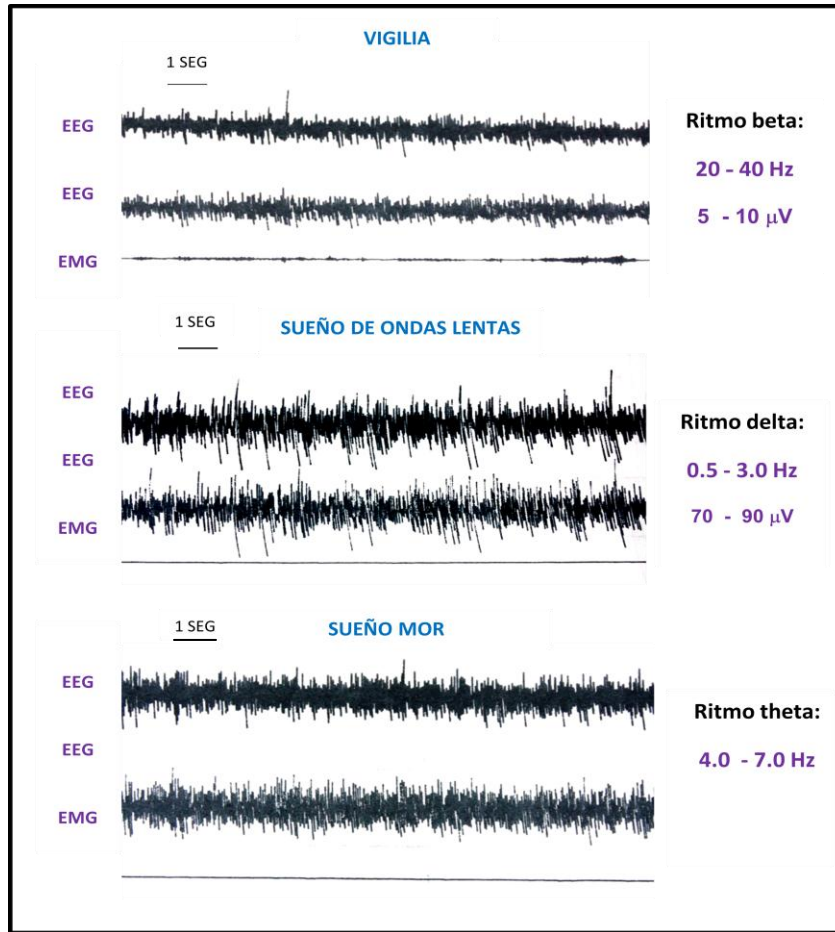


FIGURA 2.5. Descripción del patrón EEG y de la actividad eléctrica muscular (EMG) en las diferentes etapas del ciclo sueño - vigilia en la rata. Detalle de registros en realizados en papel en el laboratorio de neurociencias de la UAMI.

2.3. CONTROL NEURAL DEL SUEÑO MOR

En 1958 el investigador en fisiología William Dement, fue el primero en describir el sueño MOR en gatos, debido a su similitud en el EEG y conductual a la descrita anteriormente por Kleitman (1957) en humanos. Los siguientes años, Jouvet y un número de otros investigadores demostraron la presencia de sueño MOR en otras especies animales, en especial en mamíferos y en aves. Este descubrimiento dio pie a dos importantes avances en la investigación del sueño. El primero consistió en afirmar que el sueño MOR no era único del ser humano, de sus ensoñaciones y dinámicas psicoanalíticas Freudianas, sino un fenómeno universal presente en todos los mamíferos, adquiriendo, de este modo, la facultad de ser un tópico de investigación

biológica. La segunda consistió en la posibilidad de emplear modelos animales para desarrollar manipulaciones invasivas que permitieran explorar las bases anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del sueño MOR (Siegel J, 2002).

A finales de 1950 en el laboratorio de Moruzzi, experimentan con cortes a varios niveles en el tallo cerebral de gatos, en las porciones correspondientes a la preparación clásica de Berger de cerebro aislado (*cerveau isolé*) y encéfalo aislado (*encéphale isolé*), produciendo diferentes efectos como función del nivel del corte cerebral. En 1962, Jouvet basándose en estos datos, descubre que el control neural del sueño MOR reside en el tallo cerebral en algún lugar entre el puente rostral y la región caudal de la médula oblongada (Siegel J, 2002).

Años más tarde, Jerome Siegel en 1985, describió la participación de las neuronas del tallo cerebral involucradas en el control del sueño MOR. Su hallazgo, sumado a los previos realizados generó como conclusión que el mayor control cerebral del sueño paradójico reside en la región medial y caudal del puente. Siegel también demostró, que la médula oblongada está involucrada en el control de la atonía muscular y en determinar la duración de los episodios del sueño MOR (Siegel J, 2002). Del mismo modo, se ha demostrado mediante la realización de lesiones y experimentos mediante estimulación, que los signos individuales de esta fase del sueño pueden ser evocados por la estimulación de diferentes estructuras del tallo cerebral (Reinoso F y cols, 2001).

Actualmente, mediante el uso de modernas técnicas de imagenología realizadas en humanos durante el sueño MOR, han mostrado que la región pontina tegmental, es un lugar clave dentro de las redes neurales involucradas en la generación del sueño paradójico. En esta región se encuentran los núcleos colinérgicos latero dorsal tegmental (LDT) y ponto pedúnculo tegmental (PPT) los cuales tienen una importante intervención en la producción del sueño MOR (Reinoso F y cols, 2001).

En 1975 Hobson y sus colaboradores, demostraron que la supresión de la actividad en el núcleo Locus Coeruleus (LC) durante el sueño MOR, coincide con un aumento de la actividad de las neuronas gigantes de la formación reticular pontina medial (FRPm) que incluye los núcleos reticular pontino oral (RPO) y el reticular pontino caudal (RPC). Basados en estos hallazgos McCarley y Hobson en el mismo año, proponen el *modelo de interacción recíproca*, postulando que la interacción entre la actividad de las neuronas aminérgicas y colinérgicas generan el sueño MOR. Según este modelo, esta etapa del sueño ocurría debido a la disminución en la actividad de las neuronas aminérgicas, como la noradrenalina contenida en el LC y la serotonina contenida en las células del Rafe, lo cual generaba la activación de las neuronas gigantes de la FRPm (las cuales inicialmente se consideraban colinérgicas, pero hoy se sabe que son

colinoceptivas), indicando que la generación de MOR era consecuencia de la actividad de estas células (Siegel J, 2002). Por lo tanto, antes del inicio del sueño MOR las neuronas colinérgicas habrían alcanzado su pico máximo de actividad y las neuronas aminérgicas se encontrarán inactivas.

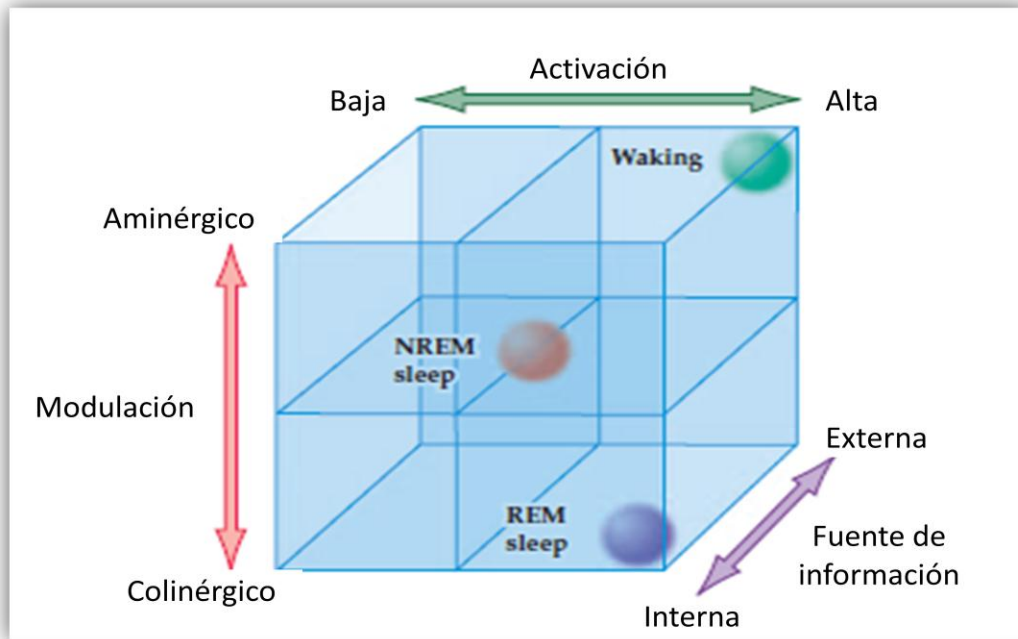


FIGURA 2.7. Esquema del modelo de interacción recíproca. Durante la activación es elevada y modulada de modo aminérgico y el origen de la información es externo. En el sueño MOR, el nivel de activación también es elevado pero su modulación es colinérgica y el origen de la información es interno. (Hobson, 1989 (Hobson 1989, tomado y modificada de Purves 2004). Waking: Vigilia, NREM sleep: Sueño No MOR, REM sleep: Sueño MOR.

Una revisión más actual del modelo, plantea que las neuronas colinérgicas de los núcleos PPT y LDT, las cuales son llamadas REM-on puesto que “encienden” el sueño MOR, establecen una retroalimentación positiva con las neuronas de la FRPm para generar el inicio del sueño MOR; durante este, las neuronas de la región mesopontina y de la FRPm activan a las neuronas del núcleo Rafe dorsal (serotoninérgicas) y a las del LC (noradrenérgicas), las cuales son llamadas REM-off pues se encargan de “apagar” el sueño MOR. La excitación de estas neuronas generará la inhibición de las neuronas REM-on colinérgicas ocasionando el cese del episodio de sueño MOR. Por lo tanto la desinhibición de las neuronas colinérgicas es necesaria para generar un nuevo episodio de sueño paradójico (Reinoso F y cols, 2001).

A su vez, diversos estudios han permitido precisar las estructuras responsables de cada una de las características del sueño MOR detectadas tanto en sujetos humanos como en animales de experimentación:

1. **Atonía:** las regiones encargadas de la atonía muscular, serán el tegmento pontino dorsolateral y el núcleo reticular bulbar magnocelular, las cuales envían proyecciones a la médula espinal donde establecen sinapsis inhibitorias con las neuronas motoras, esto impide que ocurran movimientos musculares voluntarios evitando así que actuemos nuestros sueños, con excepción de unas pocas y leves contracciones en las manos y los pies, llamados mioclonias (Reinoso F y cols, 2001).
2. **Espigas PGO:** Las espigas Ponto-geniculo-occipitales (PGO), se originan en el tegmento pontino dorsolateral en el área peribraquial, donde se encuentran los núcleos colinérgicos PPT y LDT, cuyos axones se extienden hasta el núcleo geniculado lateral. Las espigas PGO pueden ser disparadas por estimulación colinérgica en ausencia de otros fenómenos del sueño MOR. La serotonina inhibe la aparición de estas ondas, y la depleción de las células serotoninérgicas, puede disparar continuas espigas PGO. Las espigas PGO facilitan los movimientos oculares rápidos durante el estado de vigilia y en el sueño MOR. A su vez, estos disparos alcanzan regiones de la corteza occipital encargadas del procesamiento de estímulos visuales y generar imágenes fragmentadas que reconocemos como ensoñaciones (Culebras A, 1996). Las espigas PGO han sido observadas implantando electrodos en el puente tanto de gatos como de ratas, logrando que en los primeros se observen con mayor precisión que en las ratas. En humanos es difícil su detección puesto que por cuestiones éticas no es posible implantar electrodos de profundidad en regiones cerebrales; por lo tanto debido a la similitud con los modelos animales se puede deducir que las espigas PGO ocurren del mismo modo en los humanos, infiriendo su existencia en sujetos humanos, en los que se les atribuye el contenido visual de las ensoñaciones.
3. **Activación del EEG:** La activación y desincronización cortical es generada por la excitación de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, las cuales reciben proyecciones glutamatérgicas de la formación reticular mesopontina; ésta a su vez, recibe proyecciones de las neuronas colinérgicas de los núcleos

PPT y LDT. Estos núcleos también envían axones a regiones del tálamo que van a hacer sinapsis con neuronas de la corteza cerebral para el control de la actividad cortical (Reinoso F, 2001).

4. **Ritmo theta hipocampal:** Se caracteriza por una mayor sincronización de la actividad eléctrica (ondas theta 4-10 hz) y se presenta durante todo el estado de MOR. Estudios con electrodos de profundidad han demostrado que éste es generado en las células piramidales de CA1 en el giro dentado y en el córtex medial entorhinal del hipocampo. Estas regiones reciben aferencias del núcleo medial septal y del núcleo pontis oralis en el tallo cerebral (Culebras A, 1996).
5. **Movimientos oculares rápidos (MOR ó REM):** Los movimientos oculares son rápidos, sacádicos, movimientos conjugados en los planos horizontal, vertical y oblicuo que representan el fenómeno por excelencia del estado de sueño MOR. Los movimientos horizontales de los ojos, se originan en el área periacueductal del puente dorsomedial y los movimientos verticales son generados en la formación reticular del cerebro medio. Ambos corresponde a fenómenos fásicos del sueño MOR, al tiempo con otros eventos motores fásicos. Las espigas PGO preceden a los movimientos sacádicos de los ojos durante el sueño MOR y la vigilia (Culebras A, 1996).

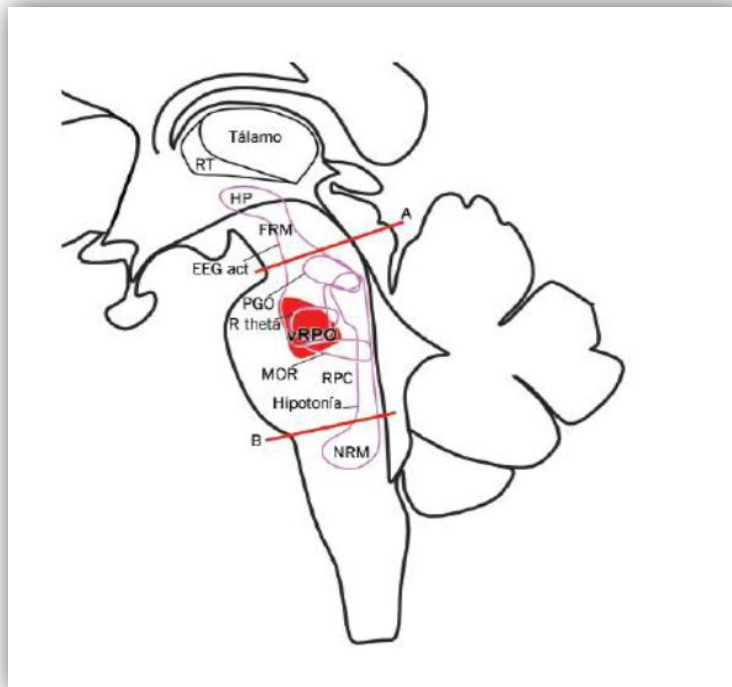


FIGURA 2.9. Esquema del tallo cerebral que muestra los núcleos involucrados en el sueño MOR, los centros generadores de los signos poligráficos característicos de esta fase del sueño y su afectación en las preparaciones de cerebro aislado y encéfalo aislado. En estas preparaciones se observó que en la de cerebro aislado (rostral a la sección A en la figura), no se manifiestan los signos correspondientes al sueño MOR, mientras que si lo hace la preparación del encéfalo aislado (caudal a la sección A), así como la región rostral de la sección B y no la preparación caudal a esta sección. Lo que indica que las estructuras responsables de generar el sueño MOR y sus diferentes características se encuentran situados en el tegmento pontino (ubicada entre la zona caudal de la sección A y la rostral de la sección B). Tomada de Reinoso-Suarez 2005.

En cuanto a la acción de diferentes neurotransmisores en la generación y mantenimiento del sueño MOR, ya hemos mencionado anteriormente la participación del sistema aminérgico donde intervienen las neuronas serotoninérgicas, la noradrenérgicas y las histaminérgicas actuando como neuronas REM-off, y la acción del sistema colinérgico donde las neuronas que sintetizan acetilcolina (ACh) juegan un papel REM-on para la generación de esta etapa del sueño. A su vez, otros neurotransmisores juegan un papel importante en la producción del sueño MOR como lo es el glutamato (neurotransmisor excitatorio por excelencia), su administración por medio de microdialisis en el área pontina dorsal, reduce el sueño MOR y la liberación de ACh en la misma región. Adicionalmente, los fármacos antagonistas del receptor glutamatérgico no-NMDA, inducen signos de sueño MOR como lo son la atonía muscular y los movimientos oculares rápidos, cuando son administrados en regiones pontomedulares. Del mismo modo, se ha observado que la administración de antagonistas de glutamato, MK-801, APV y CNQX, en una baja concentración (5 nM, icv), provocan una reducción de sueño MOR, sin generar alteraciones significativas en las otras fases del sueño, durante las 4 primeras horas de sueño luego de su administración, lo que indica que el glutamato juega un papel selectivo en la generación de sueño MOR (Prospéro O, Montes C, Guzmán K, Herrera A, Rueda P, Soria E, Prospéro A, Navarro L, 2000) (48). Del mismo modo, se ha estudiado la participación en el sueño MOR, del GABA (ácido amino butírico), el cual es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia del sistema nervioso central. Mediante estudios de microdialisis, se ha observado que el GABA es liberado en mayor cantidad en las regiones mesopontinas durante el sueño MOR. Otros estudios han demostrado que la administración de fármacos GABAérgicos como el muscimol, en el hipotálamo posterior aumenta el sueño de ondas lentas y el sueño MOR (Prospéro O, Montes C, Guzmán K, Herrera A, Rueda P, Soria E, Prospéro A, Navarro L, 2000). Lo cual tiene sentido, ya que como mencionábamos en el capítulo de breve reseña de la historia de la investigación del sueño, el hipotálamo posterior es un centro encargado del control de la vigilia y por lo tanto al inhibirlo va a permitir la aparición de del sueño. Actualmente se ha demostrado la participación de la anandamida en la generación tanto del sueño NMOR como MOR. La anandamida es

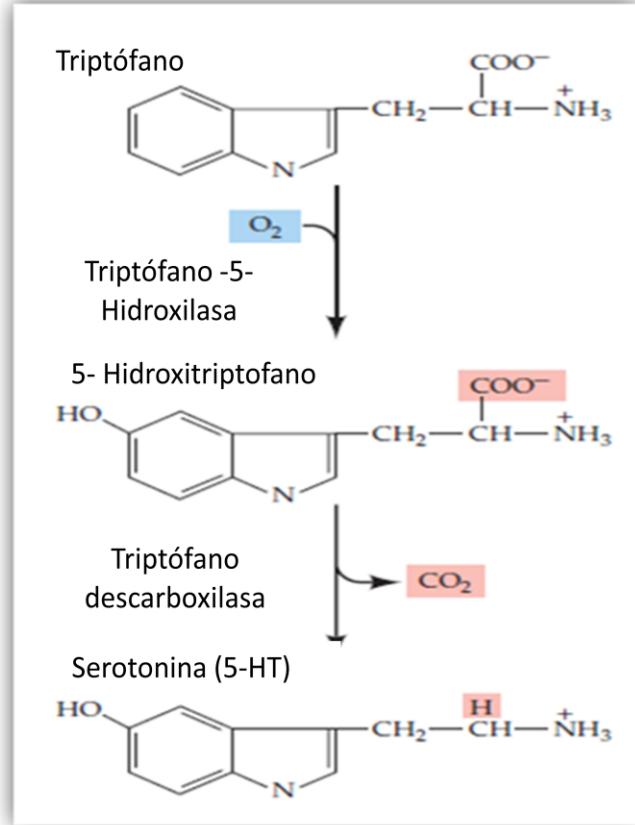
un lípido cerebral que se une a los receptores CB1 y CB2, los cuales son los mismos receptores a los que se acopla el delta-9-tetrahidrocanabinol, principio activo de la marihuana, y por eso se le ha dado también el nombre de marihuana endógena (Prospéro O, Montes C, Guzmán K, Herrera A, Rueda P, Soria E, Prospéro A, Navarro L, 2000).

A su vez, se conoce el papel de algunos neuropéptidos en la producción del sueño MOR, como el péptido vaso activo intestinal (VIP), el cual en estudios realizados por el grupo de Jouvet en 1982, mostró ser un potente inductor del sueño MOR en la rata bajo condiciones normales. Otros investigadores han demostrado que la administración de fármacos antagonistas de VIP, reducen el sueño MOR en ratas. Se ha reportado que varios neurotransmisores involucrados en la generación del sueño estimulan la liberación de VIP, como lo son la ACh, la serotonina, la prostaglandina D2 y las interleucinas, las cuales inducen sueño MOR y NMOR (Prospéro O, Montes C, Guzmán K, Herrera A, Rueda P, Soria E, Prospéro A, Navarro L, 2000).

3. UNA MIRADA A LA SEROTONINA

La serotonina o 5- *hidroxitriptamina* (5-HT), forma parte del grupo de neurotransmisores de las monoaminas o aminas biógenas (es decir que contiene un grupo amino en su estructura). Es sintetizada en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del Rafe ubicados en la protuberancia y el tronco encefálico superior, a partir del aminoácido *Triptófano*, el cual se adquiere por medio de la dieta y es captado por las neuronas mediante proteínas transportadoras de membrana. Una vez que se encuentra el triptófano en la neurona, es transportado a lo largo del axón hasta la terminación sináptica, donde es convertido en *5-Hidroxitriptófano* (5-HTP), por la enzima *triptófano-5-hidroxilasa*. Luego la 5-HTP es convertida en 5-HT por medio de la acción de una enzima descarboxilasa. Cuando el potencial de acción llega a la terminal serotoninérgica, las moléculas de 5-HT son liberadas al espacio sináptico y actúan en los receptores serotoninérgicos de la superficie de las neuronas postsinápticas. La 5-HT es liberada de los receptores y recapturada por proteínas transportadoras y luego por receptores de membrana ubicados en la terminal presináptica. El exceso de 5-HT es metabolizado por la enzima monoaminoxidasa (MAO), que actúa principalmente dentro de la terminal presináptica (Purves D, 2004).

FIGURA 3.1. Proceso de síntesis de la serotonina (5-HT). Esta se deriva del aminoácido triptófano y por medio de dos procesos que requieren la participación de la enzima triptófano-5-hidroxilasa y una descarboxilasa, se convierte en serotonina. (Tomada de Purves D. 2004)



Las células serotoninérgicas envían proyecciones a estructuras del diencéfalo como el hipotálamo y en especial al núcleo supraquiasmático que está involucrado en el control de los ritmos biológicos tales como el sueño y la vigilia. También envía proyecciones al septum, el hipocampo, la corteza cerebral, los ganglios basales y la amígdala (McGinty y cols 1976). Los axones que inervan a dichas estructuras, se originan casi enteramente desde el núcleo Rafe dorsal y Rafe medial. El núcleo Rafe medial suministra una gran cantidad de 5-HT al sistema límbico, mientras el Rafe dorsal proyecta con mayor densidad a la corteza cerebral, tálamo, ganglios basales (Monti J.M y cols 2000) y núcleos del tallo cerebral como el PPT, LDT y al locus coeruleus (fig 3.2).

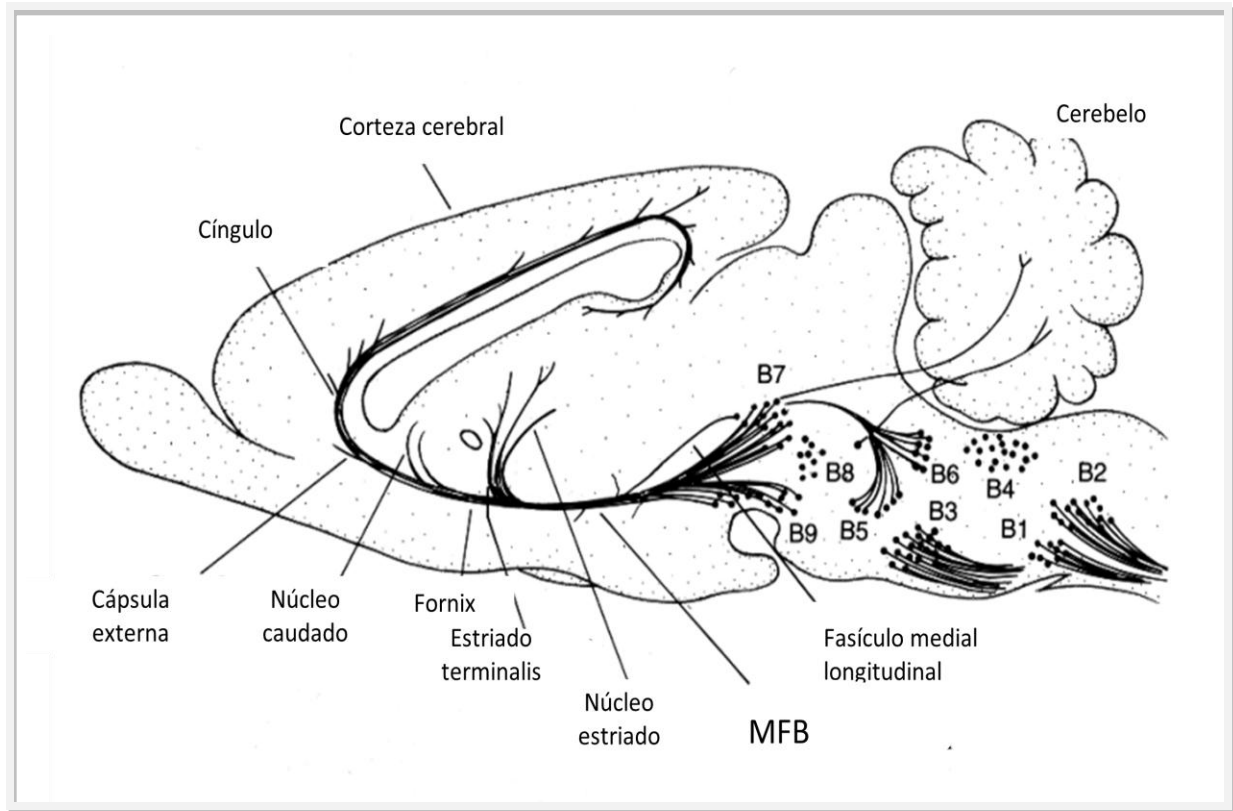


Figura 3.2: Se observa la distribución de las proyecciones serotoninérgicas en el cerebro de la rata, como de los núcleos del Rafe en el tallo cerebral B1 y B4: Núcleo del Rafe pálido, B2: núcleo del Rafe oscuro, B3: núcleo del Rafe magno, B5: núcleo Rafe del puente, B6 y B7: núcleo Rafe dorsal, B8: núcleo central superior, B9: núcleo pontino reticular tegmental. Tomada de Cooper y cols 2003.

La 5-HT cuenta con 7 clases de receptores que van desde el 5-HT1 al 7 y cada uno cuenta con diferentes subtipos. Se ha detectado que en el tejido cerebral existen en su mayoría, tres tipos principales de receptores 5-HT1, 5-HT2 y 5-HT3 (Monti JD, Monti D, 2000). La mayoría de sus receptores tienen una acción metabotrópica en la neurona pre ó postsinápticas debido a que se encuentran acoplados a proteínas G, a excepción del receptor 5-HT3 el cual tiene una acción ionotrópica en la membrana celular (Purves D, 2004). A su vez, la serotonina y sus receptores participan en diferentes aspectos fisiológicos y conductuales como la regulación de los ritmos circadianos, la conducta motora, la activación cortical y las emociones. Alteraciones en su funcionamiento están implicadas en numerosos trastornos psiquiátricos como la depresión, ansiedad y la esquizofrenia (Reinoso F, 2001).

3.1 SEROTONINA Y SU ACCION EN EL SUEÑO

Acerca de la participación de la serotonina (5-HT) en el sueño, actualmente es claro el papel que juega en el mantenimiento de la vigilia y en el inicio del sueño, donde el aumento de la actividad de las neuronas serotoninérgicas se asocia con la vigilia y la disminución de su actividad con el inicio del sueño NMOR o en el caso de los modelos animales del sueño de ondas lentas (SOL) (Hobson J.A, 1975).

En 1989 Borbely planteó la regulación homeostática del sueño, donde menciona que existe una correlación entre la cantidad de vigilia previa y la cantidad o intensidad del subsecuente sueño. A partir de esto se planteó la hipótesis que un proceso “S” incrementa durante la vigilia (V) y decrementa durante el sueño, donde este factor sería responsable de la intensidad del sueño NMOR ó SOL. De este modo, algunos sistemas de neuronas serotoninérgicas pertenecen a este proceso “S”, donde ellas podrían estar activas durante la vigilia e inactivas durante el sueño. Esta hipótesis llevo a los investigadores a reflexionar en la importancia de la liberación y concentración de la 5-HT en el ciclo sueño/vigilia y a buscar el estrecho vínculo entre estos procesos. De este modo se sugirió que mientras la privación total de sueño en gatos mediante la técnica de la piscina incrementa el sueño de ondas lentas, la alteración en la biosíntesis de 5-HT durante la privación de sueño, podía suprimir el consecuente rebote de sueño de ondas lentas (Jouvet M, 1999).

Lo anterior había sido totalmente confirmado mediante la administración de P-clorofenilananila (PCPA) un inhibidor de la biosíntesis de serotonina en el núcleo Rafe dorsal (NRD), durante la privación total de sueño. Esto suprimió totalmente el rebote de sueño de ondas lentas mientras que el sueño MOR se presentó de forma normal (Sallanon M y cols 1983). De este modo fue posible postular que algunas neuronas serotoninérgicas en el NRD, las cuales disparan normalmente durante la vigilia, podían estar participando en el proceso “S”, dependiendo de la duración e intensidad de la vigilia (Jouvet M, 1999). De este modo, la liberación de 5-HT durante la vigilia en una localización estratégica, puede desencadenar una cascada de eventos genómicos a nivel posináptico, que podrían estar desencadenando el inicio del sueño (Jouvet M, 1999).

Años atrás al planteamiento de esta hipótesis, en 1968 McGinty y Sterman realizaron un estudio donde al lesionar los núcleos del Rafe ó el área preóptica (fig 1.1), observaron que luego de la lesión los animales presentaban insomnio. Siendo de este modo posible que el área preóptica fuese un blanco para la 5-HT para el inicio del sueño (Jouvet M, 1999).

Para corroborar estos hallazgos, se realizaron microinyecciones de L-5-hidroxitriptamina en dosis muy bajas (0.2-0.5 μg), en el área preóptica, en gatos que habían presentado insomnio total luego de inyecciones de PCPA. Observando que la administración de dosis muy bajas de L-5-HTP, restauraba largos periodos de sueño en estos animales. Fue notable el tiempo relativamente largo en la latencia de sueño de alrededor de los 40 min (Denoyer M y cols, 1989). Una explicación que se le dio a este tiempo en la latencia de sueño, fue que 5-HT ejerce control en la síntesis del péptido vaso activo intestinal (VIP), en el núcleo supraquiasmático (Kawakami F, 1985). VIP se encuentra en las neuronas del área preóptica lateral y también actúa como péptido generador de sueño.

También se observó que lesiones en la periferia del área preóptica en gatos normales, fueron seguidas por la total supresión del sueño de ondas lentas y sueño MOR durante varias semanas. Esto concordó con la hipótesis que el área preóptica es un blanco posináptico de las neuronas serotoninérgicas y es una zona que participa en la generación del sueño (Sallanon M y cols 1983).

En 1976 McGinty y cols, mediante electrofisiología en gatos, estudiaron el rango y el patrón de descarga de las neuronas 5-HT del NRD, observando que durante la vigilia el rango de disparo es del 100%, mientras que al entrar en SOL disminuyen el rango de disparo en un 46% y al entrar en sueño MOR las neuronas del NRD disparan un 92% menos que el rango de disparo durante la vigilia (Fig 3.3).

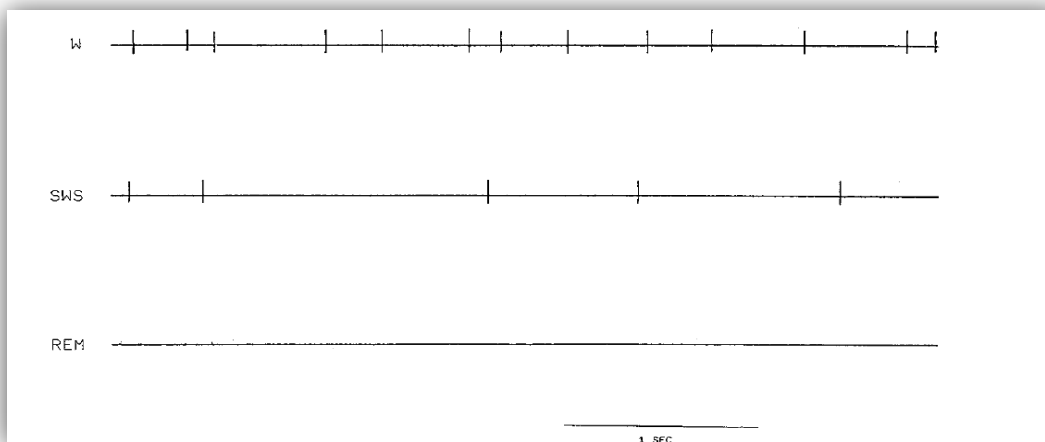


FIG 3.3. Esta gráfica ilustra el rango de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NRD mediante técnicas de electrofisiología en gatos. Se observa como las neuronas disparan regularmente durante la vigilia (W) y durante el sueño de ondas lentas (SWS) o sueño NMOR, pero durante el sueño MOR (REM) el rango de disparo disminuye considerablemente. (Tomado de McGinty D.J y Harper R.M, 1976)

Como mencionábamos anteriormente, para la generación y mantenimiento del sueño MOR es necesario que las neuronas 5-HT del núcleo Rafe dorsal se encuentren silentes (neuronas REM off), ya que al activarse “apagan” el sueño MOR. Desde 1975 Hobson y sus colaboradores, sugirieron que 5-HT inhibe el sueño MOR por medio de la inhibición de las neuronas colinérgicas promotoras de esta fase del sueño (Hobson J.A y cols 1975).

Años más tarde, el grupo de Honda en 1994 mediante técnicas de inmunohistoquímica, demostraron la existencia de una proyección desde el NRD a las neuronas colinérgicas de los núcleos laterodorsal y pedúnculo pontino tegmental. Según mencionan los autores, la presencia de sinápsis serotoninérgicas en las neuronas colinérgicas tegmentales es consistente con hallazgos conductuales y electrofisiológicos previos que sugieren que la 5-HT ejerce un rol inhibitorio en la iniciación del sueño MOR por medio de su acción en las neuronas colinérgicas del tegmento mesopontino (Honda T y cols, 1994).

Estudios realizados *in vitro* proponen que la 5-HT inhibe a las neuronas colinérgicas posiblemente por medio de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A}. Esto se observó en un estudio realizado mediante técnicas electrofisiológicas, donde identificaron la respuesta que generaba la administración de serotonina en las neuronas colinérgicas del núcleo LDT. Observaron que estas neuronas respondían a la 5-HT con hiperpolarización en su potencial de membrana. A su vez, al administrar el fármaco agonista del receptor 5-HT_{1A} carboxamidotriptamina maleato, se produce un efecto similar al de la 5-HT en el potencial de membrana de las neuronas del núcleo LDT, sugiriendo la participación de este receptor en la inhibición de las neuronas colinérgicas que generan el inicio y mantenimiento del sueño MOR (Luebke J.I, 1992).

Con el fin de determinar la participación de la serotonina y del receptor 5-HT_{1A} en el sueño MOR, en 1994 Sanford y colaboradores, realizaron un estudio donde inyectaron diferentes dosis del fármaco agonista selectivo de 5-HT_{1A} 8-hydroxy-2-(n-dipropylamino)tetralin (8-OH-DPAT) y del fármaco agonista menos específico al receptor 5-HT_{1A} 1(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP), en la región peribraquial directamente en los núcleos LDT y PPT en gatos. Observaron que dosis bajas del fármaco 8-OH-DPAT (0.01µg), tanto unilateral como bilateral, disminuía significativamente el inicio del sueño MOR. Ninguno de los dos fármacos disminuyó la duración o la frecuencia de los episodios de MOR una vez instalado, ni el rango de las ondas PGO. Los autores proponen que el receptor 5-HT_{1A} cumple un rol inhibitorio en el inicio o generación del sueño MOR (Sanford L y cols, 1994).

En 1997 se reportó, que luego de la microinyección de 5-HT en LDT en ratas en libre movimiento, se presenta una reducción en la cantidad de sueño MOR. Los autores argumentan que esta reducción se debe a la liberación de 5-HT en niveles bajos durante el sueño MOR proveniente de las neuronas del NRD hacia neuronas del núcleo LDT, lo que ocasiona hiperpolarización de las neuronas colinérgicas de este núcleo, ocasionando la disminución de esta fase del sueño (Horner R y cols, 1997).

A su vez, se ha reportado la acción que ejercen algunos receptores serotoninérgicos en el sueño MOR. Se ha observado que al inyectar fármacos agonistas y antagonista del receptor 5-HT₇, en el NRD en ratas, específicamente en las subregiones dorsomedial y ventromedial, se presenta una disminución significativa en la duración de sueño MOR y en el número de episodios (Monti J.M y cols, 2008).

Del mismo modo en ratas, microinyecciones en LDT del fármaco agonista DOI para 5-HT₂ producen una disminución significativa en la cantidad y en el número de episodios de MOR; microinyecciones en LDT del fármaco antagonista Ketanserin para 5-HT₂, producen un aumento significativo en la cantidad y número de episodios del sueño MOR. Estos resultados indican que la ocurrencia de sueño MOR es regulada en LDT, en parte, por el receptor 5-HT₂ (Amici R y cols, 2004).

3.2. ACCIÓN DEL RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT_{1A} EN EL SUEÑO MOR

Al igual que los demás receptores serotoninérgicos, el 5-HT_{1A} participa en la producción e inhibición del sueño MOR en mamíferos. Se ha comprobado que este receptor, se encuentra ubicado en el soma y las dendritas (autorreceptor somatodendrítico) de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del Rafe, donde se encarga de regular la liberación de 5-HT; también se encuentran localizados en los sitios postsinápticos de las neuronas blanco (Monti J.M y Monti D, 2000).

Este receptor ejerce una acción metabotrópica tanto a nivel presináptico (Fig 3.4), como postsináptico pues se encuentra acoplado a proteínas G_i cuya acción inhibe a la enzima adenilato ciclasa, regulando la liberación de 5-HT en la neurona presináptica y generando respuestas inhibitorias en las neuronas postsinápticas. Las áreas cerebrales ricas en el receptor 5-HT_{1a}, a nivel postsináptico incluyen a la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo septal, el hipotálamo, la amígdala (Monti J.M y Monti D, 2000).

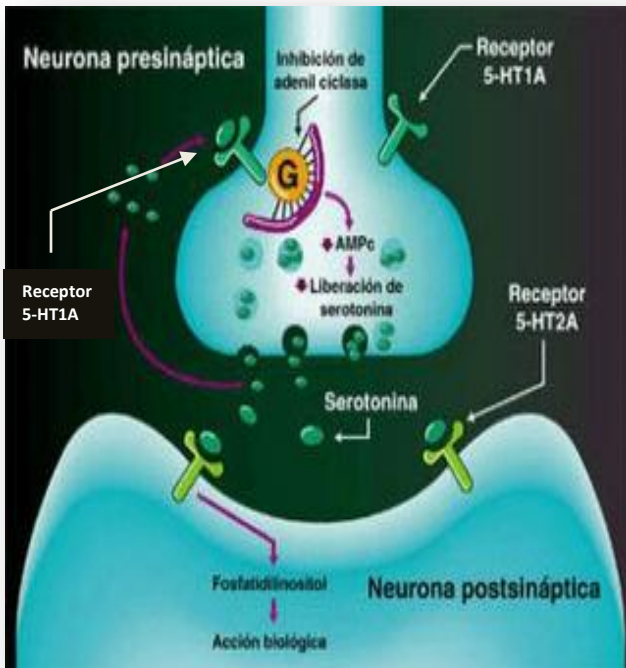


Figura 3.4. Representación de una sinapsis serotoninérgica. Se identifica el receptor 5-HT1A acoplado a proteína G, en la neurona presináptica. A nivel presináptico se describe el efecto de la proteína G_i la cual inhibe a la adenilato ciclasa, reduciendo la generación de AMP cíclico disminuyendo de este modo, la liberación de 5-HT al espacio sináptico.

Partiendo de este conocimiento del receptor 5-HT1A, se han realizado diversos estudios mediante la administración de fármacos agonistas y antagonistas altamente selectivos al receptor, tanto por vía sistémica como localizada en el núcleo Rafe dorsal (NRD) se ha comprobado la participación de este receptor tanto en el ciclo sueño y vigilia, específicamente en la generación y mantenimiento del sueño MOR.

Es así como, Monti y Jantos en 1992, administraron diferentes dosis del fármaco agonista del receptor 5-HT1A (8-OH-DPAT), mediante inyecciones localizadas en el NRD y suministradas por vía sistémica. Las dosis inyectadas en el NRD, fueron de $1\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$ y $4\mu\text{g}$. Las dosis administradas por vía subcutánea fueron de 0.010 mg/kg , 0.025 mg/kg , 0.100 mg/kg y 0.375 mg/kg . Luego de las inyecciones llevaron a cabo el registro polisomnográfico del ciclo sueño/vigilia durante 3 horas continuas. Este tiempo debido a que la vida media del fármaco 8-OH-DPAT es de alrededor de 3 horas (Monti J.M y cols 1992).

Los resultados mostraron disminución en la vigilia e aumento en el sueño de ondas lentas 2 al administrar el fármaco 8-OH-DPAT directamente en el NRD, durante la primera hora de registro. Respecto al sueño MOR se evidencia una tendencia a disminuir pero ésta no es significativa. Los autores mencionan que estos resultados pueden estar relacionados con la inhibición de los mecanismos serotoninérgicos

generada por la activación de los auto-receptores 5-HT_{1A} en el NRD (Monti J.M y cols 1992) (Fig 3.5).

A su vez, en la figura 3.6 es evidente que mediante la administración subcutánea del fármaco, se produce aumento en la vigilia durante la primera y segunda hora de registro, aumento en el sueño de ondas lentas 2 con la dosis más baja y disminución con las dosis altas durante la primera hora, y disminución en el sueño MOR a lo largo de las 3 horas consecutivas de registro. Los autores mencionan que los efectos del fármaco en el ciclo sueño-vigilia, pueden haber sido disparados por la activación de los receptores presinápticos (auto-receptores) o por los receptores 5-HT postsinápticos ubicados en neuronas blanco que participan en la producción del sueño (Monti J.M y cols 1992).

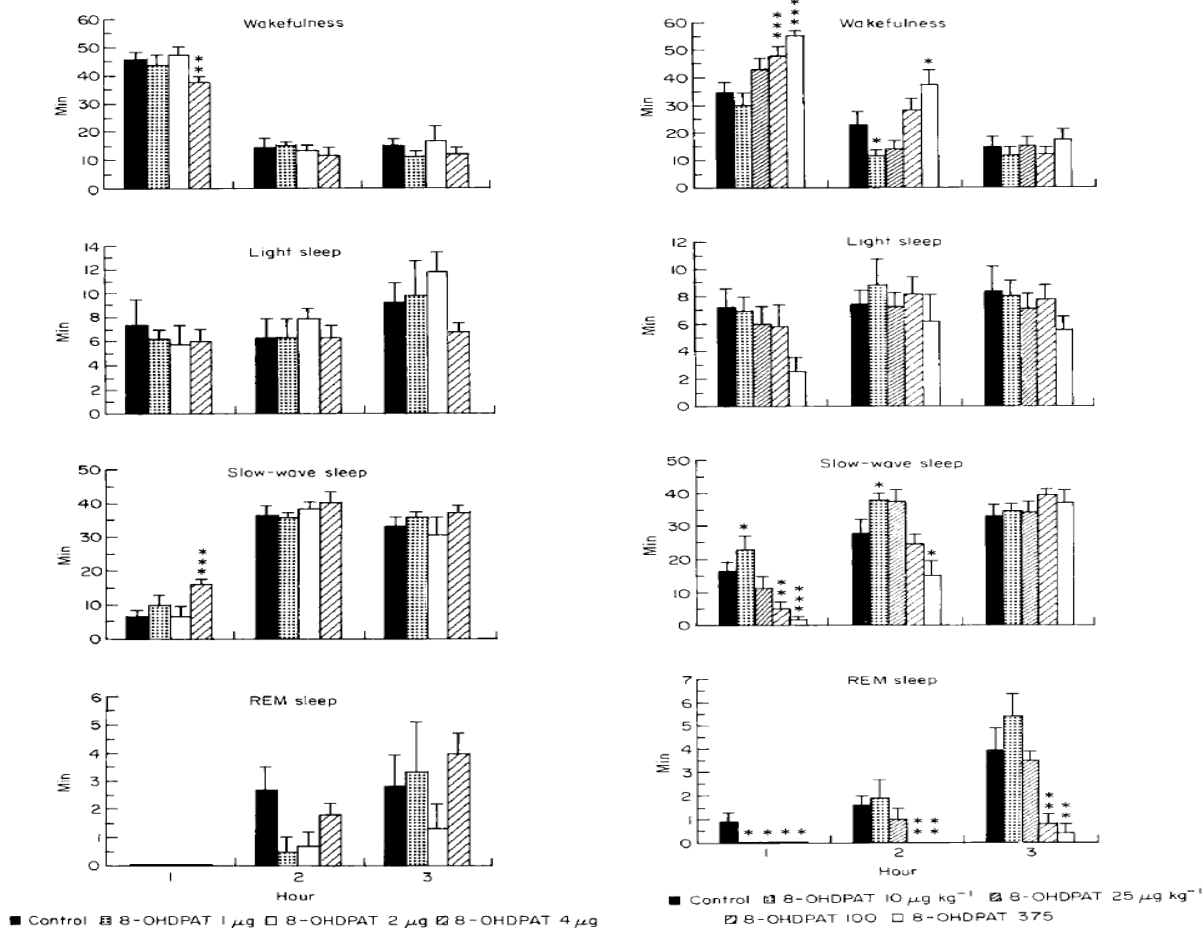


FIGURA 3.5. Esta figura muestra el efecto del fármaco 8-OH-DPAT administrado en el núcleo Rafe Dorsal en cada fase del ciclo sueño-vigilia en ratas Wistar, vigilia (wakefulness), sueño de ondas lentas 1 (Light sleep), sueño de ondas lentas 2 (Slow - wave sleep) y sueño MOR (Rem Sleep). La barra oscura muestra los efectos en el grupo control comparado con los grupos tratados con una dosis de 1µg, 2µg y 4µg del fármaco agonista (Tomada de Monti y Jantos, 1992).

FIGURA 3.6. Esta figura muestra el efecto del fármaco 8-OH-DPAT administrado vía subcutánea en cada fase del ciclo sueño-vigilia en ratas Wistar (vigilia, sueño de ondas lentas 1, sueño de ondas lentas 2 y sueño MOR). La barra oscura muestra los efectos en el grupo control comparado con los grupos tratados con una dosis de 0.010 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.100mg/kg y 0.375 mg/kg del fármaco agonista (Tomada de Monti y Jantos, 1992).

Bjorvatn y cols en 1997, mencionan que los resultados obtenidos por el estudio realizado por Monti y Jantos descrito anteriormente, generaron controversia debido a que la inyección realizada en el NRD no generó ningún efecto significativo en el sueño MOR (Bjorvatn B y cols, 1997).

Un estudio previo realizado en gatos, demuestra que la perfusión de 10 μ M de 8-OH-DPAT mediante microdialisis en el NRD no incrementó el sueño de ondas lentas, pero en cambio incrementó significativamente el sueño MOR (Portas C.M y cols, 1996). Según Bjorvatn y colaboradores, el aumento en el sueño MOR seguido de la estimulación de los auto-receptores 5-HT y por consiguiente de la reducción en la neurotransmisión serotoninérgica, es consistente con lo observado mediante estudios electrofisiológicos que muestran que las neuronas 5-HT del NRD se encuentran silentes durante el sueño MOR (Hobson J.A y cols, 1975).

A partir de lo anterior, este grupo realiza un estudio buscando explorar el rol del receptor 5-HT_{1A} en el ciclo sueño-vigilia, mediante las administraciones subcutánea y localizada en el NRD del agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT, a diferentes dosis, 0.010mg/kg o 0.375mg/kg vía subcutánea y 10 μ g disueltos en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) para la perfusión en el NRD en ratas. Luego del suministro, se llevó a cabo el registro polisomnografico del ciclo sueño-vigilia durante 6 horas continuas. Los resultados se observan en las figuras 3.7 y 3.8, siendo coherentes con los encontrados en estudios anteriores sobre la participación del receptor 5-HT_{1A} en el ciclo sueño-vigilia.

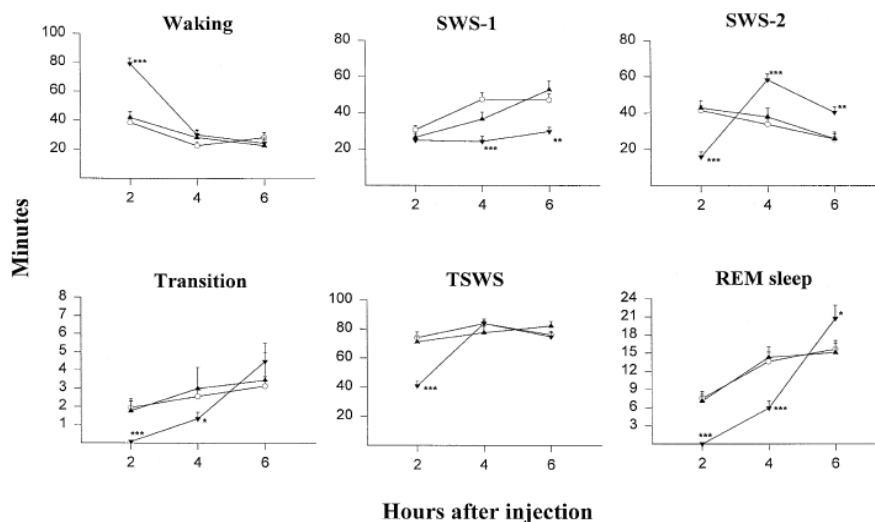


FIGURA 3.7. Esta imagen muestra el efecto en el ciclo sueño-vigilia de la administración s.c del fármaco 8-OH-DPAT a dosis de 0.010mg/kg (▲), 0.375 mg/kg (▼) y controles (sol. salina 1.5ml/kg) (○). Se observa que el fármaco 8-OH-DPAT incrementa la vigilia, reduce el sueño de ondas lentas 1 y el sueño MOR (Tomada de Bjorvatn B y cols, 1997). (Waking: Vigilia, SWS-1: Sueño de ondas lentas 1, SWS-2: Sueño de ondas lentas 2, Transition: Transiciones, TSWS: Tiempo total de sueño de ondas lentas, REM sleep: Sueño MOR. Minutos, Hours after start of recording: Horas luego de iniciado el registro). Tomado de Bjorvatn B y cols 1997

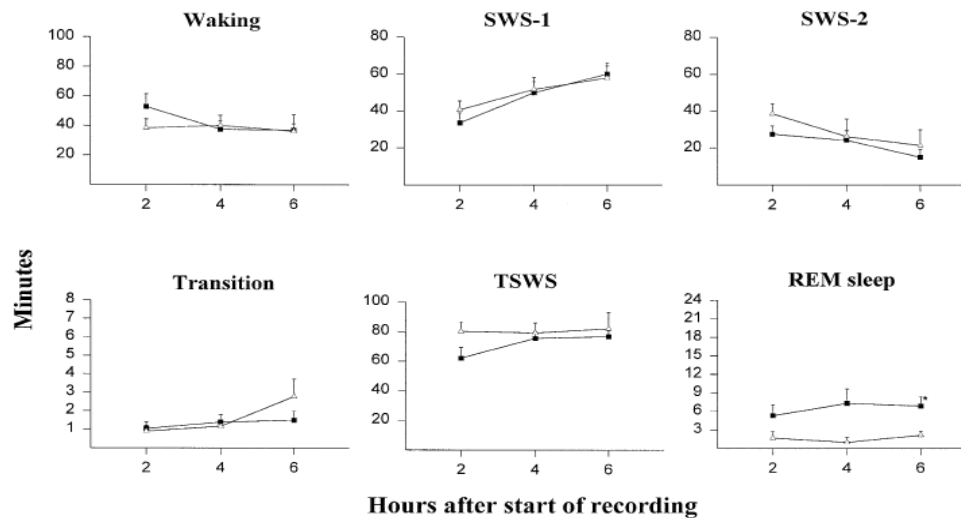


FIGURA 3.8. Esta imagen muestra el efecto en el ciclo sueño-vigilia de la administración localizada en el NRD del fármaco 8-OH-DPAT en una dosis de $10\mu\text{g}$ (■) y controles perfundidos con aCSF (△). Se observa que la perfusión con el fármaco 8-OH-DPAT incrementa el sueño MOR comparado con los controles (Tomada de Bjorvatn B y cols, 1997). (Waking: Vigilia, SWS-1: Sueño de ondas lentas 1, SWS-2: Sueño de ondas lentas 2, Transition: Transiciones, TSWS: Tiempo total de sueño de ondas lentas, REM sleep: Sueño MOR. Minutes: Minutos, Hours after start of recording: Horas luego de iniciado el registro). Tomado de Bjorvatn B y cols 1997.

Tiempo después, Boutrel y cols en el año 2002, realizaron un estudio con ratones Knock-out (-/-) al receptor 5-HT_{1A} (es decir, modificados genéticamente para que no expresen el receptor), y ratones ratones silvestres (+/+), es decir animales control que si lo expresan, con el fin de obtener una conclusión más clara sobre la participación de este receptor serotoninérgico en el sueño MOR. Para lo cual administraron diferentes dosis del fármaco agonista 8-OH-DPAT vía subcutánea (0.25mg/kg, 0.5mg/kg, 1.0mg/kg disuelto en sol. Salina) (Fig 3.9), como también una dosis de 0.5mg/kg del fármaco antagonista del receptor 5-HT_{1A} WAY 100635 administrado vía intraperitoneal (Fig 3.10).

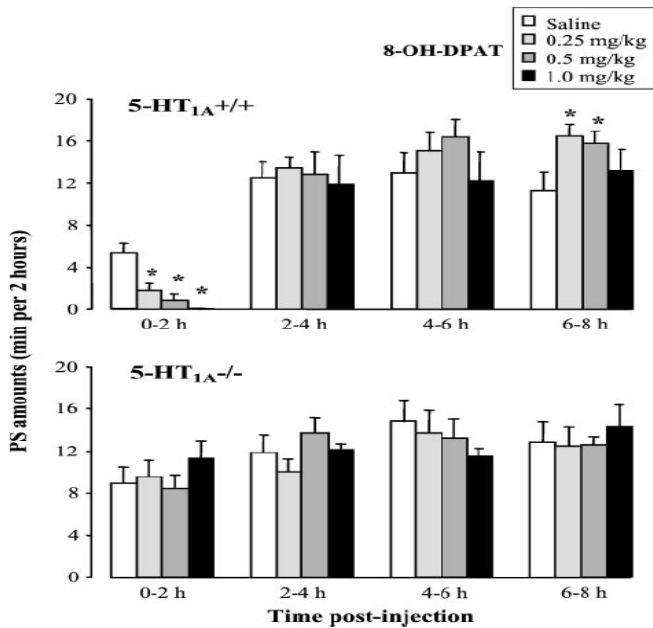
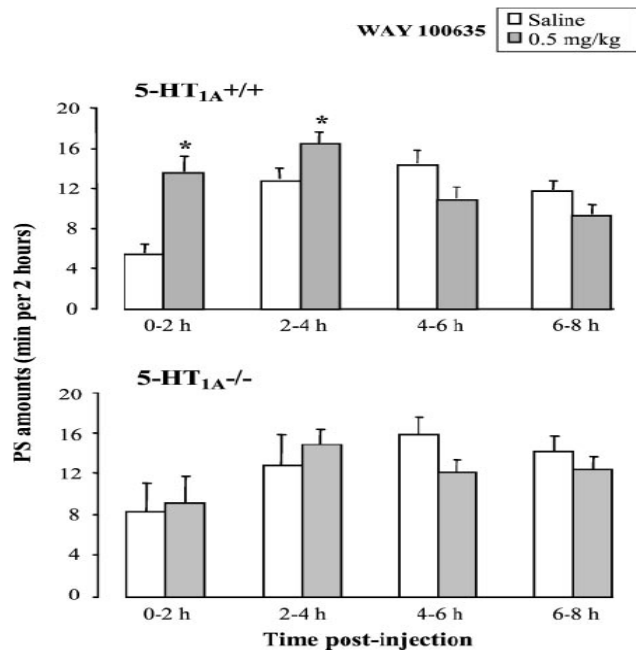


FIGURA 3.9. La inyección sistémica del fármaco 8-OH-DPAT en dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg, produce un efecto bifásico del sueño MOR, generando su reducción durante las 2 primeras horas de registro y su aumento durante las siguientes 6 a 8 horas en los ratones silvestres (+/+). Mientras que en los ratones Knock-out (-/-), no se evidencian cambios significativos en el sueño MOR. Nótese que aunque no expresan el receptor 5-HT_{1A}, manifiestan sueño MOR, lo que sugiere que el 5-HT_{1A} no es el único receptor involucrado o del cual depende la generación del sueño MOR (Tomada de Boutrel B y cols, 2002). (PS amounts: Cantidad de sueño MOR, Time post-injection: tiempo luego de la inyección)

Este efecto bifásico no se evidenció en los ratones silvestres mediante la administración de una dosis de 1.0mg/kg, la cual generó la reducción en el sueño MOR durante las 8 horas consecutivas de registro. Ninguna dosis produjo alteraciones en esta fase del sueño en los ratones Knock-out (Boutrel B y cols, 2002), (Fig 3.9).

FIGURA 3.10. Esta gráfica muestra el efecto en el sueño MOR generado por el bloqueo del receptor mediante el antagonista del receptor 5-HT_{1A}, WAY 100635 en una dosis de 0.5 mg/kg. Se evidencia aumento del sueño MOR durante las 4 primeras horas de registro en los ratones silvestres y ningún efecto en esta etapa del sueño en los ratones knock-out (Boutrel B y cols, 2002). (PS amounts: Cantidad de sueño MOR, Time post-injection: tiempo luego de la inyección).



Estos estudios demuestran la participación del receptor 5-HT_{1A} en la producción del sueño MOR, el cual disminuye o es inhibido (según la dosis del fármaco 8-OH-DPAT que se administre), cuando el receptor 5-HT_{1A} se encuentra estimulado, mientras que su generación y mantenimiento es facilitada cuando este se encuentra inactivo.

4. EL ESTRÉS MODIFICA LA ARQUITECTURA DEL SUEÑO.

Diversos estudios han demostrado, que la arquitectura del sueño va a depender de los eventos ocurridos durante el periodo de vigilia (Ambrosini M y cols 1998, Drucker R 2000, Papale L.A y cols 2005). Por lo tanto, cuando un individuo ha sido sometido a una situación de estrés, la duración y calidad del sueño se verán alteradas (Kant G y cols 1995, Cheeta S y cols 1997, Duarte B, 2000). Es así como, el ciclo de sueño y vigilia es afectado de distinta manera por diferentes tipos de estrés, por lo que se torna importante comprender como está ocurriendo dicha alteración.

Resulta importante mencionar la definición de estrés planteada por Hans Selye en 1936, como “la respuesta inespecífica del organismo ante cualquier demanda extraordinaria”. Esta demanda puede ser un estímulo físico, psicológico, emocional o social. La respuesta inespecífica puede observarse tanto a nivel conductual como la reacción de huida o parálisis ante el estresor, ó fisiológica involucrando la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, que mediante la liberación de glucocorticoides y catecolaminas como la adrenalina, generará diferentes efectos inmediatos en el organismo, como el aumento de la frecuencia cardiorespiratoria, sudoración, detención de los movimientos peristálticos intestinales, pérdida del apetito, mayor irrigación del flujo sanguíneo a las extremidades para favorecer la respuesta de huida o de ataque, depresión del sistema inmune, fortalecimiento del recuerdo aversivo en la memoria emocional por efecto del cortisol, entre otros. A su vez, las características del estresor van a determinar estos cambios sobre la fisiología del organismo y finalmente sobre la arquitectura del sueño (Velazquez J y cols 1993).

A su vez, en sujetos humanos se ha comprobado que la exposición a un estímulo o experiencia aversiva puede incrementar su vulnerabilidad a padecer diversos trastornos psiquiátricos e incluso alterar su patrón de sueño. Es así como, se ha reportado, que el trastorno por estrés posttraumático, generado por la exposición del sujeto a un evento estresante y aversivo genera cambios en el patrón de sueño, particularmente en el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), evidenciándose un aumento en su densidad (número de episodios y cantidad total de tiempo) (Mellman TA y cols 2002). Una de las explicaciones que se le dan a este aumento, es que permite

consolidar en la memoria el aprendizaje de la situación aversiva con el fin de que el individuo pueda evitarla ya que corre riesgo su supervivencia.

También en humanos se ha estudiado la influencia del estrés sobre el sueño en relación con la depresión mayor. Los pacientes con este tipo de depresión presentan una elevada cortisolemia, probablemente como resultado de un componente de estrés crónico. En este tiempo de depresión ocurre un acortamiento en la latencia del sueño MOR, una disminución en la duración del sueño de ondas lentas, un aumento en el número de despertares y fluctuaciones en el ciclo sueño-vigilia (Appelboom-Fondu J y cols 1988).

En animales, diversos estudios hacen referencia a una variedad de paradigmas de estrés que conllevan a alteraciones en el patrón de sueño, como choques eléctricos en las patas, inmovilización, nado forzado, exposición al frío (Duarte B y cols 2000), evidenciando cambios en la cantidad de tiempo y episodios tanto en el sueño de ondas lentas (SOL), como en el sueño MOR. Aunque todos estos estresores muestran efectos sobre la arquitectura del sueño, es sin duda el estrés por inmovilización (INMV) el paradigma que genera mayores cambios en el patrón del sueño MOR (Duarte B y cols 2000).

4.1 ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN Y SUEÑO MOR

Experimentalmente se ha comprobado, que al inmovilizar (INMV) durante 1 o 2 horas a un animal (Rampin C y cols 1991, Marinesco S y cols 1999), va a producir una alteración en la arquitectura del sueño, durante las horas seguidas de registro polisomnográfico (8 a 12 hrs), seguidas a la exposición al estresor; evidenciándose una disminución en la latencia a sueño y en la latencia a sueño MOR (Marinesco S y cols 1999), y un aumento significativo en la duración y número de fases del sueño MOR a partir de la 4 hora de registro luego de finalizada la inmovilización (Fig 4.1 y 4.2); también se observa, aumento en el sueño de ondas lentas (SOL) (Fig 4.1 y 4.2), y una disminución (no significativa) en el periodo de vigilia (V) (Rampin C y cols 1991). A si mismo se observa que durante el periodo de inmovilización, el animal presentó vigilia constante (Rampin C y cols 1991).

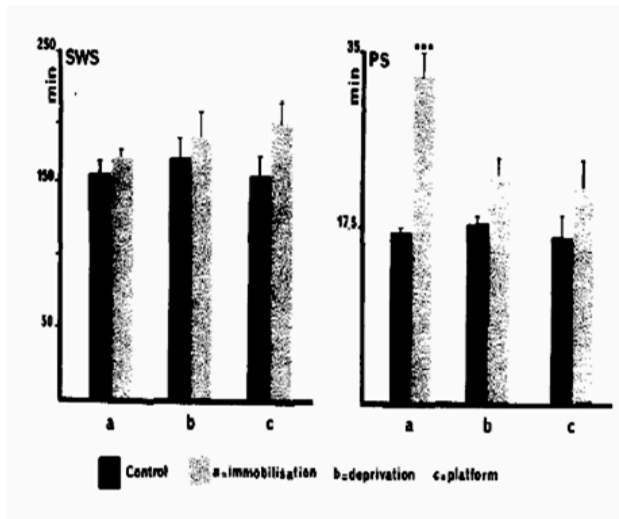


FIGURA 4.1. Esta gráfica muestra el efecto de 2 hrs de INMV, 2 hrs de privación total de sueño y 2 hrs de privación selectiva de MOR, en el patrón del sueño de ondas lentas y del sueño MOR. Como se puede observar, la situación experimental que mayores efectos tiene en el patrón del sueño MOR, generando un aumento del 92% en esta fase del sueño, comparado con el grupo control es la INMV. (Tomada de Rampin et al. 1991)

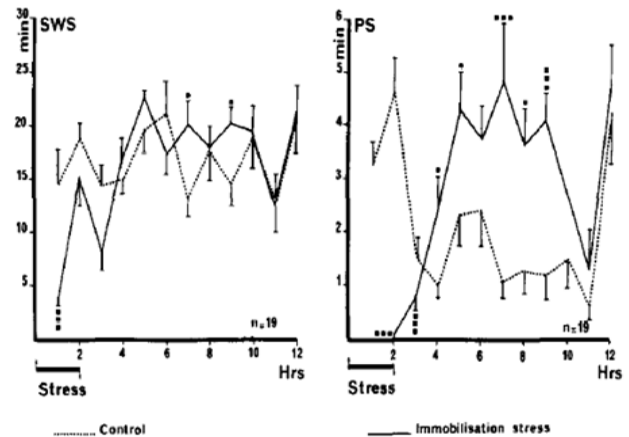


FIGURA 4.2. Esta gráfica ilustra el efecto de 2 hrs de INMV aplicadas al inicio del periodo oscuro, sobre el sueño de ondas lentas y el sueño MOR, durante las 12 horas de registro (2 hrs de INMV y 10 hrs de registro de sueño –vigilia). Durante las 10 hrs seguidas a la INMV, la cantidad total de SOL no fue diferente del grupo control, mientras que la cantidad total de sueño MOR incrementa significativamente durante las 10 hrs de registro a comparación del grupo control. (Tomada de Rampin et al. 1991)

Este aumento en la duración y frecuencia en los episodios del sueño MOR, puede ayudar al animal a recuperarse y adaptarse a los cambios en el ambiente (Marinesco S y cols 1999), teniendo en cuenta, que la función del sueño está asociada con la restauración del metabolismo neuronal (Benington J y cols 1995), y la recuperación de una optima temperatura cerebral (McGinty D y cols 1990).

A su vez Rampin y cols, mencionan que la exposición a la INMV por un corto tiempo aplicado al inicio del periodo de oscuridad, momento en el cual la interacción de los componentes circádicos y homeostáticos es menos eficiente para la producción del sueño, claramente indica la influencia del estrés como un factor determinante para inducir el aumento de sueño MOR. También mencionan que es posible que este efecto del estrés en el sueño también ocurra por efecto de la ACTH (Hormona adenocorticotrofica), y sus derivados como la hormona estimulante de α -melanocitos en su forma acetilada (des- α -MSH) y al péptido intermediario similar a la corticotropina

CLIP, los cuales son sintetizados en el núcleo arcuato del hipotálamo basal y se ha reportado que son determinantes para la producción del rebote de sueño MOR, el cual se produce por privación selectiva de MOR; por lo tanto pueden estar involucradas en el proceso hormonal generador del aumento de sueño MOR que se observa tanto por privación selectiva de MOR como por INMV (Rampin C y cols 1991).

También se ha observado, que repetidas exposiciones del animal al estresor van a atenuar la el efecto del estresor en el sueño, inhibiendo el aumento de sueño MOR. Este efecto es generado por un proceso de habituación del organismo al estresor que le impide responder al estresor de la misma forma, como se observa en la figura 4.3 (Rampin C y cols 1991).

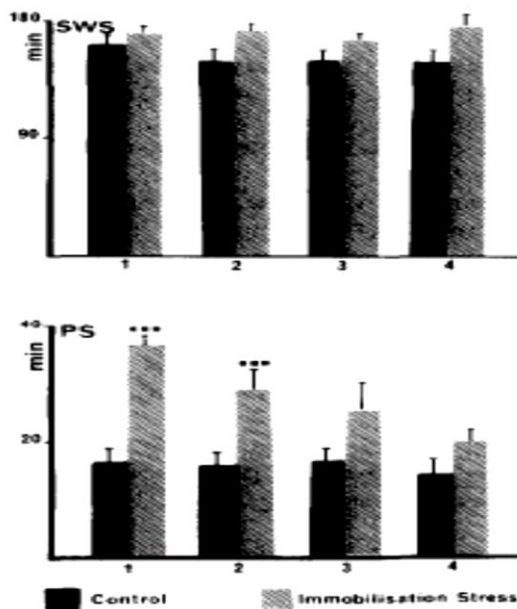


FIGURA 4.3. Muestra el efecto de la exposición repetida al estresor (4 veces consecutivas), en el aumento de sueño MOR. Las repeticiones no generan un efecto significativo en SOL, mientras que el aumento observado en el sueño MOR luego del primer ensayo, se reduce notablemente luego del tercer ensayo. (Tomada de Rampin y cols 1991). (Inmovilisation stress: estrés por inmovilización).

En ratas, este aumento en el sueño MOR luego de estrés por inmovilización está influido por momento en el ciclo circádico en el cual se presente el estresor. Es así como Koehl M y cols realizaron un estudio para evaluar el efecto del ciclo circadiano sobre la respuesta al estrés en la arquitectura del sueño, para esto tomaron dos grupos de animales, a un grupo lo inmovilizaron durante la primera hora del periodo luminoso y al otro durante la primera hora del periodo de oscuridad seguido de 24 horas continuas de registro polisomnográfico. Como resultado encontraron que los animales que fueron inmovilizados durante la primera hora del periodo luminoso presentaron disminución en la vigilia, aumento del sueño de ondas lentas y en el sueño MOR luego de las primeras

8 horas de registro. Mientras que en los animales que fueron inmovilizados durante la primera hora de oscuridad se produjo una disminución de la vigilia, disminución de SOL e aumento del sueño MOR al final del ciclo luminoso y durante el periodo de oscuridad, (Fig 4.4) (Koehl M y cols 2002). Estos resultados muestran que la aplicación del estresor en diferentes momentos del periodo de luz-oscuridad, va a generar diferentes efectos en el patrón del ciclo sueño-vigilia.

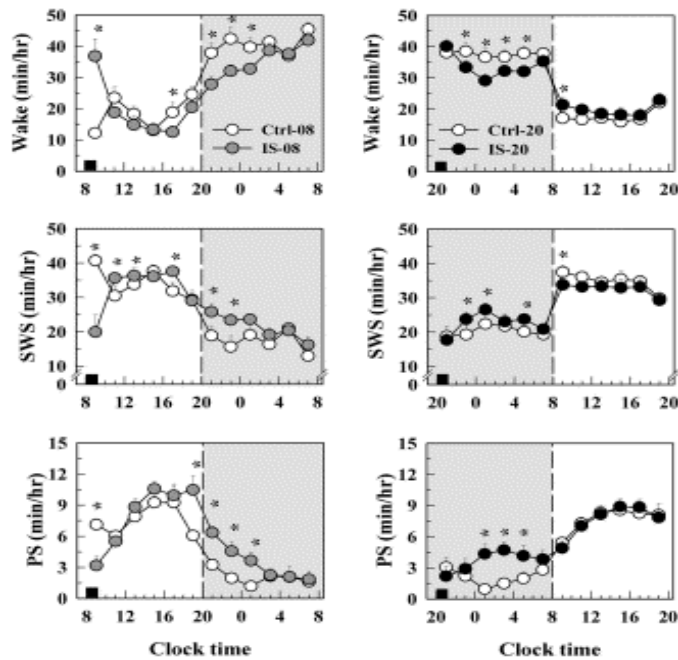


FIGURA 4.4. Esta gráfica muestra el efecto de una hora de INMV sobre las etapas del ciclo sueño-vigilia, al aplicar el estrés al inicio del periodo de luz (que corresponde a la región clara de cada gráfica) a las 8:00 hrs y al inicio del periodo de oscuridad (correspondiente a la parte sombreada de cada gráfica), es decir a las 20:00 hrs. Como se observa, cuando el estresor es aplicado durante el periodo de oscuridad, la vigilia se decrementa, la fase de SOL incrementa pero al inicio del periodo luminoso disminuye y el sueño MOR incrementa significativamente. (Tomada de Koehl M y cols. 2002)

4.2 ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN, SEROTONINA Y SUEÑO MOR.

Estudios con voltimetría han demostrado que durante 1 o 2 horas de inmovilización, ocurre una importante liberación de 5-OHles (un indicador de liberación de 5-HT), en el hipotálamo basal, específicamente en el área del núcleo arcuato, produciéndose la mayor liberación al inicio de la inmovilización y decreciendo mientras la intensidad del estresor permanece constante (Houdouin F y cols 1991).

Esta liberación de serotonina al inicio del estresor, se correlaciona con el registro polisomnográfico de vigilia constante que presenta el animal durante el tiempo en el que transcurre el estresor. Una vez finalizado el tiempo del estresor y en el momento en que el animal concilia el sueño, la concentración de serotonina ha regresado a sus niveles basales (Houdouin F y cols 1991).

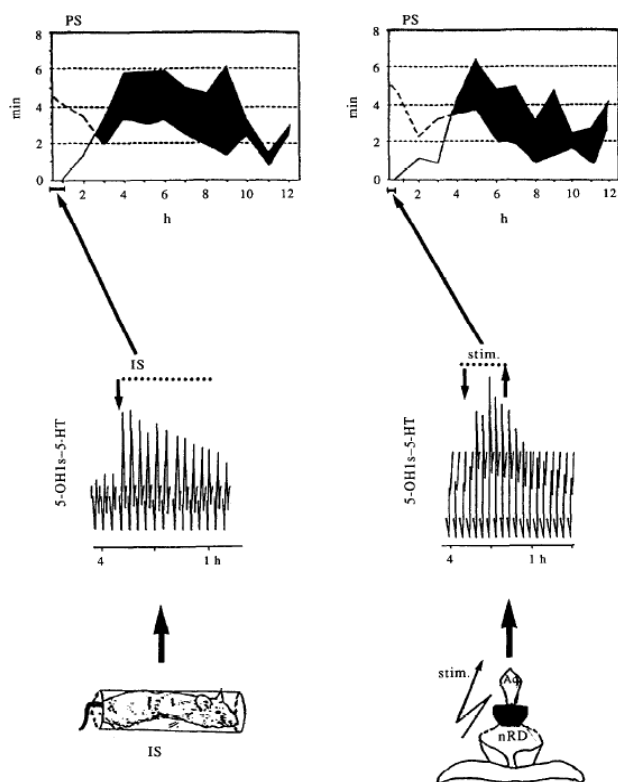


FIGURA 4.5. Esta figura reúne los datos publicados en diferentes artículos. En la figura de la derecha se observa que 2 hrs de INMV, produce una importante liberación de 5-OHles (5-hidroxitriptógenos, indicador de la liberación de 5-HT), en el hipotálamo basal, específicamente en el núcleo arcuato. Esto es concomitante con la notoria vigilia durante el tiempo de INMV seguido de aumento significativo en el sueño MOR. A la derecha se observa, que la estimulación eléctrica de la región antero-dorsal del NRD, también induce una importante liberación de 5-OHles en el núcleo arcuato seguido por un aumento en el sueño MOR. La liberación de 5-OHles es constantemente acompañada por una marcada vigilia registrada mediante polisomnografía, indicando que la 5-HT no es directamente responsable del subsecuente aumento de sueño MOR. (Tomado de Cespuglio y cols 1995)

Este fenómeno indica que la 5-HT liberada al núcleo arcuato por las terminales axónicas procedentes de la región anterodorsal del núcleo del Rafe dorsal durante la INMV, puede no ser directamente responsable de la ocurrencia del subsecuente aumento del sueño MOR. Así, Cespuglio en 1990 plantea la posibilidad que la liberación de 5-HT al hipotálamo basal durante INMV puede estar influyendo en la síntesis y liberación de sustancias facilitadoras del sueño, las cuales pueden ser directamente responsables del subsecuente aumento en el sueño MOR.

Se conoce que el núcleo arcuato, tiene neuronas especializadas en la producción de POMC (Proopiomelanocortina). Esta prohormona (también presente en la adenohipófisis) va a producir luego de múltiples divisiones al péptido ACTH y sus dos derivados, la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH) y al péptido intermediario similar a la corticotropina (CLIP) (Cespuglio R y cols 1990).

Se ha reportado que la administración intra cerebro ventricular de ACTH, incrementa el estado de vigilia, mientras (α -MSH) en su forma acetilada (des- α MSH) y CLIP administradas en la misma ruta incrementa SOL y MOR, respectivamente (Cespuglio R y cols 1990). Otros estudios han reportado la participación de CLIP administrado en el NRD en el aumento de sueño MOR luego de ser inyectado (Fig 4.6), (El Kafi B y cols 1994).

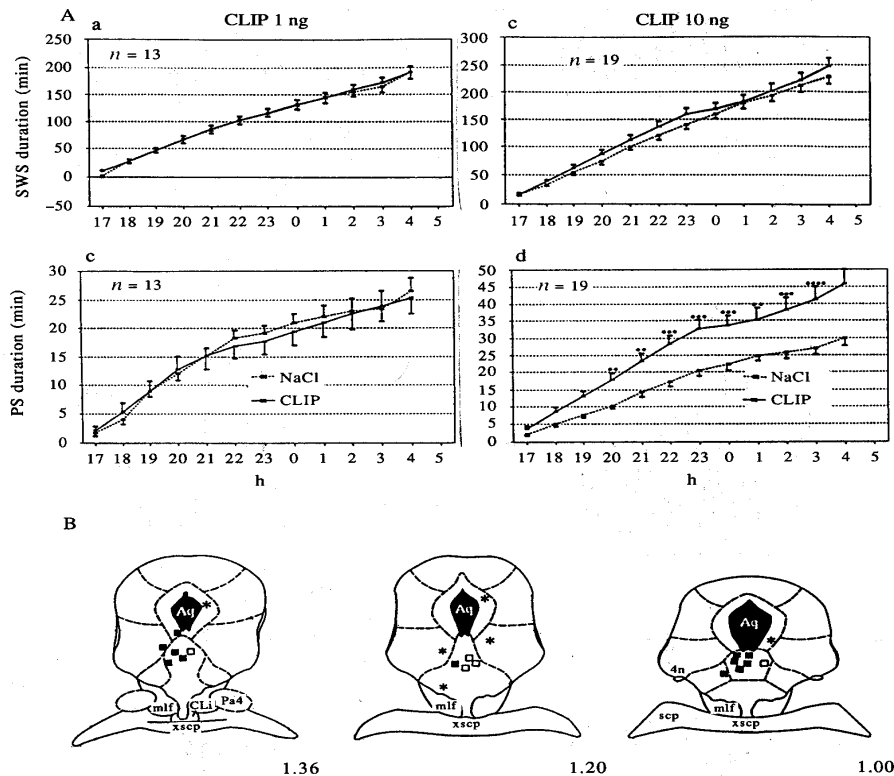


FIGURA 4.6. Esta figura muestra el efecto de diferentes dosis (1ng y 10ng) de CLIP administrados localmente en el NRD (núcleo Rafe dorsal), sobre la duración del sueño de ondas lentas (SWS en su sigla en inglés) y en el sueño MOR expresado en minutos. Las inyecciones localizadas en la parte antero-dorsal del NRD produjeron aumento significativo del sueño MOR, con la mayor dosis de CLIP (10ng), mientras que el sueño de ondas lentas no se vio afectado. (Tomada de El Kafi y cols 1994)

Por lo tanto, las sustancias derivadas de la ACTH pueden ser consideradas como factores facilitadores del sueño. De este modo, es posible que durante el estrés la des- α MSH y CLIP puedan ser liberadas al inicio de la inmovilización bajo la influencia de la 5-HT en el arcuato, participando en la generación del aumento de MOR.

La influencia de la 5-HT sobre los derivados de POMC ha sido demostrada a nivel genómico en animales sometidos a INMV, donde un significativo aumento en el mRNA de POMC ocurre en la 5 hr luego de finalizado el estresor, donde el rebote de sueño MOR tiene su pico máximo (Baubet V y cols 1988).

4.3. VIAS DE NEUROTRANSMISIÓN IMPLICADAS EN EL AUMENTO DE SUEÑO MOR PRODUCTO DE ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN

Del mismo modo, diferentes vías de neurotransmisores se encargan de modular la respuesta dada por el efecto del estrés por inmovilización, en la duración del sueño MOR. Es así como, se conoce el papel que juega el receptor histaminérgico H1 en el efecto del estrés en el sueño mediante su bloqueo con el fármaco antagonista Clorfeniramina (CFA o CPA por sus siglas en inglés) administrado vía intraperitoneal en ratas. Su administración seguida de estrés por inmovilización generó la inhibición en el aumento de MOR (Rojas J y cols 2008) (Fig 4.7)

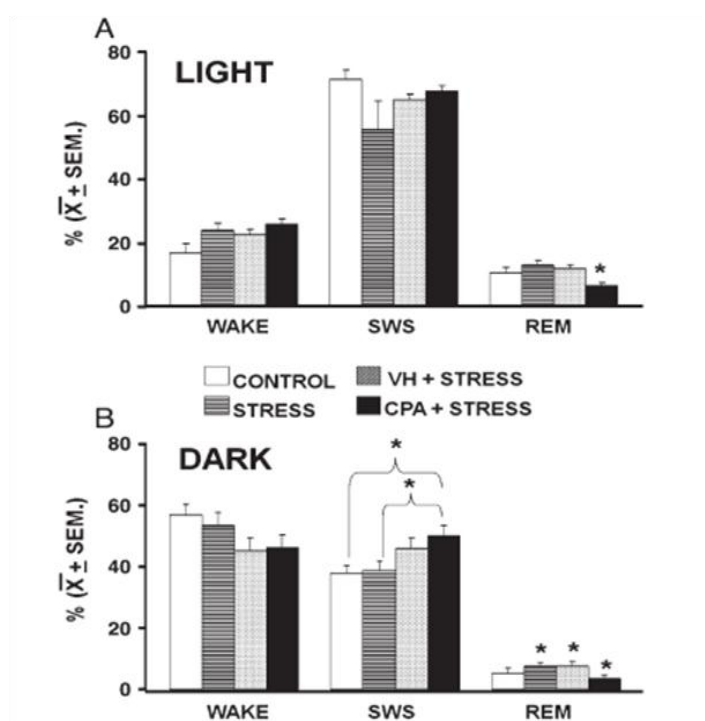


FIGURA 4.7. Esta gráfica muestra los porcentajes de cada una de las etapas del ciclo sueño-vigilia, durante 8 horas consecutivas de registro polisomnográfico. El panel A corresponde al periodo luminoso y el panel B al periodo oscuro. Como se observa se trabajó con 4 grupos de tratamiento, controles intactos, inmovilizados por 2 horas, INMV + vehículo (0.2ml sol. Salina) e INMV+ 20mg/kg de CFA. Se observa el efecto del fármaco en el sueño MOR en el periodo luminoso y la inhibición de su aumento producto de INMV durante el ciclo oscuro. También el bloqueo de los receptores generó aumento en el sueño de ondas lentas (Tomado de Rojas J y cols 2008).

A su vez, se demostró la participación del receptor mu opioidérgico en el aumento de sueño MOR producto de inmovilización, mediante la administración del fármaco antagonista Naltrexona (NTX) administrado antes de la inmovilización. Se observó que su administración bloqueó los cambios inducidos por la inmovilización (Vasquez G y cols 2004), como lo muestra la figura 4.8

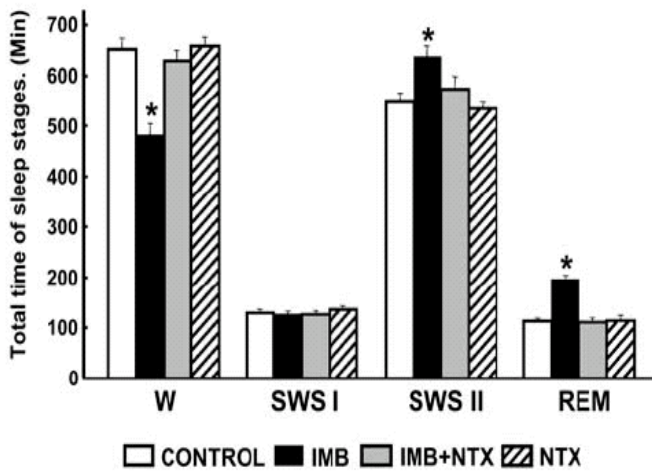
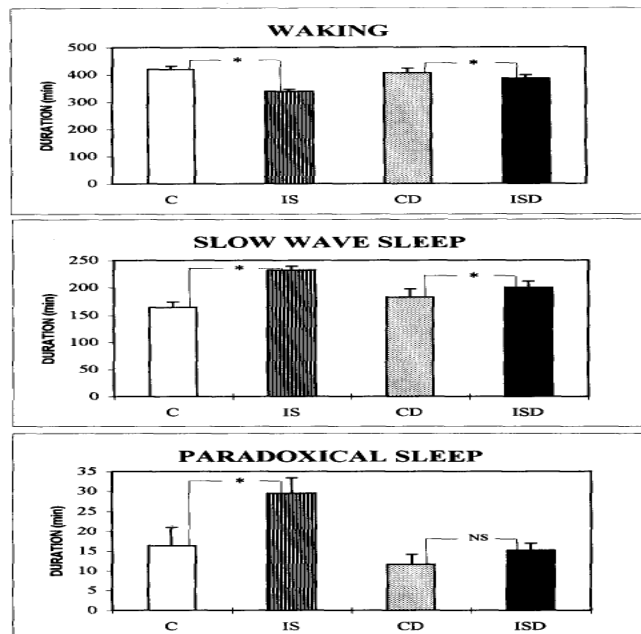


FIGURA 4.8. Esta imagen muestra el tiempo total de sueño luego de la exposición al estrés por inmovilización, y los efectos generados en el patrón del ciclo sueño-vigilia por la administración del fármaco antagonista Naltrexona. Se observa que su administración antes de INMV, inhibe el aumento de sueño MOR generado por la inmovilización. También se observa su participación en la vigilia y en el sueño de ondas lentas. (Tomado de Vázquez y cols 2004)

También se demostró que la exposición de las neuronas noradrenérgicas del Locus Coeruleus a un agente neurotóxico específico, el DSP-4 disminuye el aumento del sueño MOR, luego de 1 hora de estrés por inmovilización, como se observa en la figura 4.9 (Gonzalez M.M y cols 1995).

FIGURA 4.9. Esta figura muestra la duración de cada uno de los estados del ciclo sueño-vigilia registrados durante 10hrs continuas, luego de la administración del neurotóxico de las neuronas del LC DSP-4. Se observa que la administración del neurotóxico generó del sueño MOR producto de estrés por inmovilización. (Tomado de Gonzales C. y cols 1995)



JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es importante dilucidar cuales son los mecanismos que median en las alteraciones de la arquitectura del sueño producto del estrés. Es claro que estos mecanismos son ejercidos por la liberación de ciertos neurotransmisores y hormonas a blancos tanto centrales como periféricos; actualmente, se han investigado algunos neurotransmisores y sus receptores involucrados en los cambios que ejerce el estrés por inmovilización en el patrón del sueño en animales de experimentación, pero aún no se había explorado la participación de la serotonina y en especial de su receptor 5-HT_{1A}, en el efecto que tiene el estrés por inmovilización en el sueño MOR, teniendo en cuenta que la estimulación de este receptor en condiciones normales genera disminución o inhibición en esta fase del sueño. Por lo tanto, en este estudio nuestro interés se centró en evaluar, si al estimular el receptor 5HT_{1A} mediante el uso de un fármaco agonista, se produce la inhibición del aumento de sueño MOR producto del estrés por inmovilización en ratas; lo cual podría ayudarnos a comprender la participación sistema serotoninérgico en la respuesta al estrés en el sueño.

HIPÓTESIS

A partir de lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis:

- La estimulación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} mediante el uso de un fármaco agonista selectivo al receptor, inhibirá el aumento de sueño MOR que se genera luego de someter a la rata a estrés por inmovilización.

OBJETIVOS

- Determinar la participación del receptor serotoninérgico 5HT1a estimulado con el agonista 8-OH-DPAT en el aumento del sueño MOR producto del estrés por inmovilización.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar los porcentajes de Vigilia, SOL y MOR durante las 8 horas de registro, para cada uno de los tratamientos: Control intacto, inmovilización, Inmovilización e inyección del vehículo, Inyección de fármaco agonista selectivo al receptor e Inmovilización y subsecuente inyección del fármaco
- Determinar los periodos de latencia de sueño y de sueño MOR para cada uno de los tratamientos

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar machos adultos de 250 – 350 g de peso corporal. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana sede Iztapalapa. Los animales se confinaron en cajas de acrílico en grupos de 10 ratas por caja aproximadamente dentro del bioterio del área de Neurociencias de la UAM-I y se les mantuvo bajo un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12/12 hrs (se apagan las luces a las 9:00 am y se encienden a las 9:00 pm), con agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo según *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health of the United States of America*, aprobado por el Comité de

Ética para el Cuidado de Animales, de la UAMI. Todas las técnicas experimentales con los animales, se realizaron con la intención de minimizar su sufrimiento.

2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA EL IMPLANTE DE ELECTRODOS

Los animales fueron sometidos a cirugía bajo anestesia general inducida con un coctel anestésico elaborado con: Ketamina, (3.75 mg/100g), Xilacina de 0.19 mg/100g y acepromazine (0.038mg/100g) administrado vía intraperitoneal. Se implantó en el cráneo el juego convencional de electrodos para registro de EEG, que consta de 5 tornillos de acero inoxidable conectados a 5 cables de acero recubiertos con aislante, ubicados de la siguiente manera: cuatro electrodos ubicados entre bregma y lambda, bilateral a la sutura medio-sagital dos en cada hemisferio y el quinto en el hueso frontal el cual cumple como tierra. Para el registro de la actividad eléctrica cerebral y 4 cables de plata, que serán insertados en el músculo de la nuca para el registro de la actividad muscular durante el sueño y la vigilia. Para el registro electromiográfico (EMG), se utilizaron cuatro alambres de plata flexibles y aislados, los cuales fueron insertados a los músculos de la nuca. Todos los cables fueron conectados previamente, a un dispositivo o conector que permitió mantener la separación de los electrodos e hizo conexión entre estos y el dispositivo que se unió al polígrafo el cual registró los trazos del EEG y el EMG. El conector se fijó al cráneo por medio de cemento acrílico para uso dental. Inmediatamente terminada la cirugía el animal fue expuesto a 20 minutos de calor bajo un foco de luz amarilla para su pronta recuperación y confinado a una caja de acrílico individual, con agua y comida *ad libitum*.

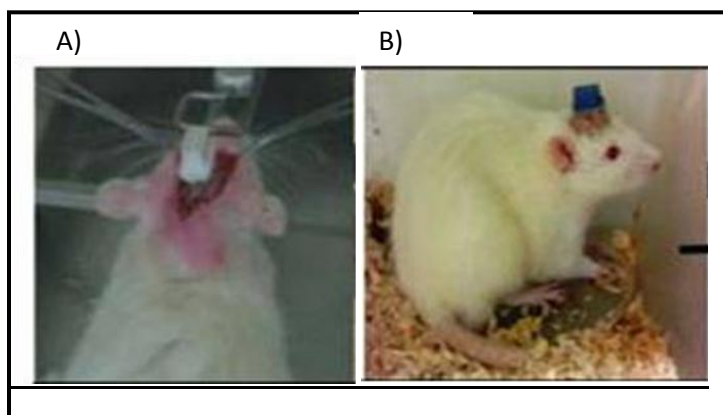


FIG 5.1. Estas imágenes de los animales de experimentación, ilustran A) el proceso quirúrgico en el momento en que el conector ya sido implantado y B) Imagen de una rata una vez terminada la cirugía y en periodo de recuperación. Se observa el conector completamente fijado con cemento acrílico a la cabeza del animal. Tomadas en el laboratorio de Neurociencias de la UAM-I

Luego de 7 días de recuperación el animal fue conectado a un cable que simula el que es empleado durante el registro polisomnográfico (PSG) con el propósito que el animal se habituara a las condiciones en las cuales se llevará a cabo el PSG.

3. FÁRMACO Y TRATAMIENTOS

Para el desarrollo de los tratamientos se utilizó el fármaco 8-hidroxi-2-(di-n-propil-amino) tetranil (8-OH-DPAT), de *Sigma-Aldrich*. Aplicado vía subcutánea en una dosis de 1.0 mg/kg de peso disuelto en 4.0ml de solución salina estéril al 0.9%.

Se realizaron 5 tratamientos diferentes:

- A. Controles intactos:** Este grupo fue conformado por animales que no habían recibido ningún tratamiento previo los cuales fueron conectados para registro polisomnográfico durante 8 hrs continuas, iniciando a la misma hora que en los demás grupos de tratamiento ($n=10$).
- B. Inmovilización y registro:** Este grupo fue conformado por animales que fueron sometidos a 2 horas de estrés por inmovilización dentro de un pequeño tubo cilíndrico de PVC, al inicio del periodo oscuro (9:00 am), según lo propuesto por el grupo de Rampin, Mayo y Velázquez Moctezuma. Al culminar las 2 hrs de INMV, fueron sacados del tubo y conectados para registro polisomnográfico durante 8 hrs continuas ($n=10$).
- C. Inmovilización, inyección del vehículo y registro:** Este grupo fue conformado por animales que fueron inmovilizados 2hrs al inicio del periodo oscuro (9:00 am) y se les inyectó 0.4 ml de solución salina al 0.9%, vía subcutánea inmediatamente después de finalizar el periodo de inmovilización. Luego de la inyección se les conectó para registro polisomnográfico durante 8 hrs continuas. ($n=9$)
- D. Inyección de fármaco 8-OH-DPAT y registro:** A los animales de este grupo se les administro el fármaco agonista a 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT a una dosis de 1.0 mg/kg de peso en 0.4 ml de sol. Salina al 0.9%, vía subcutánea. Este fue inyectado a la misma hora en que termina el periodo de INNV en los demás grupos. Luego fueron conectados para registro polisomnográfico durante 8 hrs continuas. ($n=10$)

E. Inmovilización, inyección del fármaco y registro: Los animales de este grupo fueron sometidos a 2hrs de INMV al inicio del periodo oscuro (9:00 am) y finalizado el tiempo de INMV se les administró vía subcutánea el fármaco agonista a 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT a una dosis de 1.0 mg/kg de peso en 0.4 ml de sol. Salina al 0.9%. Luego fueron conectados para registro polisomnográfico durante 8 hrs continuas. (*n*=10)



FIG 5.2. Foto de uno de los animales de experimentación del laboratorio de Neurociencias de la UAM-I. Nótese como el animal se encuentra totalmente inmovilizado dentro del tubo de acrílico.



FIG 5.3. Esta foto tomada en el laboratorio de Neurociencias de la UAM-I, muestra a la derecha uno de los animales de experimentación conectado al cable para el registro PSG y a la izquierda el polígrafo realizando el correspondiente registro.

4. REGISTRO Y ANALISIS DE RESULTADOS

El registro polisomnográfico del ciclo sueño-vigilia se realizó en papel por medio del polígrafo marca NIHON Kodan. Cada registro tuvo una duración de 8 horas continuas, iniciando a las 11:00 am y finalizando a las 7:00 pm. de los animales. Durante el tiempo

de registro, los animales estuvieron bajo el ciclo de oscuridad dentro del bioterio que permanece bajo ciclo de luz invertido (se apaga la luz a las 9:00am), y permanecieron en su caja individual de acrílico con agua y comida *ad libitum*.

Una vez finalizado el registro polisomnográfico, se llevó a cabo la calificación manual de los mismos y su respectiva medición. Una vez terminada esta fase, cada una de las etapas fueron evaluadas por medio del programa HIPNO el cual fue específicamente desarrollado para tal fin en el área de Neurociencias de la UAMI por la doctora Anabel Jiménez Anguiano.

A partir de los datos arrojados por el programa, se analizaron los porcentajes correspondientes a cada uno de las etapas del ciclo sueño-vigilia: Vigilia, Sueño de ondas lentas y sueño MOR, como también los porcentajes totales de latencia de sueño y latencia de sueño MOR en cada grupo de tratamiento durante las 8 horas de registro.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico del porcentaje promedio de cada una de las etapas del ciclo sueño-vigilia y los porcentajes promedio del tiempo en minutos para la latencia de sueño y la latencia de sueño MOR en cada grupo de tratamiento, se aplicó análisis de varianza ANOVA seguido por la prueba *post-hoc* LSD con un valor de significancia de $p < 0.05$.

Los valores se expresan en las gráficas como la Media \pm E.E (error estándar).

RESULTADOS

PORCENTAJES OBTENIDOS EN CADA ETAPA DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA EN CADA GRUPO DE TRATAMIENTO.

La figura 6.1 muestra los porcentajes de vigilia obtenidos en cada uno de los tratamientos. Se observan diferencias significativas entre el grupo tratado con el fármaco agonista del receptor 5-HT_{1A} y el grupo inmovilizado, únicamente; evidenciándose un aumento significativo de la vigilia luego de la estimulación del receptor 5-HT_{1A}. Valor de significancia $p < 0.05$.

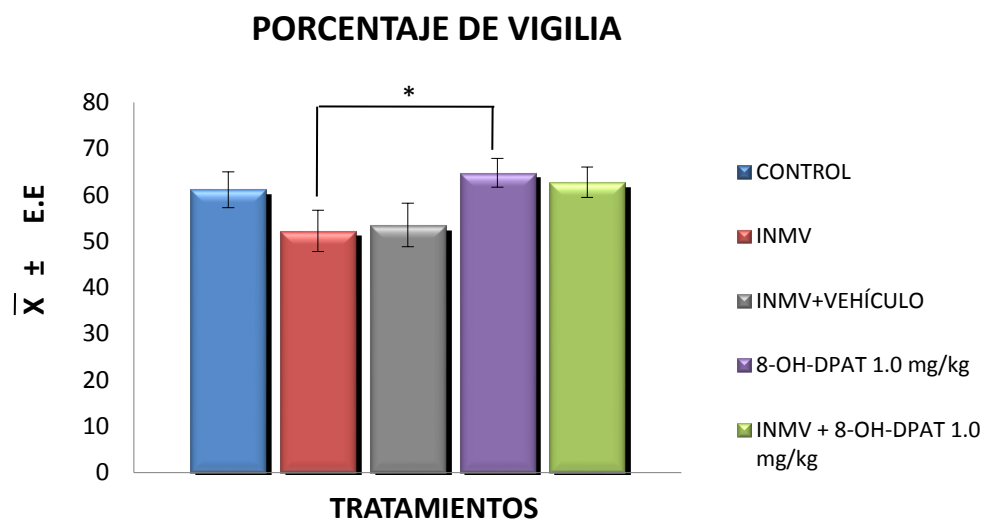


FIGURA 6.1. Esta gráfica muestra el promedio del porcentaje de vigilia obtenidos para cada uno de los tratamientos. Solo se obtuvo diferencias significativas entre el grupo tratado con el fármaco agonista 8-OH-DPAT y el tratado con inmovilización. No se observaron diferencias entre los demás grupos de tratamiento. * $p < 0.05$

La figura 6.2 muestra los porcentajes de sueño de ondas lentas (SOL) obtenidos en cada grupo de tratamiento. Ninguno de los tratamientos generó cambios significativos en el porcentaje de SOL. Se observa un aumento no significativo del sueño de ondas lentas en los grupos tratados con inmovilización e inmovilización más vehículo y una disminución no significativa en los grupos tratados con el fármaco agonista al receptor 5-HT_{1A} como también, en el grupo inmovilizado y tratado con el fármaco agonista.

PORCENTAJE DE SUEÑO DE ONDAS LENTAS

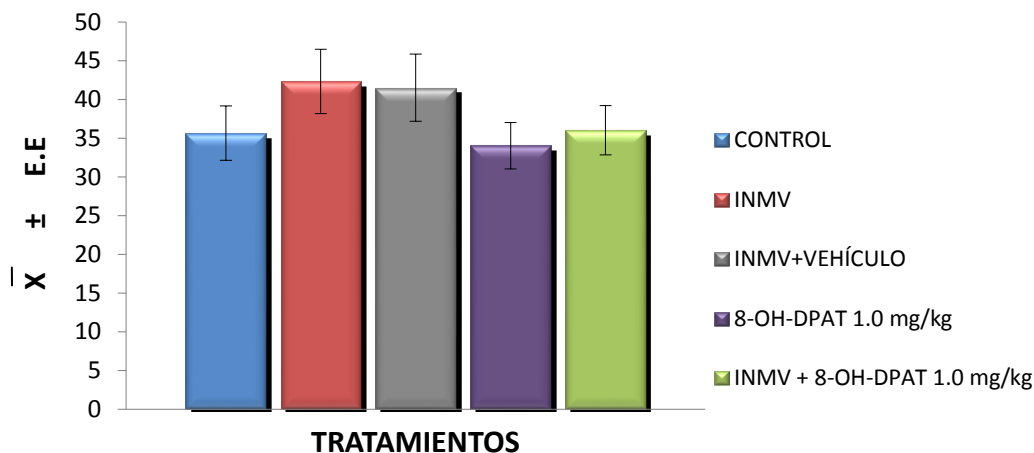


FIGURA 6.2. Se muestran los porcentajes de sueño de ondas lentas obtenidos en cada uno de los tratamientos. No se observan diferencias significativas entre grupos de tratamiento.

La figura 6.3 muestra los porcentajes de sueño MOR obtenidos en cada uno de los tratamientos. Los resultados muestran diferencias significativas entre 3 bloques de grupos de tratamiento divididos en: **a** control intacto, **b** inmovilizado e inmovilizado con vehículo, **c** tratado con el fármaco agonista al receptor 5-HT_{1A} e inmovilizado y tratado con el fármaco agonista. Valor de significancia $p < 0.05$

Se observa un el aumento significativo en el sueño MOR en los grupos inmovilizado por 2 horas e inmovilizado y tratado con el vehículo, en comparación con el grupo control; incremento que es inhibido luego de la estimulación del receptor 5-HT_{1A} con el fármaco agonista al receptor. A su vez se hace evidente la disminución del sueño MOR generada por la estimulación del receptor 5-HT_{1A} en comparación con el grupo control.

PORCENTAJES DE SUEÑO MOR

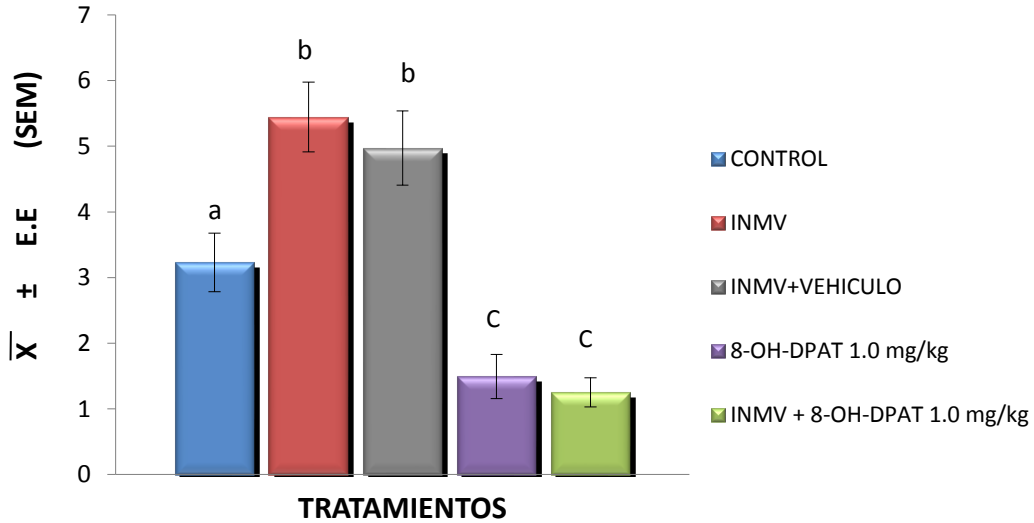


FIG 6.3. Esta gráfica muestra los porcentajes de sueño MOR obtenidos en cada grupo de tratamiento. **a#b#c** $p < 0.05$

PORCENTAJES DE TIEMPO EN MINUTOS OBTENIDOS PARA LA LATENCIA DE SUEÑO Y LA LATENCIA DE SUEÑO MOR.

En la figura 6.4 se observa el promedio de tiempo en minutos para la latencia de sueño en cada uno de los grupos de tratamiento. Se observan diferencias significativas entre el grupo tratado con INMV + el fármaco agonista del receptor 5-HT1A y el grupo control intacto, INMV e INMV + vehículo; La estimulación del receptor serotoninérgico 5-HT1A inmediatamente después de finalizadas las 2 hrs de inmovilización, produce un aumento significativo (alrededor del 116%) en la latencia de sueño en comparación con los demás grupos. Valor de significancia $p < 0.05$.

LATENCIA DE SUEÑO

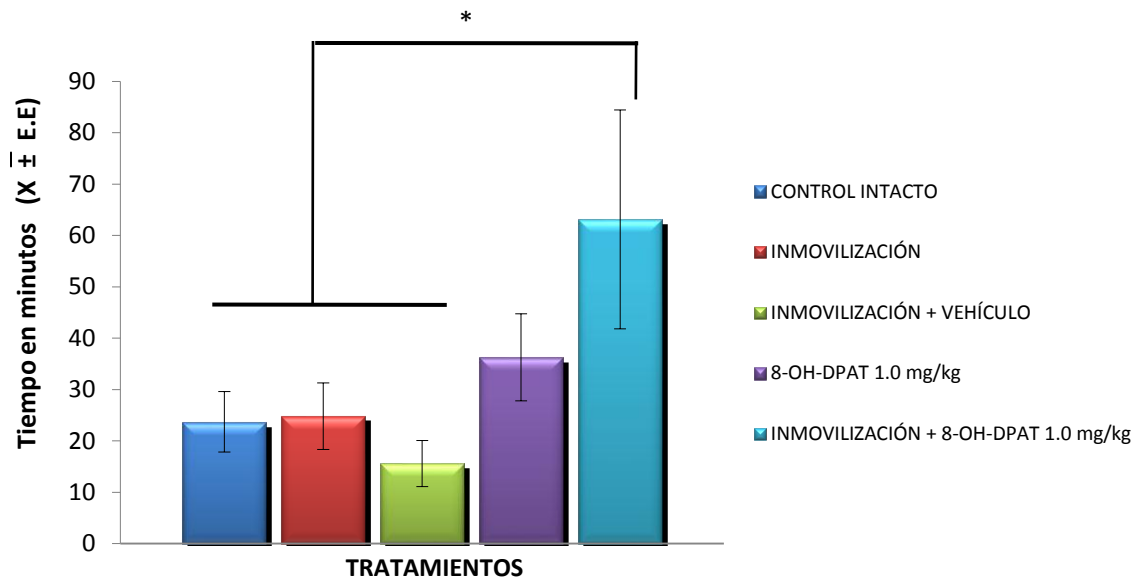


FIG 6.3. Promedio de tiempo en minutos de latencia de sueño obtenidos en cada uno de los tratamientos. $p < 0.05$

En la figura 6.4 se observa el promedio del tiempo en minutos de la latencia de sueño MOR expresada en minutos para cada grupo de tratamiento. La estimulación del receptor 5-HT_{1A} va a generar un aumento significativo de la latencia a sueño MOR en el grupo que solo recibió el fármaco y el grupo tratado con el fármaco inmediatamente después de finalizado el tiempo de inmovilización. Se observa una disminución significativa de la latencia a sueño MOR, en el grupo inmovilizado e inmovilizado más el suministro del vehículo. Valor de significancia $p < 0.05$

LATENCIA DE SUEÑO MOR

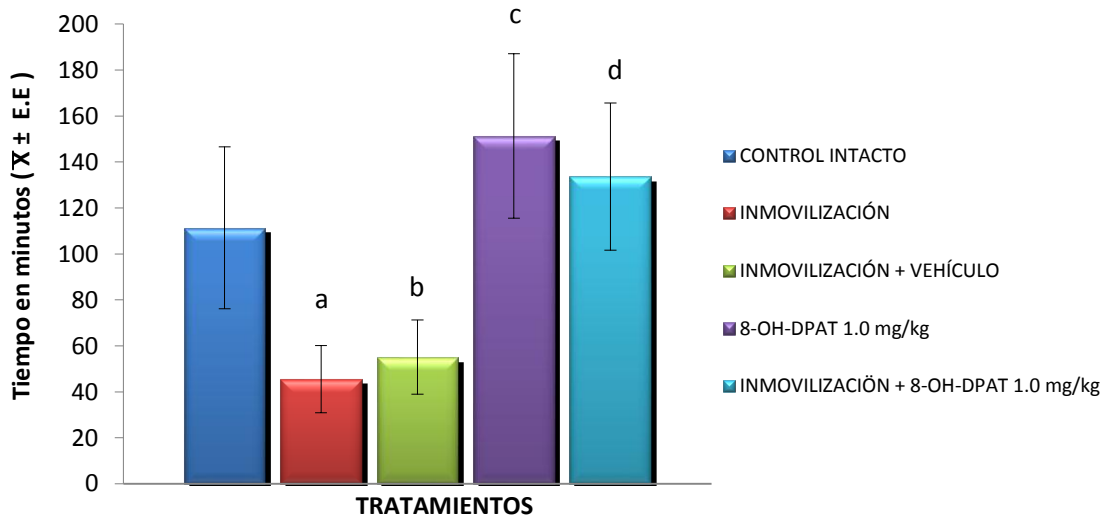


FIG 6.4. Esta figura muestra el promedio del tiempo obtenido de la latencia de sueño MOR expresada en minutos para cada grupo de tratamiento. Se observan diferencias significativas entre grupos, siendo $a \neq c, d$ y $b \neq c$. $p < 0.05$

DISCUSIÓN

EL RECEPTOR SEROTONINERGICO 5-HT1A PARTICIPA EN EL AUMENTO DE SUEÑO MOR PRODUCTO DE ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN.

Como mencionábamos anteriormente, diversos estudios han reportado que al inmovilizar durante 1 o 2 horas a un animal, se produce un aumento significativo del sueño MOR en las subsecuentes horas de registro polisomnográfico (51). Se ha observado que este efecto del estrés en la arquitectura del sueño va a ser determinado por las características del estresor (61), La duración del estrés (30) el momento del ciclo circadiano en el cual se someta el animal al estrés (27) entre otras características.

A su vez es clara participación del receptor 5-HT1A en el sueño MOR, donde su estimulación mediante el fármaco agonista al receptor 8-OH-DPAT, inhibe el sueño MOR al ser administrado vía sistémica y genera aumento en la vigilia (6, 7, 36). Por lo

tanto la disminución significativa del sueño MOR en el grupo tratado con el fármaco agonista al receptor 5-HT1A en comparación del grupo control, es coherente con los hallazgos previamente reportados. Del mismo modo observamos aumento en la vigilia en el grupo tratado con el fármaco agonista en comparación con el grupo inmovilizado por 2 hrs, lo cual también es acorde a los reportes previos.

En nuestro estudio observamos, que efectivamente al someter a las ratas a 2 hrs de estrés por inmovilización durante las dos primeras horas del ciclo de oscuridad, se genera un aumento significativo en el sueño MOR y que este aumento es anulado mediante la estimulación del receptor 5-HT1A con la administración del fármaco agonista 8-OH-DPAT, lo que nos puede indicar la participación de este receptor serotoninérgico en la respuesta fisiológica al estrés en el sueño.

Es posible que esta inhibición del aumento de MOR que se produce debido a estrés por inmovilización, haya sido producto de la estimulación de los receptores postinápticos 5-HT1A que se encuentran en los núcleos colinérgicos PPT y LDT encargados de la producción del sueño MOR, los cuales por estar acoplados a proteína Gi hiperpolarizan a las neuronas colinérgicas inhibiendo la liberación de acetilcolina, lo cual puede estar impidiendo el consecuente aumento de sueño paradójico. De este modo, diversos estudios **(18, 19, 29, 55)** han demostrado la participación de la serotonina y del receptor 5-HT1A postsinápticos ubicados en los núcleos colinérgicos de la región peribraquial, en el inicio y mantenimiento del sueño MOR, los cuales le atribuyen a la 5-HT mediante la estimulación de su receptor postináptico 5-HT1A un rol inhibitorio tanto en la producción o inicio de esta fase del sueño como en su mantenimiento.

A su vez, como mencionamos en los antecedentes, se conoce que las neuronas del NRD liberan 5-HT al núcleo arcuato durante las horas en las que el animal se encuentra inmovilizado, lo cual ocurre en paralelo con la marcada vigilia en el registro polisomnográfico, seguido de un aumento significativo en el sueño MOR; frente a este hallazgo se ha sugerido, que la liberación de 5-HT en el núcleo arcuato no es directamente responsable del subsecuente aumento en el sueño MOR (9), por lo que es posible que este aumento sea producto de la influencia de la 5-HT en la síntesis y liberación de sustancias facilitadoras del sueño MOR en el núcleo arcuato, como lo es CLIP (péptido intermediario similar a la corticotropina) y la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH) (15). Teniendo en cuenta estos hallazgos se puede sugerir que la estimulación de los autorreceptores 5-HT1A del NRD disminuya la síntesis y liberación de 5-HT al núcleo arcuato que se observa durante el tiempo de la inmovilización, pudiendo ocasionar la reducción de la síntesis de las sustancias

facilitadoras del sueño MOR (como CLIP y α -MSH), y de este modo inhibir el aumento de sueño MOR producto del estrés por inmovilización, como se observa en el grupo de animales inmovilizados seguido de la administración del fármaco agonista 8-OH-DPAT.

EL RECEPTOR 5-HT1A PARTICIPA EN EL AUMENTO EN LA LATENCIA A SUEÑO Y EN LA LATENCIA A SUEÑO MOR.

En los resultados observamos un aumento en la latencia a sueño MOR en los grupos de animales tratados con el fármaco agonista 8-OH-DPAT y en el que fue sometido a inmovilización y posteriormente inyección del fármaco agonista 8-OH-DPAT. Es posible que este aumento en la latencia a MOR haya sido producto de la estimulación de los receptores postsinápticos 5-HT1A ubicados en los núcleos LDT y PPT, la cual hiperpolariza estas neuronas generar un retardo en el inicio del sueño MOR durante las subsecuentes horas de registro.

Se ha reportado la presencia del receptor postsináptico 5-HT1A en las neuronas de algunos de los núcleos hipotalámicos encargados del inicio y mantenimiento del sueño, como lo son el área preóptica y el hipotálamo anterior (31). Como mencionábamos anteriormente los receptores 5-HT1A se encuentran acoplados a proteínas G inhibitorias, por lo tanto es posible que su estimulación mediante el fármaco agonista 8-OH-DPAT haya generado la inhibición de las neuronas de los núcleos hipotalámicos encargados del inicio del sueño produciendo el aumento en la vigilia que se observa en el grupo tratado con el fármaco 8-OH-DPAT y a su vez haber anulado el efecto de acortamiento que produce la inmovilización en la latencia a sueño, retrasando el inicio del sueño como se observa en el grupo tratado con inmovilización seguida de la estimulación del receptor 5-HT1A.

APORTES QUE BRINDA ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Consideramos que este proyecto de investigación, aporta al conocimiento del papel que cumple la serotonina en la alteración en el patrón de sueño producto del estrés, ya que hasta hoy es conocido el papel que cumplen ciertos neurotransmisores por medio de receptores específicos en el aumento de sueño MOR generado por estrés por inmovilización. Entre estos están, la noradrenalina (18), la histamina por medio de su receptor H1 (53), el sistema opioide mediante el receptor mu opioide (58). Pero aún no se había estudiado mediante que receptores la serotonina participa en el aumento de MOR por inmovilización, y en especial evaluar si es su acción por medio

del receptor 5-HT_{1A} el cual se ha reportado que juega un papel importante en la generación del sueño MOR tanto a nivel presináptico como postsináptico en blancos específicos responsables de la producción de las etapas del sueño. Por lo tanto consideramos que este es un aporte importante que brinda este proyecto al conocimiento del efecto del estrés en el patrón del sueño.

Consideramos que el aumento significativo en la latencia de sueño MOR tanto en el grupo que solo fue tratado con el fármaco agonista a 5-HT_{1A} y el grupo inmovilizado y tratado con el fármaco, nos brinda luces para suponer que este receptor serotoninérgico esté jugando un rol en la inhibición del inicio del sueño MOR tanto en condiciones normales como anulando la respuesta en la latencia a sueño MOR en la respuesta al estrés por inmovilización.

También consideramos que los resultados obtenidos para la latencia de sueño en el grupo tratado con inmovilización y el fármaco agonista a 5-HT_{1A} a diferencia del grupo inmovilizado, donde en el primer grupo el inicio del sueño presenta un retardo significativo, da un aporte sobre la participación del receptor 5-HT_{1A} en el inicio del sueño luego del estrés por inmovilización, donde es posible que la inactivación de estos receptores una vez terminado el tiempo de inmovilización, tenga un papel importante en la disminución de la latencia a sueño que se ha reportado en estudios luego de someter al animal a estrés por inmovilización.

SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS EN LA TEMATICA.

Con el fin de conocer a mayor profundidad el papel de la serotonina en la respuesta al estrés por inmovilización en el sueño, consideramos importante profundizar un poco más por medio de que otros receptores la serotonina está participando en este proceso. Por lo tanto sugerimos que en futuros trabajos de investigación se evalúe la participación de otros receptores de serotonina que se conozca cumplan un rol en la producción del sueño MOR como lo son el receptor 5-HT₂ y el receptor 5-HT₇, mediante su estimulación o bloqueo con fármacos específicos.

Ya observamos como el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} mediante su estimulación está participando en la respuesta al estrés en el sueño, por lo que podemos sugerir evaluar que ocurre en la arquitectura del sueño luego de estrés por inmovilización con el bloqueo del receptor mediante fármacos antagonistas.

A su vez, sugerimos evaluar distintas dosis del fármaco 8-OH-DPAT luego de inmovilizar por 1 ó 2 horas al animal, tanto vía subcutánea como localizada en el NRD, en los núcleos colinérgicos de la región peribraquial y en el núcleo arcuato con el fin de comprender a mayor profundidad, mediante que vías de neurotransmisión participa la 5-HT por medio de la activación de su receptor 5-HT1A en el aumento de sueño MOR producto de estrés por inmovilización.

CONCLUSIONES

De este proyecto de investigación podemos concluir que:

1. La estimulación del receptor 5-HT1A seguido de estrés por inmovilización, no genera cambios significativos en la vigilia o en el sueño de ondas lentas; su participación es exclusiva de los mecanismos neurales del sueño MOR.
2. El receptor serotoninérgico 5-HT1A participa en el aumento de sueño MOR producto de estrés por inmovilización, anulando su respuesta en el aumento de sueño MOR.
3. La estimulación del receptor 5-HT1A seguido de estrés por inmovilización, anula el efecto del estrés en la latencia a sueño de ondas lentas.
4. La estimulación del receptor 5-HT1A seguido de estrés por inmovilización, anula el efecto del estrés en la latencia a sueño MOR.

REFERENCIAS

1. Amici R., Sandford L.D., Kearney K., McInerney B., Ross R.J, Horner R.L., Morrison A. A serotonergic (5-HT₂) receptor mechanism in the laterodorsal tegmental nucleus participates in regulating in the pattern of rapid eye-movement sleep occurrence in the rat. *Brain Research*. 2004. 996: 9-18.
2. Ambrosini M, Sadile A, Girone A, Carnevale U, Mattiaccio M, Giuditta A. The sequential hypothesis: I evidence that the structure of sleep depends on the nature of the previous waking experience. *Physiology Behavior*. 1988. 43: 325 – 337.
3. Appelboom-Fondu J, Kerkhops M, Melndelwick J. Depression in adolescents and young adults. Polysomnographic and neuroendocrine aspects. *Journal Affective Disorders*. 1988. 4: 35-45
4. Baubet V, Fe`vre-Montange M, Gay N, Debilly G, Bobillier P, Cespuglio R, Effects of an acute immobilization stress upon proopi-melanocortin _POMC. mRNA levels in the mediobasal hypothalamus:a quantitative in situ hybridization study, *Molecular Brain Research*. 26 1994. 163–168.
5. Bjorvatn B, Snorre F, Eid T, Reidun U. Sleep/waking effects of a selective 5-HT_{1A} receptor agonist given systemically as well as perfused in the dorsal raphe nucleus in rats. *Brain Research*. 1997. 770:81-88
6. Boutrel B, Monaca C, Hen R, Hamon M, Adrien J. Involvement of 5HT_{1A} Receptors in Homeostatic and stress – induced adaptative regulations of paradoxical sleep: studies in 5HT_{1a} Knock – Out Mice. *Journal of Neurosciences*. 2002. 22: 4686 – 92.
7. Cespuglio R, Marinesco S, Baubet V, Bonnet C, el Kafi B. Evidence for a sleep-promoting influence of stress. *Advantage Neuroimmunology* 1995. 5: 145 – 54.
8. Cespuglio R, Sarda N, Gharib, A, Houdini F, Jouvet M. Voltammetric detection of the release of 5-Hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. *Experimental Brain Research*. 1990. 80: 121-128.
9. Cheeta S, Ruigt G, Vanproosdij J, Willner P. Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biological Psychiatry*. 1997. 41: 419 – 27.

10. Cooper JR, Bloom FE, Roth R. Biochemical Basis Of Neuropharmacology, 8 edición. Oxford University Press. 2003. Pag: 217.
11. Culebras A. Clinical Handbook of Sleep Disorders. 1996. Butterworth – Heinemann.
12. Duarte B, Suchecki D, Tufik S. Differential effects of acute cold and foot shock on the sleep of rats. Brain Research. 2000. 861:97-104.
13. Denoyer M, Sallanon M, Kitahama K, Aubert C, Jouvet M. Reversibility of para-chlorophenylalanine induced insomnia by intrahypothalamic microinjection of L-5-hydroxytryptophan. Neurosciences. 1989. 28: 83-94.
14. Drucker R. The function of sleep is to regulate brain excitability in order to satisfy the requirements imposed by waking. Behavioral Brain Research. 2000. 69.1-2: 117-124
15. El Kafi B, Cespuglip R, Lergier L, Marinesco S, Jouvet M. Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides possessing hypnogenic properties. Brain Research 1994. 637: 211-221
16. Fort P, Bassetti C.L, Luppi P-H. Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. European Journal of Neuroscience. 2009. 29:1741-1753.
17. Gonzalez, M.M, Debilly G, Valatx J.L, Jouvet M. Sleep increase after immobilization stress: role of the noradrenergic locus coeruleus system in the rat. Neuroscience Letters. 1995. 202:5-8.
18. Hobson J.A. McCarley R.W, Wyzinski P.W. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. Sciences 1975. 189(1975) 55-58).
19. Honda T, Semba K. Serotonergic synaptic input to cholinergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. Brain Research. 1994. 647: 299-306
20. Horner R, Sandford L, Annis D, Pack A, Morrison A. Serotonin at the laterodorsal tegmental nucleus suppresses rapid-eye-movement sleep in freely behaving rats. Journal of Neurosciences. 1997. 17: 7541 – 52.
21. Houdouin F, Cespuglio R, Gharib A, Sarda N, Jouvet M. Detection of the release of 5-Hydroxyindole compounds in the hypothalamus and the n. raphe dorsalis

- throughout the sleep-waking cycle and during stressful situations in the rat: a polygraphic and voltammetric approach. *Experimental Brain Research*. 1991. 85: 153-162
22. Houdouin F, Cespuglio R, Jouvet M. Effects induced by the electrical stimulation of the nucleus raphe dorsalis upon hypothalamic release of 5-Hydroxyindole compounds and sleep parameters in the rat. *Brain Research*. 1991. 565: 48-56
23. Jiménez A, Velázquez J. Mecanismos neurofisiológicos del sueño. Capítulo del material del VI diplomado en polisomnografía., Sociedad Mexicana para la investigación y medicina del sueño. 2010.
24. Jouvet M. Sleep and Serotonin: An Unfinished Story. *Neuropsychopharmacology*. 1999. 21, No. 2S: 24S-27S
25. Kawakami F, Okamura H, Fukui K, Yanaihara C, Yanaihara N, Nakajima T, Iyata Y. The influence of serotonergic inputs on peptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: An immunocytochemical study. *Neurosciences Letters* 1985. 61: 273-277.
26. Kandel E. *Principles of Neural Sciences*. 4th Edition. Cap 47. McGraw Hill. 2000.
27. Koehl M, Bouyer J.J, Darnaudéry M, Le Moal M, Mayo W. The effect of restraint stress on paradoxical sleep is influenced by the circadian cycle. *Brain Research* 2002. 937: 45-50.
28. Kant G, Pastel R, Bauman R, Meininger G, Maughan K, Robinson T, Wright W, Covington P. Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiology & Behavior*. 1995. 57: 359 – 65.
29. Luebke J.I, Greene R.W, Samba D, kamondi A, McCarley R.W, Reiner P.B. Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of America*. 1992. 89: 743-747.
30. Marinesco S, Bonnet C, Cespuglio R. Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: a possible role for corticosterone. *Neurosciences*. 1999; 92, 3: 921 – 33.

31. Marvin E, Scrogin K, Duda's B. Morphology and distribution of neurons expressing serotonin 5-HT_{1A} receptors in the rat hypothalamus and the surrounding diencephalic and telencephalic areas. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2010. 39: 235-241.
32. McGinty D.J, Harper R.M. Dorsal raphe neurons: Depression of firing during sleep in cats. *Brain Research*. 1976. 101: 569-575.
33. McGinty D, Szymusiak R. Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep. *Trends in Neurosciences*. 1990; 13: 480 – 487.
34. Mellman TA, Bustamante V, Fins AI, Pigeon WR, Nolan B. REM sleep an the early development of posttraumatic stress disorders. *American Journal of Psychiatry*. 2002; 159:1696-1701.
35. Méndez M. Prospero O. Mecanismos neurohumorales del sueño I. Capítulo del VI diplomado en polisomnografía , Sociedad Mexicana para la investigación y medicina del sueño. 2010.
36. Monti J.M, Jantos H. Dose dependent effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on sleep and wakefulness in the rat. 1992. 1: 169-175
37. Monti J.M, Leopoldo M, Jantos H. The serotonin 5-HT₇ receptor agonist LP-44 microinjected into the dorsal raphe nucleus suppresses REM sleep in the rat. *Behavioral Brain Research*. 2008. 22; 184-9
38. Monti J.M., Monti D. Role of dorsal raphe nucleus serotonin 5-HT_{1a} receptors in the regulation of REM sleep. Minireview. *Life sciences*. 2000; 66, 21: 2000-2012.
39. Ojeda J.L, Ricardo J.M. Neuroanatomía Humana, aspectos funcionales y clínicos. Pag 47. Masson. 2004.
40. Papale L.A, Andersen M.L, Antunes, T.A.F, Alvarenga, S. Tufik. Sleep pattern in rats under different stress modalities. 2005. *Brain Research*. 1060; 47-54.
41. Perez- padilla R. La medicina del sueño, evolución histórica y concepción actual. Trastornos del dormir. McGraw Hill. Segunda edición. 2009.

42. Popa D, Yacoubi M, Vaugeois JM, Hamon M, Adrien J. Homeostatic regulation of sleep in a genetic model of depression in the mouse: Effects of muscarinic and 5HT1a receptor activation. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 1637-46
43. Portas C.M , Thakkar M, Rainnie D, McCarley R.W. 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. 1996. *Journal of Neurosciences*. 16: 2820-2828
44. Pérez R, Salín R, Valencia M, Castorena A. Capítulo 1, La medicina del sueño, evolución histórica y situación actual. *Trastornos del dormir*. Segunda edición. 2009 McGraw Hill.
45. Prospéro O, Montes C, Guzmán K, Herrera A, Rueda P, Soria E, Prospéro A, Navarro L. Capítulo Neuroquímica del Sueño. *Trastornos del dormir*. McGraw Hill. Segunda edición. 2000
46. Purves D. *Neurosciences*. Cap 6, 23. 2004. Sinauer associates incorp. 3ed. CAPITULOS
47. Rampin C, Cespuglio R, Chastrette N, Jouvet M. Immobilization stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. *Neurosciences Letters*. 1991; 126: 113 – 18.
48. Reinoso F, Andrés I, Rodrigo M.L, Garzón. *Sleep Medicine Review*. 2001. 5.1:63-77
49. Riou R, Cespuglio R, Jouvet M. Endogenous peptides and sleep in the rat. III. The hypnogenic properties of vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides*. 1982. 2: 265-277
50. Rojas J, Leon E, Jimenez A, Cintra L, Mendoza M, Velazquez J. The histamine receptor blocker, chlorpheniramine, completely prevents the increase in REM sleep induced by immobilization stress in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2008.
51. Sallanon M, Buda C, Janin M, Jouvet M. Serotonergic mechanisms and sleep rebound. *Brain Research*. 1983. 268: 95-104.

52. Sanford L, Ross R, Seggos A, Morrison A, Ball W, Mann G. Central Administration of Two 5-HT Receptor Agonists: Effect on REM Sleep Initiation and PGO Waves. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1994. 49: 93-100.
53. Salin- Pascual R. *Neuroanatomía y neurofisiología del sueño. Trastornos del dormir*. McGraw Hill. Segunda edición. 2009.
54. Siegel J. *The neural control of sleep and waking*. Springer.2002.
55. Vasquez G, Retana S, Bonilla H, Velazquez J. Stress induced REM sleep increase is antagonized by naltrexone in rats. *Psychopharmacology*. 2004; 171: 186 – 190.
56. Vasquez G, Velazquez J. Effect of electric foot shocks, immobilization, and corticosterone administration on the sleep – wake pattern in the rat. *Physiology & Behavior*. 2000; 71: 23 – 28.
57. Velázquez J, Teran G. Sueño Normal. Material del VI diplomado en polisomnografía. Sociedad Mexicana para la investigación y medicina del sueño. 2010
58. Velazquez J, Dominguez E, Cruz M.L. The effect of prenatal stress on adult sexual behavior in rats depends on the nature of the stressor. *Physiology Behavior*. 1993. 53: 443-448.
59. Takeuchi E. Polygraphical study on the wakefulness-sleep cycle of the rat. *Japanese Journal of Psychology*. 1970. 41:248-256