



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**RELACIÓN ENTRE EL SUEÑO Y LA RESPUESTA INMUNE DURANTE LA
INFECCIÓN POR *Trichinella spiralis*.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. ELIZABETH GUADALUPE IBARRA CORONADO

BAJO LA TUTORIA

DR. JORGE MORALES MONTOR

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA.

Departamento de Biología de la Reproducción,
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, DICIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la gran Casa de Estudios por haber permitido culminar mi formación como investigadora, por haberme brindado la oportunidad de desarrollarme personal y profesionalmente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme llevar a acabo la ardua labor que requiere toda investigación y brindarme las facilidades para concluirla.

Al Dr. Jorge Morales Montor, por permitirme desarrollar de este proyecto y por haberme acogido en su laboratorio.

A mi comité tutorial, al Dr. Ignacio Camacho Arroyo y Dr. Javier Velázquez Moctezuma, por su ardua labor al dirigirme, por la paciencia, sus consejos y por su apoyo e interés a lo largo de este camino.

Al quienes sin ser tutores contribuyeron de manera significativa a mi formación académica y personal. Al Dr. Armando Pérez Torres a quien le debo el gusto por la morfología y quien siempre tuvo tiempo para mis dudas y siempre me orientó; al Dr. Jesús Hernández Falcón de quien he aprendido los principios y los valores de la investigación, por darme la oportunidad de desarrollarme en la docencia y sobre todo por ser un mentor; al Dr. Reyes Haro quien me abrió nuevos caminos caminos en el área de la investigación, me ha impulsado en el desarrollo profesional y por brindarme su amistad, Al Dr. Pedernera y a la Dra. Carmen Méndez de quienes aprendí que en la investigación también es importante tener valor, humildad y lealtad. A todos ellos, quienes han aportando mucho valor a la estudiante que culmina sus estudios, por ser un gran ejemplo a seguir, compartir sus conocimientos y haberme regalado su tiempo y su confianza.

A la histotécologa Verónica Rodríguez Mata por haberme enseñado todo lo que sé en técnicas histológicas, por el tiempo que le dedico a este trabajo, por ser siempre una fuente de soluciones, y sobre todo por su invaluable amistad.

Al técnico laboratorista Ricardo Hernández Trujillo por que siempre tuvo la disposición de ayudarme, y sobre todo por brindarme su amistad.

A las Técnico Académicos Ivonne Sánchez e Irma López por haberme brindado su orientación en histología e inmunohistoquímica , y sobre todo por ofrecerme su amistad

A la MVZ. Georgina Díaz y al MVZ Jorge García por su valioso apoyo en la asistencia del manejo de los animales a lo largo de este proyecto, y por ser unas magnificas personas que me han regalado su amistad.

A quienes me acompañaron a lo largo de este camino, me brindaron su ayuda y su amistad Rosalia, Nelly, Itzli, Ricardo, Angie, Nancy, Valeria, Hugo y mi querida amiga Anita, y de otros laboratorios a Toñito y Enrique con quienes aprendí mucho y siempre me han apoyado. A todos muchas gracias por hacer de esta estancia divertida, por los grandes momentos que construimos juntos y por permitirme ser parte de ese pedazo sus vidas.

A quienes desde hace mucho estuvieron acompañándome y perduraron, a los QFBs. Antonio Fajardo y Omar Gómez, por que a pesar de tiempo me siguieron acompañando y apoyando en este trayecto.

A la parte más importante de mi vida, mi familia.

A mis hijos, A Max por ser la razón de la felicidad y a quién viene en camino por ser un nuevo aliciente y llenar mi vida de alegría. A mis padres, a mi madre por que siempre me brindo su apoyo incondicional, por ser un ejemplo de fortaleza, por que sin ella no hubiera podido tener este gran logro, a mi padre que siempre me apoyo, a mis abuelos, por que siempre cuidaron de mi, a mis hermanos Joanna y Hugo por estar siempre a mi lado y ser incondicionales, a mi tío Beto por haberme cuidado y seguir cuidando de mi.

A la Facultad de Medicina que me ha acogido como un miembro de su comunidad, por la oportunidades que me brindo y por ser un lugar de puertas abiertas.

Dedicatorias

A mis hijos,

A Max por ser la razón de la felicidad y a Santiago por ser un nuevo aliciente,

A ambos por llenar mi vida de alegría y felicidad.

A mis padres,

a mi madre un ejemplo de fortaleza,

a mi padre que siempre me apoyo,

A mis abuelos, los viejos que siempre me cuidaron.

RESUMEN

El sueño se considera un predictor de la inmunidad, por lo que la falta de sueño puede afectar a la respuesta inmune, y hacernos susceptibles para contraer una infección. La privación del sueño produce cambios en el comportamiento de poblaciones celulares y de moduladores del Sistema Inmune, además de que produce una disminución en la generación de anticuerpos contra la hepatitis A. El objetivo de este trabajo fue establecer evidencias de la modulación de la relación bidireccional entre el sueño y la respuesta inmune durante la infección producida por *Trichinella spiralis*. Para ello estudiamos las alteraciones producidas por la privación de sueño sobre el reclutamiento celular a nivel sistémico (bazo) y local (ganglios linfáticos mesentéricos y mucosa intestinal), además de estudiar el efecto que tiene la respuesta inmune frente a *Trichinella spiralis* sobre el patrón de sueño.

Debido a que la privación de sueño se encuentra aunada a la generación de estrés, se incluyó un control de estrés. Nuestros resultados demuestran que la privación de sueño y el estrés tienen un efecto diferencial en los ganglios linfáticos mesentéricos, en el bazo y en las diferentes zonas de la mucosa intestinal, es decir que el efecto depende del tejido y que estos pueden responder a ambas condiciones de forma diferente en presencia de infección.

Los resultados presentados demuestran que las poblaciones analizadas responden diferente en la condición de Privación de Sueño y de estrés, y que su comportamiento difiere cuando además son infectadas.

Cuando se evaluó el efecto de la infección sobre el patrón de sueño, encontramos que solo el sueño de ondas lentas se ve modificado a los 5 días de infección con *Trichinella spiralis*.

Estos hallazgos sugieren que la respuesta inmune generada contra la infección se ve afectada cuando se altera el patrón de sueño, por lo que los resultados del presente estudio sustentan la teoría de que el sueño es un proceso fundamental que es capaz de modular la respuesta inmune generada contra el parásito *Trichinella spiralis*, y que a su vez el patrón de sueño puede ser modificado por la presencia de una respuesta inmune, es nuestro caso la generada por la infección por *Trichinella spiralis*, para mantener la homeostasis.

ABSTRACT

Sleep is considered a predictor of immunity, so lack of sleep can affect the immune response, and make us susceptible to acquire infection. Sleep deprivation causes changes in the behavior of immune system's cell populations and modulators, in addition produces a decrease in the antibodies against hepatitis A. The objective of this study was to establish evidence of the bidirectional relationship modulation between sleep and the immune response during infection by *Trichinella spiralis*. For this study, the alterations caused by sleep deprivation on cell recruitment at systemically (spleen) and local (mesenteric lymph nodes and intestinal mucosa) was analyzed, in addition we studied the effect of the immune response against *Trichinella spiralis* on the pattern sleep.

Because sleep deprivation is coupled with the generation of stress, stress group was included. Our results demonstrate that sleep deprivation and stress have a differential effect on the mesenteric lymph nodes, spleen and in different parts of the intestinal mucosa, that is that the effect depends on the tissue and these can respond to both conditions differently in the presence of infection.

The results presented show that the analyzed populations respond differently in the condition of sleep deprivation and stress, and that its behavior differs when they are also infected.

When the effect of infection on the sleep pattern was evaluated, we found that only slow-wave sleep is modified after 5 days of infection with *Trichinella spiralis*.

These findings suggest that the immune response generated against infection affected when the sleep pattern is disturbed, so that the results of this study support the theory that sleep is a fundamental process that is able to modulate the immune response mounted against *Trichinella spiralis*, and which in turn sleep pattern may be modified by the presence of an immune response is generated by our case *Trichinella spiralis* infection, to maintain homeostasis.

Keywords: sleep deprivation, immune response, infection, stress, immunologic cells.

INDICE

1. Antecedentes
 - 1.1 El Sueño
 - 1.1.1 Fisiología del sueño
 - 1.1.2 Neurobiología del sueño
 - 1.1.3 Las funciones del sueño
 - 1.1.4 Privación de sueño
 - 1.1.5 El estrés y el sueño
 - 1.2 El Sueño y la regulación del Sistema Inmune
 - 1.2.1 Efectos de la Privación de sueño sobre el Sistema Inmune
 - 1.3 Efecto del Sistema Inmune sobre el sueño.
 - 1.3.1 El Sueño durante la infección
 - 1.3.2 El sueño durante infecciones parasitarias
 - 1.4 *Trichinella spiralis*
 - 1.4.1 Ciclo de vida
 - 1.4.2 Cuadro clínico
 - 1.4.3 Respuesta inmune asociada a la infección entérica.
 - 1.4.4 Epidemiología y distribución geográfica.
 - 1.5 La Mucosa Intestinal
 - 1.5.1 Estructura y organización de la mucosa.
 - 1.5.2 Histofisiología de las células de la mucosa Intestinal
 - 1.5.2.1 Eosinófilos
 - 1.5.2.2 Células cebadas
 - 1.5.2.3 Células dendríticas
 - 1.5.2.4 Células caliciformes
 - 1.5.2.5 Células enteroendocrinas
 - 1.5.2.6 Células de Paneth
2. Justificación
3. Hipótesis
4. Objetivos
 - 4.1 Objetivo General
 - 4.2 Objetivos Particulares

5. Materiales y Métodos

5.1 Estrategia experimental por objetivos

5.2 Ensayos de privación de sueño

5.2.1 Animales y grupos de experimentación

5.2.2 Privación de Sueño

5.3 Ensayos de Registro de Sueño

5.2.1 Animales y grupos de experimentación

5.2.2 Implantación de electrodos para registro de sueño

5.2.3 Registros polisomnográfico

5.4 Infección

5.4.1 Obtención del parásito

5.4.2 Infección

5.4.3 Determinación de carga parasitaria

5.5 Determinación de corticosterona

5.6 Citometría de Flujo

5.7 Histología e histoquímica

5.8 Análisis estadístico y procesamiento de datos

5.8.1 Ensayos de Privación de sueño

5.8.2.Registros de sueño

5.9 Declaración de bioética

6. Resultados

6.1 Privación de sueño

6.1.1 Carga parasitaria

6.1.2 Determinación de corticosterona

6.1.3 Porcentajes celulares en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos

Linfocitos T (CD3⁺)

Linfocitos T cooperadores (CD3⁺CD4⁺)

Linfocitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺)

Linfocitos B (CD45⁺)

Células NK (NK1.1⁺)

Análisis de correspondencias múltiples (MCA)

6.1.4 Análisis del reclutamiento celular en la mucosa intestinal

Eosinófilos

Células cebadas

Células enteroendocrinas

Células caliciformes

6.2 Efecto de la Infección por *Trichinella spiralis* sobre el patrón de sueño

7. Discusión

8. Conclusiones

9. Bibliografía

Apéndice 1: Publicaciones derivadas del proyecto

1. ANTECEDENTES

1.1 EL SUEÑO

1.1.1 FISIOLÓGÍA DEL SUEÑO

El sueño constituye una función sumamente compleja, esencial para todos los seres vivos y ocupa una gran parte en el período de vida de los mismos, en el hombre se calcula que el tiempo que pasa durmiendo es la tercera parte de su vida.

El sueño es un proceso fundamental para los animales y puede definirse como un estado de inmovilidad que se caracteriza por la disminución en la percepción del medio externo conservando ciertas funciones y que se diferencia de estado de coma porque es rápidamente reversible. Una característica adicional del sueño es que cuando este se priva, el organismo tiende a recuperarlo; la existencia de este “rebote” de sueño después de su privación hace pensar que el sueño no es un simple periodo donde la actividad o el estado de alerta se encuentran reducidas [1, 2], si no, que por el contrario es un proceso vital que puede modular varias funciones fisiológicas.

El conocimiento sobre los mecanismos y funciones del sueño se comenzó a estudiar a principios del siglo XX. Experimentos previos en animales ya habían demostrado que el sistema nervioso generaba actividad eléctrica, aún así, fue hasta que Hans Berger desarrolló la técnica del registro encefalográfico (EEG), el cuál registra las variaciones del voltaje generadas por el sistema nervioso central, [3] cuando comenzó a entenderse un poco de su fisiología.

En mamíferos y aves el sueño se asocia a patrones electroencefalográficos corticales específicos, los cuales hacen posible dividir al sueño en sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y sueño no-MOR [4], ó REM y NREM por sus siglas en inglés. Sin embargo, el sueño también presenta características conductuales específicas que hacen posible su estudio en organismos vertebrados, entre las que se encuentran la adopción de una postura de reposo específica o estereotipada, mantenimiento de una inmovilidad conductual, incremento del umbral para responder a estímulos externos cada vez más intenso que puede reflejar la profundidad del sueño y la reacción de despertar cuando ocurren estímulos de cierta intensidad [5].

La clasificación de las etapas de sueño se basa en las características electroencefalográficas (EEG), en la actividad del electromiograma (EMG) y en la actividad del oculograma (EOG). La actividad electroencefalografica (EEG) presenta oscilaciones tanto en su frecuencia como en su voltaje, dependiendo del estado de atención del sujeto. La actividad del EEG se clasifica por su frecuencia en

ciclos por segundo (hertz=Hz), amplitud (microvoltios, μV), y forma. Los tipos de frecuencia del EEG descritos clásicamente son: delta (<4 Hz), theta (4-7 Hz), alfa (8-13 Hz) y beta (>13 Hz). Las ondas agudas son ondas estrechas con una duración de 70 a 200 ms y los picos tienen una duración más corta de 20 a 70 ms. La actividad EEG se clasifica en términos generales en estas 4 frecuencias [6](Fig. 1.1.1-1).

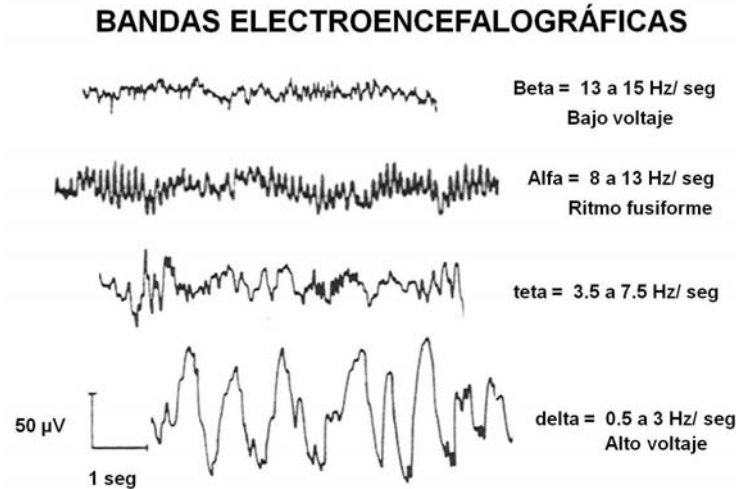


Figura 1.1.1-1 Bandas electroencefalográficas. La banda delta es la más lenta y de mayor amplitud. Su frecuencia va de 0.5 a 3.5 ciclos por segundo. La frecuencia teta tiene una frecuencia que va de 4 a 7.5 ciclos por segundo y su amplitud es menor a la delta. La frecuencia alfa que va de 8 a 12 ciclos por segundo se caracteriza por tener un patrón muy regular, fusiforme. Finalmente la frecuencia más rápida es la beta que va de 12.5 hasta 35 ciclos por segundo y presenta el menor voltaje. Cada una de estas bandas se ha asociado con estados de vigilancia. (tomado de Velázquez e Ibarra, 2010 [7]).

En base a estas características electroencefalográficas el sueño en mamíferos y algunos vertebrados puede clasificarse como sueño MOR (REM, por sus siglas en inglés) y no-MOR (NREM). A pesar de que la mayoría de los mamíferos poseen características similares, la organización del ciclo sueño-vigilia difiere particularmente en humanos y roedores. Así en el humano existe el estado de vigilia, de sueño MOR y en el sueño no-MOR se pueden encontrar dos etapas de sueño ligero, y una etapa de sueño de ondas lentas cada una con patrones eléctricos diferentes [8] (Fig. 1.1.1-2).

En humanos el sueño es nocturno y esta dividido en cuatro etapas. En cada noche se pueden presentar de 3 a 8 ciclos. La etapa I del sueño no-MOR, se caracteriza por la actividad de frecuencias mixtas y de baja amplitud, la actividad EEG se lentifica (4-7 Hz), la actividad muscular disminuye y los movimientos oculares cesa. En la etapa II no-MOR se presentan dos señales peculiares en el EEG, conocidos como husos de sueño y complejos K. Los husos de sueño son períodos de hasta 2 segundos de actividad rápida (12-14 Hz de frecuencia), que de forma progresiva aumentan su amplitud y luego la disminuyen. Los complejos K son ondas lentas de alto voltaje, presentan una primera fase negativa de gran amplitud seguida por un fase positiva más lenta y de menor amplitud. En la etapa III o sueño de ondas lentas aumenta progresivamente la cantidad de actividad lenta formada por ondas delta a una frecuencia de 0.5-2 Hz y de gran amplitud (75 μV), la actividad muscular esta disminuida y no hay movimiento de los ojos [8].

En humanos la etapa de sueño MOR, es también llamado sueño paradójico porque la actividad EEG es similar a la del estado de vigilia, predominan las frecuencias rápidas y de bajo voltaje entremezcladas con ritmos theta (desincronización), por lo que esta etapa se caracteriza por una actividad EEG de alta frecuencia y baja amplitud, el EMG registra la atonía o desaparición del tono muscular excepto en los músculos oculares y en el diafragma permitiendo la respiración. Además es posible observar breves contracciones de los músculos faciales y de las extremidades. El EOG registra los movimientos oculares rápidos que son binoculares y simétricos, pueden ser horizontales u oblicuos y que dan nombre a esta fase [8].

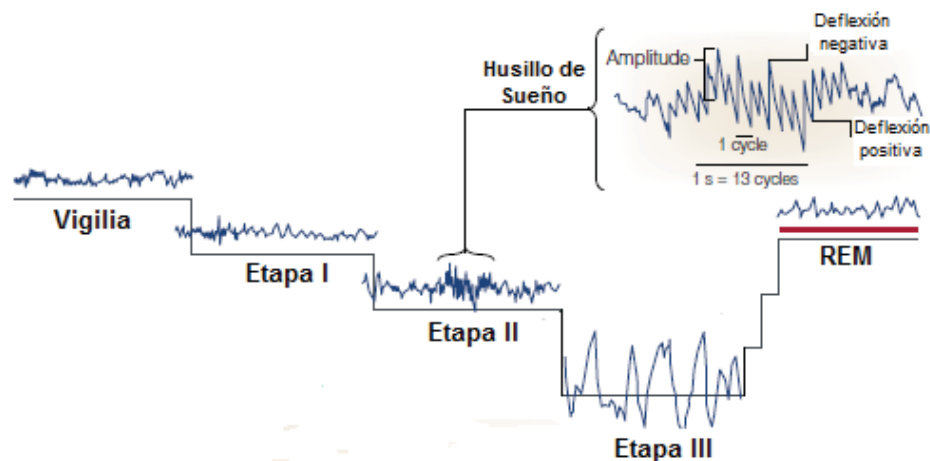


Figura 1.1.1-2. Ritmos en sueño. Bandas electroencefalográficas de las diferentes fases del sueño durante el primer ciclo de sueño en la noche (Modificada con permiso de Pace-Schott 2002 [8]).

En comparación a los humanos, las ratas y ratones de laboratorio son animales nocturnos, y por lo tanto pasan la mayor parte del día en reposo, mientras que durante la noche es cuando estos roedores presentan mayor actividad, en congruencia con lo anterior, se ha demostrado que los roedores pasan alrededor de 70-80% de la noche en vigilia, y 70-80% de día durmiendo. Particularmente las ratas son típicamente polifásicas, es decir, presentan episodios repetidos sueño-vigilia durante una día con un ciclo de luz/oscuridad. [9]. La cantidad diaria y la distribución circadiana de sueño en ratones (que son más activas que las ratas en condiciones estándar de laboratorio) son similares a los de las ratas, a pesar de que exhiben variabilidad a través de cepas [10].

El sueño en ratas, así como los mamíferos incluye principalmente dos estados: el sueño MOR y el sueño no MOR (NMOR). Al igual que en humanos, estos dos tipos de sueño se definen por las señales electrofisiológicas detectadas una combinación de la electroencefalografía (EEG) y electromiografía (EMG). Las características electroencefalográficas para clasificar las etapas de sueño en roedores son las propias para distinguir el sueño MOR y el sueño de ondas lentas en humanos, considerándose esta última etapa de sueño NMOR, dada la ausencia de las etapas de sueño ligero que se observan en el humano [11].

Los registros poligráficos de la rata suelen ser clasificados en tres etapas: vigilia, sueño de alta amplitud o no-MOR y sueño MOR o paradójico. El estado de vigilia se define por la presencia de baja amplitud en el EEG, de forma general se observa ritmo theta baja amplitud (cuando es registrado cerca de la línea media de la corteza) y alta amplitud en el EMG. El sueño de alta amplitud (SA) que se define por la presencia de ondas irregulares de gran amplitud (registrados en ambos sitios laterales y la línea media de la corteza) en el EEG y baja amplitud en el EMG. El Sueño paradójico (PS) se define por una baja amplitud lateral, actividad theta de gran amplitud y continua (línea media) en el EEG, y baja amplitud en el EMG [12].

Al contar con una clasificación de las etapas de sueño, es posible entonces, construir una descripción grafica de cómo estas etapas suceden durante toda la noche. Esta gráfica que se conoce como histograma de sueño o hipnograma, y nos permite observar las latencias, duración y ritmicidad de las diferentes etapas de sueño. En el hipnograma de la fig. 1.1.1-8 se muestra cómo se organiza el sueño en un individuo. El eje Y corresponde a las diversas etapas del sueño no-MOR alternando con el sueño MOR durante 8 horas de sueño (eje en x) [13].

En la Figura 1.1.1-8, se observa el hipnograma característico para un humano adulto, que durante el primer ciclo de la noche el sueño no-MOR es más profundo y ocupa el mayor tiempo, mientras que el sueño MOR (barras rojas) suele ser corto y puede ser interrumpido. Más tarde en la noche, el sueño no-MOR es poco profundo, y progresivamente en cada ciclo el sueño MOR (barras rojas) ocupa mayor tiempo [13].

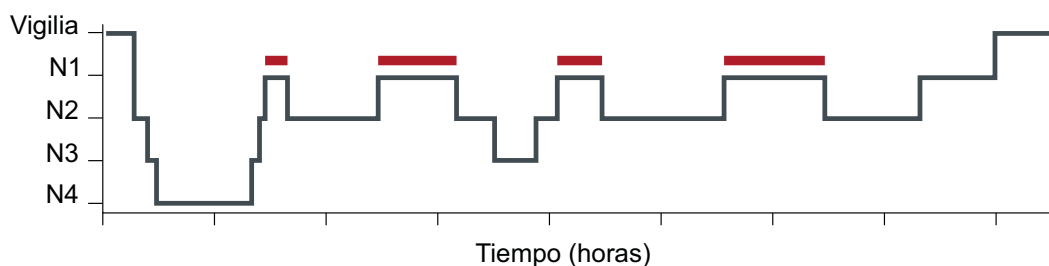


Figura 1.1.1-3. Hipnograma de humano. Ciclos de sueño en el transcurso de una noche, la línea roja muestra la presencia de sueño MOR, N3 y N4 corresponden a la etapa de sueño de ondas lentas (N3) (Modificada con permiso de Pace-Schott 2002 [8]).

1.1.2 NEUROBIOLOGÍA DEL SUEÑO

El sueño parece ser un fenómeno global regulado por redes neuronales y procesos locales en áreas específicas del cerebro o corticales. El estudio y registro de sueño realizados, particularmente en

ratas y gatos, han permitido determinar, en un grado considerable, cuales son las estructuras cerebrales involucradas, así como los mediadores químicos que están propiciando esta respuesta.

Los primeros experimentos que abordaban la regulación del sueño demostraron la importancia del puente y del mesencéfalo caudal para la generación y periodicidad del sueño MOR y no-MOR [14]. El modelo de inhibición mutuo entre poblaciones neuronales se ha propuesto como mecanismo regulador del sueño en el cual participan grupos celulares pontinos monoaminérgicos y colinérgicos.

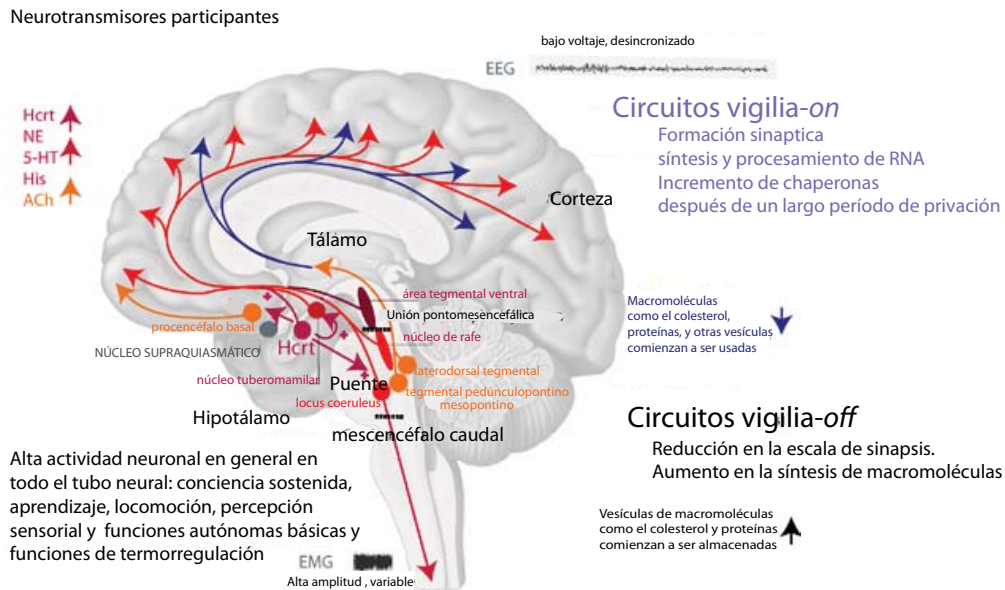


Figura 1.1.2-1. Neurobiología de la vigilia. Durante la vigilia los sistemas colinérgico, monoaminérgico e hipocretinérgico son activos y contribuyen a la desincronización del EEG a través de proyecciones tálamicas y corticales. Las células hipocretinas excitan a las células monoaminérgicas y posiblemente a las neuronas colinérgicas. El tono muscular es variable y alto (EMG), lo que refleja la presencia de movimiento. El núcleo supraquiasmático localizado cerca del quiasma óptico recibe información proveniente de la región del hipotálamo ventromedial además de otras áreas del cerebro, así que durante la vigilia, la actividad, el aprendizaje y algunos otros procesos metabólicos hacen que la mayor parte de los sistemas sean obligados a trabajar al máximo, a niveles insostenibles para la mayoría, por lo que es difícil sostener conductas como la reproductiva o la alimentación de forma óptima al mismo tiempo (Modificada con permiso de Mignot, 2008 [15]).

En este modelo las neuronas monoaminérgicas y colinérgicas contribuyen a la desincronización del EEG durante la vigilia (Fig. 1.1.2-1), y reducen su actividad durante el sueño NMOR. Así el sueño MOR esta asociado con baja actividad aminérgica, pero alta actividad colinérgica. La células dopaminérgicas del área tegmental ventral dopaminérgica no cambia significativamente su tasa de disparo a través de la vigilia y el sueño, sin embargo su patrón se modifica contribuyendo a una alta secreción dopaminérgica en la corteza prefrontal [16].

La construcción de los modelos de sueño/vigilia y de NMOR/MOR en donde participan poblaciones celulares reguladoras que son mutuamente inhibitorias simula un sistema flip-flop el cual es inestable por inercia generando una serie de interruptores [17], los cuales producen sueño o vigilia y asegurando

que la mezcla entre los estados de sueño y la vigilia no ocurra. En este modelo, sistemas como el hipocretina hipotalámico activan solo un lado de este interruptor, asegurando la preferencia por alguno de los dos estados. El primer interruptor regula la transición entre la vigilia y el sueño NMOR y participan células aminérgicas y GABAérgicas del área preóptica ventrolateral del hipotálamo (Fig. 1.1.2-2). Cuando la actividad o el tono aminérgico es bajo y el organismo esta adormecido, las células colinérgicas del núcleo tegmental laterodorsal y del pedunculopontino en el puente son subsecuentemente desinhibidas, activando la vía del sueño MOR [4].

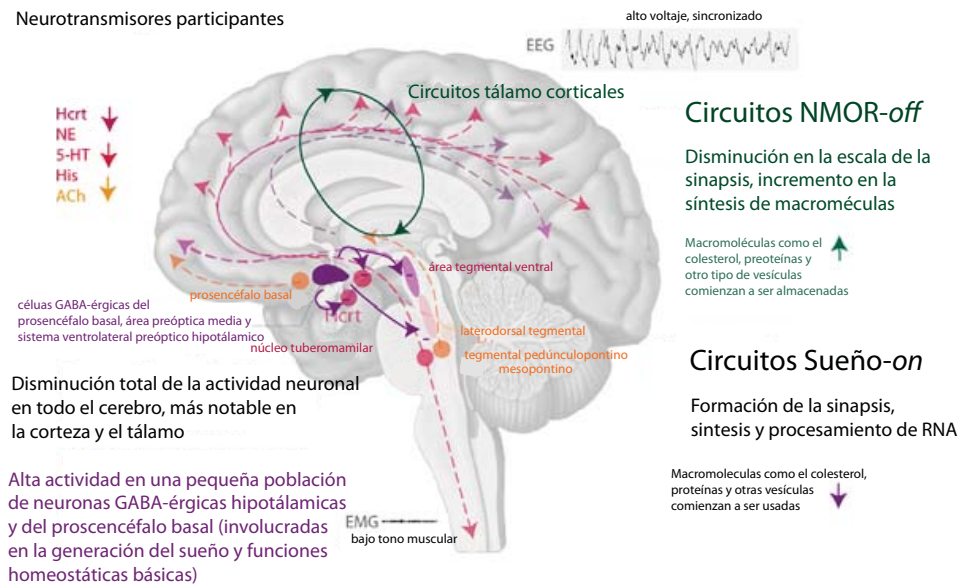


Figura 1.1.2-2. Neurobiología del sueño NMOR. Las células GABAérgicas del prosencéfalo basal y del área hipotalámica medial y preóptica ventrolateral son activas durante el sueño NMOR. Las células GABAérgicas del área preóptica medial pueden estar involucradas en la termorregulación, además de que pueden inducir la inhibición de células monoaminérgicas y colinérgicas durante el sueño NMOR y el sueño MOR. Al cesar el ingreso de información sensorial e iniciar el sueño, los circuitos talamocorticales desde la corteza hasta el núcleo reticular tálamico así como las neuronas de relevo contribuyen a la generación del sueño NMOR profundo. Así mismo aparecen oscilaciones de tipo ondas lentas en el EEG al mismo tiempo que el tono muscular desaparece (Modificada con permiso de Mignot, 2008 [15]).

La regulación del sueño MOR incluye al interruptor flip-flop NMOR/MOR (NREM/REM). En este segundo interruptor participan neuronas GABAérgicas MOR-on del núcleo tegmental laterodorsal o sublocus coeruleus, así como neuronas GABAérgicas MOR-off de la materia gris periacueductal y del tegmento pontino lateral [18]. El área MOR-on también contiene neuronas glutamatérgicas que proyectan al prosencéfalo basal (regulador del EEG) y hacia la médula ventromedial y la médula espinal (regulador del tono muscular) .

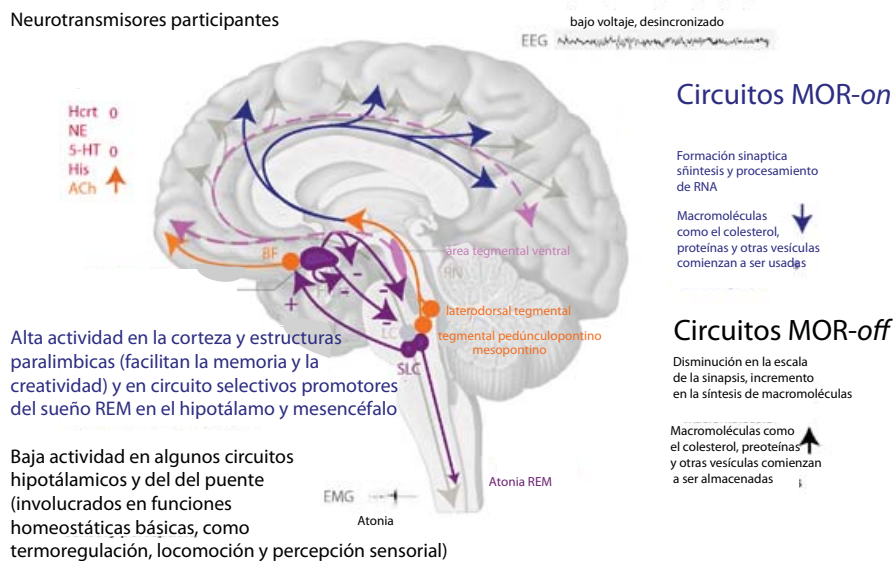


Figura 1.1.2-3. Neurobiología del sueño MOR. Durante el sueño MOR, las células sueño-on hipotálamicas y del prosencéfalo basal son activas, al mismo tiempo que las células glutamatérgicas en el sublocus coeruleus también incrementan su actividad. Estas células aumentan la atonía muscular del MOR a través de proyecciones caudales, mientras que proyecciones del prosencéfalo basal ventral contribuyen a la generación de ondas theta del hipocampo. Los sistemas colinérgicos del tronco cerebral también están activos y estimulan los circuitos talamocorticales que generan la desincronización del EEG parecida a la de la vigilia. Durante el sueño MOR, el EMG es de baja actividad indicando parálisis a través de la inhibición de la motoneurona (sueño MOR tónico). Espasmos (activación del EMG y pequeños movimientos) también pueden aparecer con cascada intermitente de movimientos oculares rápidos y ondas eléctricas de origen pontogeniculoccipital (sueño MOR fásico) (Modificada con permiso de Mignot, 2008 [15]).

1.1.3 LAS FUNCIONES DEL SUEÑO

Una de las preguntas cruciales en el estudio del sueño es: ¿cuál es la función que el sueño y, particularmente cuál es la función que el sueño MOR cumple en el organismo?. Diversas teorías se han postulado acerca de su función, las cuales se han podido dividir en tres grandes grupos que suponen diferentes tipos de funciones del sueño, en el primer grupo se incluyen teorías que proponen al sueño como un mecanismo para conservar la energía, un segundo grupo establece al sueño como un facilitador del aprendizaje y la memoria a través de la generación de cambios en la plasticidad cerebral y sinaptogénesis; y el último grupo propone al sueño como un proceso de restauración de diversos componentes celulares y de biosíntesis de macromoléculas [15]. A pesar de las diversas teorías que explican la existencia del sueño, sus funciones en mamíferos siguen sin estar claras, y aún se siguen proponiendo otras funciones como las que sugieren que en momentos inoportunos mantiene a la especie activa [16].

Algunos otros estudios sugieren que la duración del sueño puede estar relacionado con la protección contra el estrés oxidativo, estudios previos han mostrado la existencia de una correlación filogenética

entre el tiempo de sueño y la tasa metabólica. Un metabolismo elevado está vinculado a un número mayor de cambios bioquímicos, varios de los cuales han sido relacionados con el control del sueño. Una tasa metabólica alta resulta en la generación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) por las mitocondrias, esta generación de ROS se ha relacionado con el envejecimiento [16]. Por otro lado se ha demostrado que la privación del sueño en la rata produce un aumento del estrés oxidativo; de forma interesante se encontró que los cambios más notables se produjeron en una región del cerebro con mayor tasa de síntesis de proteínas. Por lo que una de las teorías supone que a mayores tasas metabólicas se requieren períodos de sueño más largos para corregir el daño inducido por los ROS en las células cerebrales, y así facilitar la síntesis y actividad de las moléculas que protegen a las células del cerebro contra el estrés oxidativo [16].

El argumento de que el sueño tiene una función de vital importancia es convincente ya que la falta de sueño en los roedores y moscas puede causar la muerte más rápidamente que la privación de alimentos [19]. Por otra parte, la cantidad y la naturaleza del sueño están relacionados con la edad, el tamaño corporal y con variables ecológicas, tales como si los animales viven un medio terrestre o un medio acuático, su dieta y la seguridad del sitio en el que duermen. El sueño puede ser un proceso eficaz que cumple ciertas funciones pero las variaciones en la expresión del sueño indican que estas funciones pueden diferir entre especies [16].

Diversas evidencias sugieren que el sueño MOR y el sueño no-MOR tienen funciones distintas, la mayoría de las teorías proponen que el sueño no-MOR juega un papel importante en la conservación de la energía [20, 21], mientras que el sueño MOR interviene en la recuperación del sistema nervioso [16], aprendizaje, plasticidad neuronal y sinaptogénesis [22-24].

Acerca del sueño MOR, se ha propuesto que este es un estado de activación cerebral periódica durante el sueño que puede participar en los procesos de recuperación y en la regulación emocional [16]. Fisiológicamente también se ha observado que durante la etapa de sueño de ondas lentas ocurren procesos importantes en la función endocrina de mamíferos, ya que es durante esta etapa cuando se alcanzan los niveles más altos de hormonas como la prolactina y la hormona de crecimiento, en comparación con el cortisol que se encuentra disminuido; y es justo al despertar cuando alcanza sus niveles máximos [4], dicho comportamiento podría evidenciar la existencia de interacciones entre el sueño con fenómenos propios de otros sistemas fisiológicos.

1.1.4 PRIVACIÓN DE SUEÑO

La privación del sueño consiste ya sea en una completa falta de sueño durante un cierto período de tiempo o una reducción del tiempo de sueño óptimo. Una reducción crónica en el tiempo de sueño o la fragmentación de este conlleva a la disrupción del ciclo del sueño, y pueden tener consecuencias

parecidas a las observadas por la privación del sueño aguda; en particular en la funciones cognitivas, la atención y la memoria operante. La privación sueño durante varios días por lo general se realiza en situaciones extremas o bajo condiciones experimentales [25].

En humanos los síntomas clínicos de la privación o restricción del sueño generalmente incluyen un aumento en tiempo de reacción ante algún estímulo, distracción, alteraciones en la atención y en la concentración, así como dificultad en la memorización de la nueva información. Se observa un mayor nivel de estrés; cansancio, somnolencia y la irritabilidad aumenta; disminuye la efectividad y motivación al trabajar [25].

La privación de sueño total en ratas provoca su muerte en un periodo de tres semanas aproximadamente, presentando un deterioro físico, con ulceraciones en la piel, en la cola y en las patas; alteraciones en la coordinación motora y postural (ataxia); aumento en la ingestión de alimento acompañada de una pérdida de peso considerable e incremento de la energía gastada [26]. La privación de sueño aguda deteriora la integridad de los procesos cognoscitivos, como atención, aprendizaje y memoria. Este deterioro se acompaña de un cambio en la actividad metabólica cerebral [27].

La restricción de sueño, la cual consiste en la disminución de tiempo de sueño es la forma de privación mas frecuente en humanos. La restricción y los trastornos del sueño se han asociado con una amplia gama de consecuencias para la salud, incluyendo un mayor riesgo de hipertensión, diabetes, obesidad, depresión, ataque cardíaco y accidente cerebrovascular [28].

1.1.5 ESTRÉS Y SUEÑO

El estrés es un proceso al que están expuestos todos los seres vivos, ya que son situaciones que les imponen una demanda extraordinaria a su funcionamiento. Esta demanda extraordinaria produce una respuesta generalizada del organismo. Cuando esta respuesta es adecuada, el organismo sobrevive y se fortalece. Cuando la respuesta no es manejada adecuadamente, el organismo enferma y empieza a declinar.

Según Selye, la reacción inicial al estrés es el choque, que es seguido por una fase de contra choque, y poco a poco se desarrolla resistencia al factor estresante. Esta resistencia puede ir hasta el agotamiento, sin embargo, si el factor de estrés persiste puede sobrevenir la muerte. Durante el estrés se desarrolla una resistencia específica y una no específica . La resistencia no específica cesará mucho antes y se queda por debajo de lo normal durante el período de la resistencia [29].

Durante la respuesta al estrés, se da lugar a cambios en los niveles de glucosa y cloro en sangre mientras que la cuenta de glóbulos blancos se eleva. Hay hiperplasia de la corteza suprarrenal, con una

gran cantidad de gránulos de lípidos, y el límite entre la zona fasciculada y reticular es poco diferenciada. El timo muestra una involución con la presencia de restos nucleares y núcleos picnóticos. Esta "involución" del timo se vuelve más pronunciado durante la fase de contrachoque cuando la corteza suprarrenal alcanza su máximo crecimiento [29].

Durante muchos años, la respuesta de estrés se consideró como un fenómeno necesariamente dañino y perjudicial. Asimismo, existió la concepción, ampliamente aceptada, de que esta respuesta era inespecífica y generalizada, de manera que, sin importar las peculiaridades de la situación, el organismo respondería siempre de la misma manera [30]. Recientemente ambos conceptos han perdido vigencia.

En los últimos lustros se ha acumulado evidencia experimental acerca de que las características de la respuesta al estrés dependerán de las características de la situación estresante. Es decir, las diferentes situaciones que pueden imponer demandas extraordinarias al organismo, producirán una respuesta acorde y adecuada para enfrentar esa demanda específica. Cuando una demanda diferente se presente, entonces la respuesta del organismo será diferente. Asimismo, el impacto de estas diferentes respuestas sobre el organismo, no es necesariamente nocivo, sino que, frecuentemente, es un elemento estimulante para varios subsistemas orgánicos [30].

Por otro lado, el fenómeno cíclico del sueño y la vigilia es un evento que implica la participación del organismo como un todo y es un proceso vital para el desarrollo adecuado de las funciones corporales. Por tanto, el sueño y la vigilia son en conjunto un proceso que presenta relaciones recíprocas intensas con los fenómenos que afectan al organismo. Recientemente se ha propuesto que las características del patrón de sueño en una noche particular, dependerán de las actividades y sucesos que el sujeto haya experimentado durante la vigilia previa [30].

Tomando en cuenta que la respuesta de estrés implica un esfuerzo adaptativo del organismo ante situaciones de demanda fuera de lo ordinario, entonces una gran cantidad de conductas estarán influidas por su presencia y el sueño no es la excepción. Tanto en seres humanos como en animales, se ha demostrado repetidamente que situaciones diversas a las que genéricamente se les califica como estresantes, que se imponen al organismo son variadas, entonces su efecto sobre el patrón de sueño es también variable. Se ha demostrado que condiciones estresantes pueden llegar a tener efecto promotor del sueño, como el frío, el calor, los choques eléctricos, entre otros, mientras que existen también las situaciones que trastornan el sueño como el estrés crónico, leve e impredecible, entre otras [31].

A pesar de esta variabilidad, algunos paradigmas han resultado ser una herramienta de gran utilidad para el estudio de los mecanismos generadores de los diferentes componentes del sueño. Este es el

caso de la inmovilización en las ratas, procedimiento que genera de manera muy consistente una elevación marcada del porcentaje de sueño MOR en las horas que siguen al procedimiento [32].

En 1991, el grupo de sueño liderado por Michel Jouvet, publicó que la inmovilización en ratas al colocarlas dentro de un cilindro por unas horas, provocaba una elevación de la cantidad de sueño MOR. Este reporte fue el inicio de una gran cantidad de trabajos que siguieron profundizando en la definición de este fenómeno y que hoy nos permiten tener un cuadro claro de cuáles son sus principales determinantes [33].

Así, se ha podido definir que el efecto observado por Jouvet se genera en su máxima expresión con una o dos horas de inmovilización. Incrementar el tiempo de inmovilidad nos da por resultado un mayor incremento de sueño MOR. La mayoría de los autores que han trabajado el tema han reportado un incremento de sueño MOR que no involucra al sueño de ondas lentas. Asimismo, se ha observado una marcada influencia del ciclo de luz-oscuridad, dándose un mayor incremento durante la fase oscura del ciclo.

1.2 EL SUEÑO Y LA REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

En últimas décadas diversos trabajos han mostrado que el sueño parece estar asociado con la regulación del sistema inmune y con la respuesta inmune, y que la falta de sueño induce la vulnerabilidad a desarrollar ciertos trastornos [34-36].

En este aspecto algunos autores proponen que el sueño participa en la fase de la formación de la memoria inmunológica, haciendo la comparación con la consolidación de la memoria neuroconductual [20, 37], en el que la información se transfiere de un corto plazo a largo plazo posterior a la adquisición, de forma análoga el sueño puede participar en la adquisición de memoria inmunológica, así como en la fase de recuperación y en la sinapsis inmunológica reclutando a células presentadoras de antígenos para activar a los linfocitos T cooperadores [38, 39].

Trabajos realizados en humanos han aportado evidencias de que la concentración de células inmunológicas en circulación y de citocinas están sujetos a una regulación del sueño, dado que los niveles sistémicos más altos o más bajos se alcanzan durante el sueño, dependiendo de la población de células y el tipo de la interleucina (Fig. 1.4-1) [40-42]. Poblaciones celulares como los neutrófilos, monocitos y células NK, presentan sus niveles más bajos en sangre durante el sueño, un comportamiento opuesto se observa en los linfocitos B, linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores, que alcanzan sus niveles más altos durante el sueño [41] (Fig.1.2-1).

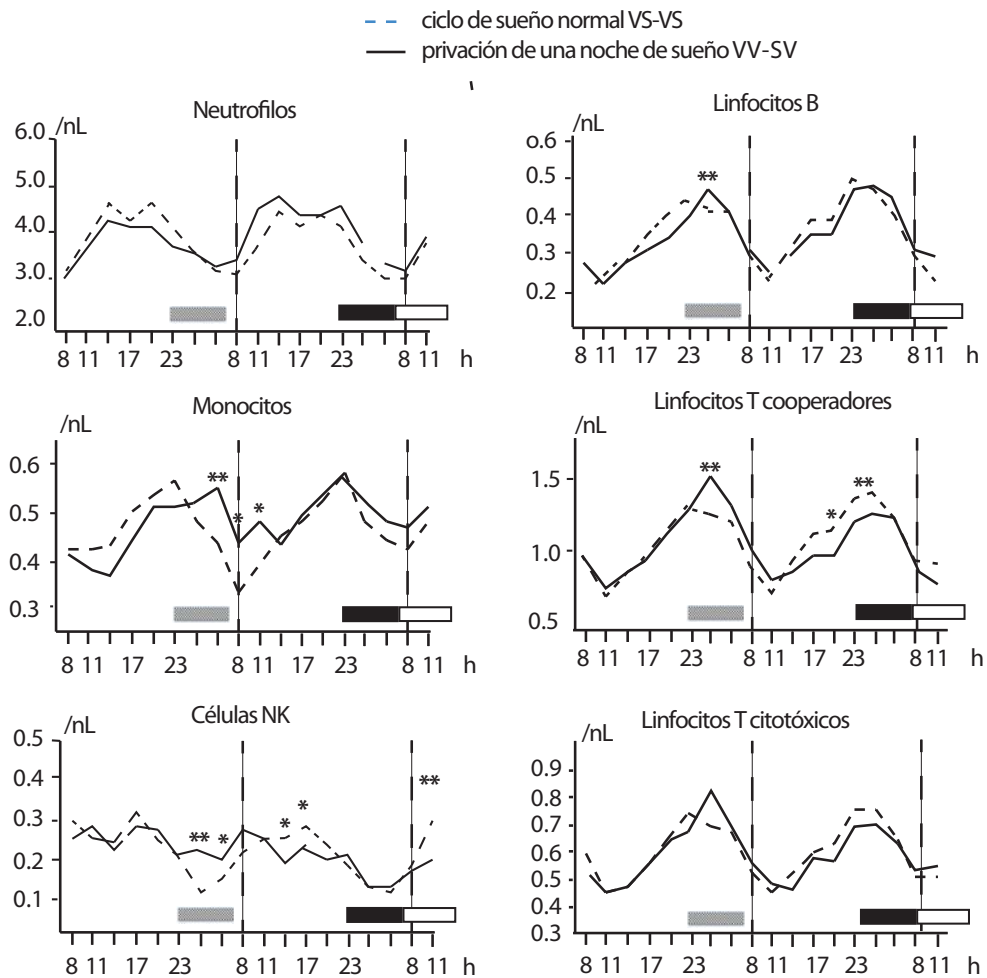


Figura 1.2-1. Variación de la concentración de células en sangre con respecto al ciclo sueño-vigilia. La mayoría de poblaciones inmunológicas presentan ritmicidad en un ciclo que coincide con el ciclo sueño-vigilia, en el cual las concentraciones más altas o más bajas se presentan durante el sueño dependiendo del tipo de población celular. Nótese el efecto diferencial de la privación de una noche de sueño sobre la ritmicidad, ya que la privación afecta a poblaciones específicas produciendo una pérdida en la continuidad en el comportamiento cíclico, principalmente para la población de células NK (Modificado con permiso de Born J, 1997 [40]).

De forma similar se sabe que la IL1- β alcanza sus niveles mínimos en sangre durante el sueño, mientras que TNF α presenta un comportamiento contrario, alcanzado sus máximas concentraciones durante la noche. Cabe mencionar que la regulación del sueño sobre la concentración de las células a nivel sistémico puede ser diferente al efecto regulador que ejerce sobre su producción o secreción (Fig. 1.2-2)

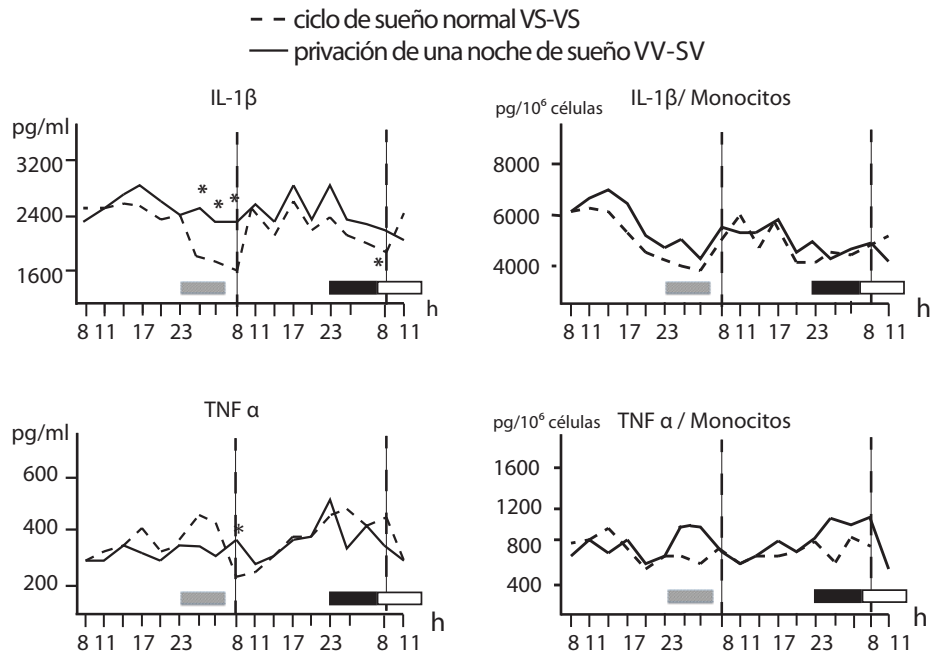


Figura 1.2-2. Variación de la concentración de citocinas en sangre con respecto al ciclo sueño-vigilia. La mayoría de citocinas presentan ritmicidad en un ciclo que coincide con el ciclo sueño-vigilia, en el cual las concentraciones más altas o más bajas se presentan durante el sueño dependiendo del tipo de citocina. La ritmicidad en las concentraciones de estas moléculas es independiente a la ritmicidad de las células que las producen. Nótese el efecto de la privación de una noche de sueño sobre la ritmicidad de la IL-1 β , ya que la privación produce una pérdida en la continuidad en el comportamiento cíclico, sin embargo cuando se analiza la concentración de IL-1 β producida específicamente por los monocitos se suprime el efecto que la privación de sueño tiene sobre la ritmicidad de la concentración sistémica. De forma similar la privación de sueño produce un pérdida en la ritmicidad de TNF, un efecto diferente se observa cuando se analiza solamente la citocina que es producida por monocitos, ya que la privación de sueño produce una inversión en la secuencia del ciclo, presentando los niveles más altos durante la noche de privación mientras que en un ciclo de sueño normal la concentración máxima se observa durante el día (Modificado con permiso de Born J, 1997 [40])

Así mismo existen otros estudios que apoyan que el sueño puede cumplir una función reguladora del Sistema Inmune, uno de ellos propone que el sueño ha evolucionado a la par del Sistema Inmune jugando un rol importante en la protección contra infecciones parasitarias. Esta teoría sugiere que las especies que tienen una mayor duración de sueño son capaces de aumentar la inversión en sus sistemas inmunológicos y estar mejor protegidos contra los parásitos (Fig. 1.4-3 A) [43].

Para probar esta posibilidad, los Preston y colaboradores hicieron un análisis comparativo entre 26 especies de mamíferos, confrontando sus características de sueño con diferentes parámetros de su Sistema Inmune. Según los autores, existe una sólida correlación entre el incremento en la duración del sueño en diferentes mamíferos con el aumento de las defensas inmunes medidas a través del número de células inmunes circulantes. Se observa que hay una correlación positiva entre la cantidad tanto de sueño no-MOR como de sueño MOR con el número de células de la fórmula blanca, así como de eosinófilos como los basófilos, mientras que las células de la fórmula roja no tienen ninguna relación. Los neutrófilos que representan alrededor del 47% de los glóbulos blancos los cuales se ubican como la

primera línea de defensa ante ataques de patógenos, se incrementan en relación con el incremento de sueño. De manera similar, los linfocitos que representan alrededor del 44% de los glóbulos blancos, y que están relacionados con la inmunidad adquirida también aumentan a la par del sueño en las 26 especies de mamíferos estudiados (Fig. 1.4-3 A y B) [43].

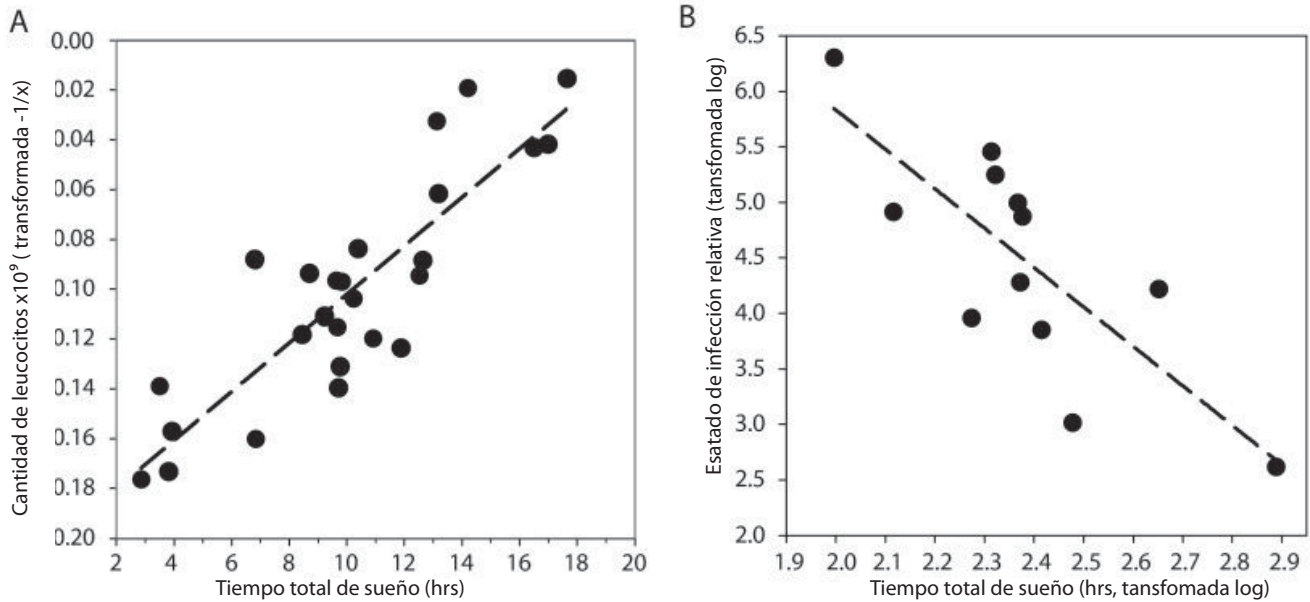


Figura 1.4-3. **A.** Relación proporcional de la concentración de leucocitos totales en sangre con respecto a la duración diaria de sueño. Nótese que a medida que aumenta la cantidad de leucocitos aumenta de forma proporcional la duración de sueño para cada especie estudiada. **B** Relación inversamente proporcional del estado de infección relativa, es decir la cantidad de patógenos que pueden infectar a cada especie estudiada con relación al tiempo diario de sueño, nótese que a medida que aumenta el tiempo de sueño disminuye el estado relativo de infección (Modificado de Preston, 2009 [43]).

En este mismo estudio se analizó el estado de infección relativa para cada especie, encontrando una correlación negativa con respecto al tiempo total de sueño (Fig. 1.4-3), es decir, que a medida que aumenta el tiempo de sueño disminuye el estado de infección relativa. Este estudio brinda un panorama y abre una clara línea de investigación enfocada a la participación del sueño en el desarrollo de la Inmunidad desde un aspecto evolutivo. Además de la regulación que el sueño ejerce sobre parámetros inmunológico, esta relación aporta evidencia de la interacción bidireccional que existe sobre la regulación entre ambos fenómenos fisiológicos.

1.2.1 EFECTOS DE LA PRIVACIÓN DE SUEÑO SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Como se mencionó anteriormente, la humanidad ha observado reiteradamente como la privación de sueño nos hace más vulnerables ante agentes infecciosos. Sin embargo, pocos grupos de investigación han abordado este tema y sorprende la poca información con que se cuenta al respecto. Adicionalmente, el hombre es la única especie que voluntariamente puede suprimir su sueño, lo cual

tendría algunas ventajas experimentales comparados con los estudios en animales a los que se obliga a permanecer despiertos.

En este contexto, poseen gran relevancia las alteraciones que se pueden producir en el sistema inmune cuando hay una modificación en el sueño o bien cuando este se priva. En este aspecto los primeros trabajos se reportaron en humanos por Palmblad y colaboradores en 1976. En este primer estudio, 8 mujeres fueron privadas totalmente de sueño por 77 horas en circunstancias que simulaban un campo de batalla. Se tomó una muestra de sangre antes, durante y después de la privación. Los autores no encontraron cambios en cuanto a leucocitos, monocitos o linfocitos circulantes, pero si en la producción de interferón y en la actividad fagocítica [44].

Posteriormente, otros trabajos mostraron que la privación de sueño ocasionaba disminución de la blastogénesis de linfocitos, y un aumento en los niveles de IL-1 e IL-2, en tanto que se observaba una disminución en la actividad de células NK durante la privación de sueño [45, 46]. En un estudio publicado por el grupo de Dinges en 1994 realizado en jóvenes privados de sueño por 64 hrs se observó un aumento significativo en el porcentaje de células NK, granulocitos, y monocitos, al mismo tiempo que observaron cambios en los niveles de IL-1 β e IFN γ [47]. Otro estudio realizado en ratas privadas selectivamente de sueño MOR, reportó un aumento de leucocitos totales y de IgM a nivel sistémico a las 96 hrs de privación [48].

En ratas que se han privado por un periodo de 72 hrs, se observó un aumento en los niveles plasmáticos de IL-1 α , IL1- β , IL-6, IL-10, TNF α y en IL-17A [48, 49]. Estos hallazgos sugieren que la privación de sueño MOR involucra cambios en la modulación del sistema inmune, tal vez aumentando los procesos inflamatorios o favoreciendo el tipo de respuesta celular. Sin embargo, poco se sabe acerca del efecto que puede tener la privación de sueño cuando se desarrolla una respuesta inmune a una infección, aunque de forma empírica se sabe que en procesos infecciosos el patrón de sueño se ve modificado, lo cual indica que pudiera estar participando en la regulación de la respuesta generada.

En este aspecto, es poco lo que se ha estudiado acerca de la relación que existe entre el sueño y la modulación de la respuesta inmune, particularmente en infecciones de tipo parasitario, así como los posibles mecanismos que están mediando este fenómeno.

Los estudios de privación selectiva de sueño MOR llevados a cabo en ratas, como se detalló en párrafos anteriores, regularmente están contaminados con una componente de estrés que es inherente a la técnica de privación. A pesar de que se han introducido modificaciones tendientes a disminuir este componente, todavía existe controversia al respecto. Aún mas, tratándose de valorar la respuesta inmune, esta controversia es todavía más relevante, dado el marcado efecto del estrés sobre el sistema

inmune. Por ello, ocasionalmente se ha recurrido a la estrategia de comparar los efectos de la privación de sueño MOR con algún estresor que provoque la respuesta habitual.

1.3 EFECTO DEL SISTEMA INMUNE SOBRE EL SUEÑO.

De manera general, las enfermedades infecciosas, los trastornos mentales y las afecciones físicas se asocian con somnolencia y fatiga. Luego de ser estimuladas, las células del sistema inmunitario innato secretan citocinas inflamatorias que inducen la síntesis de un perfil de citocinas diferente y característica de cada enfermedad, incluidos los trastornos del sueño. Las citocinas proinflamatorias sintetizadas en la periferia por el Sistema Inmune llegan al cerebro por vía nerviosa o sanguínea y regulan el sueño. Los detalles de la interacción entre el sueño y un proceso inmunológico no han sido estudiados con profundidad, y mucho menos se han esclarecido los efectos de diversos tipos de infecciones sobre este; sin embargo, existen evidencias de una estrecha relación directa y bidireccional entre ambos fenómenos.

La lista de las citocinas y quimiocinas que se han estudiado en animales de laboratorio o en seres humanos que sugieren que alteran o que afectan al sueño incluyen a: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, TNF, TNF- β , IFN- α , IFN-1 β , INF- γ y la proteína de los macrófagos (también conocido como CCL4). De ellos sólo dos sustancias, la IL-1 β (IL-1) y TNF- α (TNF), se han estudiado ampliamente como para afirmar que están involucrados en la regulación fisiológica (es decir, espontánea) del sueño. La evidencia de un papel para la IL-1 y TNF en la regulación del sueño fisiológico se ha derivado de estudios electrofisiológicos, bioquímicos y de genética molecular [50, 51].

En esta línea de investigación, se ha observado que cuando la IL-1 β es administrada de forma intravenosa o intracerebroventricular en conejos, produce un aumento del 60 al 70% en la cantidad de tiempo en sueño NMOR [52]. Este mismo efecto se ha observado con la administración de otras dos interleucinas, como el TNF α y el IFN α , aunque el efecto de estas dos puede estar mediado por la IL-1, ya que se han encontrado receptores para IL-1 en varias estructuras del cerebro, además de que existen neuronas hipotalámicas inmunoreactivas a esta citocina. De forma interesante, se sabe que la IL-1 ejerce efecto en el sistema serotoninérgico, implicado en la regulación del sueño a diferentes niveles, como se muestra en la figura 1.4.2-1. [53-55]

La evidencia antes mencionada apoya la existencia de una interacción entre componentes del sistema inmune y el sueño. En este contexto, poseen gran relevancia las alteraciones que se pueden producir sobre el sueño cuando existe una respuesta inmune. En esta línea de investigación se conoce que los niveles sistémicos de TNF- α presentan un ritmo circadiano que coincide con el ritmo sueño-vigilia. Asimismo, los niveles diurnos de IL-6 se relacionan de manera negativa con la cantidad del sueño nocturno. En consecuencia, la disminución de la secreción de IL-6 se asocia con un buen sueño

nocturno y una sensación de bienestar al día siguiente. Dado que el tratamiento con IL-6 ocasiona somnolencia y fatiga, se propone que esta citocina tiene acción directa sobre los mecanismos centrales del sueño.

Las pruebas recogidas durante los últimos años también sugieren que estas citocinas son sintetizadas directamente por las células cerebrales, existiendo además receptores para estas. En este aspecto, se conoce que las citocinas también se sintetizan de novo y son secretadas por neuronas y glia y por lo tanto el SNC, y que existen neuronas inmunorreactivas para la IL-1 y TNF localizadas en regiones del cerebro que están implicados en la regulación del sueño-vigilia, especialmente el hipotálamo, el hipocampo y el tronco cerebral. [55-57]. La señalización ejercida por los receptores de IL-1 y TNF también está presente en varias áreas del cerebro, tales como el plexo coroideo, el hipocampo, el hipotálamo, el tronco cerebral y la corteza, y se expresan en las neuronas y en astrocitos [58, 59].

En este contexto, IL-1 y TNF aumentan el sueño no-MOR (NREM) en varias especies (rata, ratón, mono, gato, conejo y oveja), independientemente de la vía de administración. El sueño NMOR que inicia como consecuencia de la administración de IL-1 o TNF tiene algunas características de sueño fisiológico en el sentido de que sigue siendo episódica y es fácilmente reversible cuando se estimula el animal. Sin embargo, la IL-1 generalmente provoca la fragmentación del sueño NMOR. La magnitud y duración de los efectos de IL-1 sobre el sueño NMOR dependen de la dosis y del tiempo de administración: dosis muy altas suprimen al sueño NMOR en roedores, pero si la IL-1 se administra antes de la fase oscura del ciclo de luz-oscuridad el aumento de sueño NMOR es más eficaz [60-62]. Los antagonistas de estos sistemas de citocinas atenúan el incremento del sueño NMOR provocado por la ingesta excesiva de alimentos o la elevación aguda de temperatura los cuales están asociados con una mayor producción de IL-1 o TNF. Por otra parte, ratones knockout que carecen del receptor a IL-1 y del receptor para TNF, ambos tipo 1 pasan menos tiempo en sueño NREM que los ratones de tipo silvestre [63, 64].

En conjunto, la evidencia sugiere que los sistemas de IL-1 y 5-HT participan en interacciones recíprocas que contribuyen a la regulación del sueño NMOR. En el área hipotalámica preóptica y en la región basal del tallo cerebral (POA/BF) la IL-1 mejora la liberación axonal de 5-HT y estimula la síntesis de IL-1, al mismo tiempo que inhibe las neuronas promotoras de la vigilia. La IL-1 también inhibe cuerpos celulares serotoninérgico vigilia-activos en el núcleo de la raíz dorsal (DRN). Por lo tanto, IL-1 ejerce efectos opuestos sobre los cuerpos celulares serotoninérgicos y las terminales de los axones. Estos efectos se complementan entre sí y ambos contribuyen al mismo resultado funcional: la mejora de sueño NMOR (Fig. 1.4.2-1) [65].

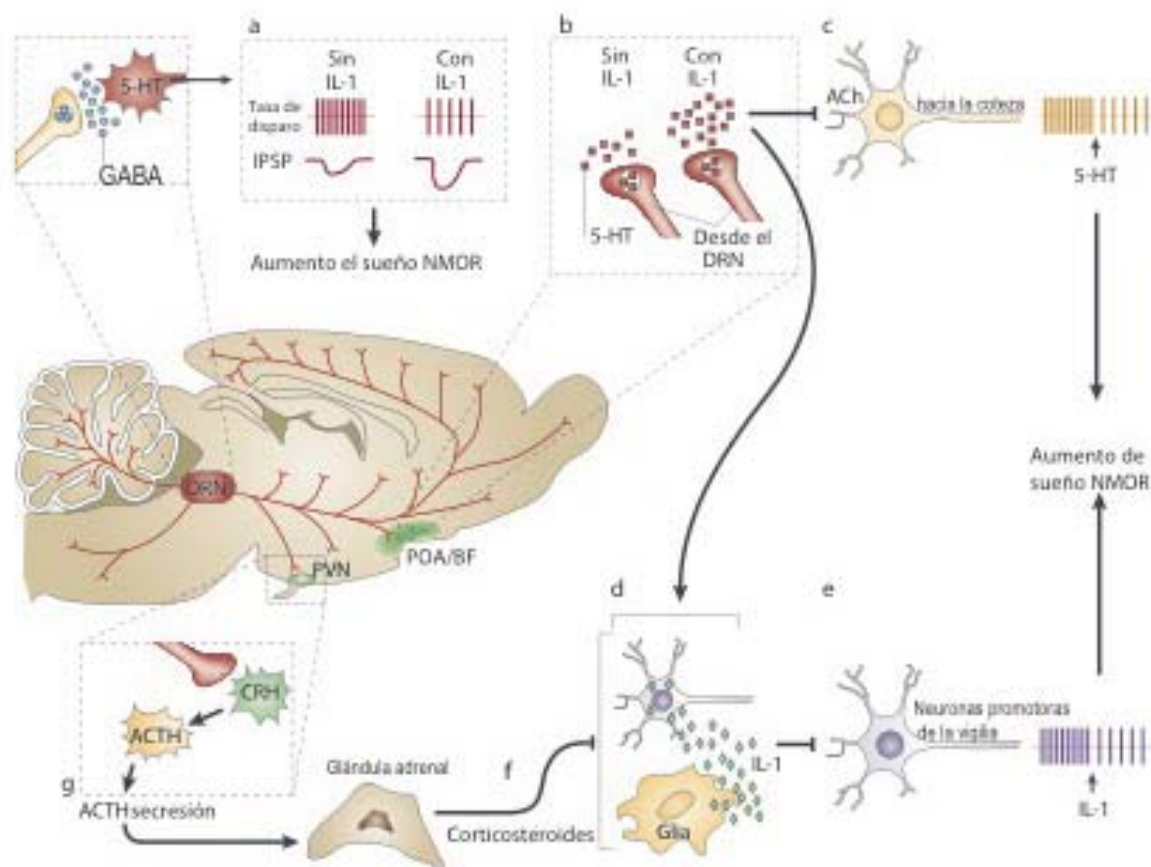


Figura 1.3-1. Interacción de IL-1 con serotonina en la regulación del sueño NMOR. La citocina IL-1 y la serotonina (5-HT) interactúan en diferentes sitios del cerebro para regular el sueño NMOR. Se muestran las interacciones entre la IL-1, la serotonina y el GABA que son importantes durante la regulación del sueño NMOR. En el núcleo del rafe dorsal (DRN) las microinyecciones de IL-1 promueven el sueño NMOR, la IL-1 reduce la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas activas en vigilia a través del aumento de los efectos inhibitorios del GABA. (a) en el área hipotalámica preóptica y de la región basal del tallo cerebral (POA/BF) la IL-1 estimula la secreción de 5-HT, (b) la 5-HT inhibe a neuronas colinérgicas involucradas en la activación cortical, y (c) estimula la síntesis de IL-1, (d) mientras que inhibe a la neuronas promotoras de la vigilia y activa poblaciones neuronales promotoras del sueño en el POA/BF. En el POA/BF, la IL-1 esta sometida un control homeostático inhibitorio potente por parte de los corticosteroides secretados por la corteza adrenal (f). Los corticosteroides dependen a su vez de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, el cual es activado por el sistema serotoninérgico (g). Ach: acetilcolina, ACTH: hormona adrenocorticotropica, CRH:hormona estimulante de corticotropina, IPSP: potencial post-sináptico inhibitorio, PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo. (Modificado con permiso de Imeri and Opp, 2009 [65]).

1.3.1 EL SUEÑO DURANTE LA INFECCIÓN

La evidencia antes mencionada apoya la existencia de una interacción entre componentes del sistema inmune y el sueño. En este contexto, poseen gran relevancia las alteraciones que se pueden producir sobre el sueño cuando existe una respuesta inmune. En este aspecto una gran variedad de enfermedades infecciosas se han relacionado con trastornos de sueño, particularmente se ha documentando que agentes infecciosos como virus o parásitos son capaces de infectar al SNC

generando así dichos trastornos, ya sea por efecto de la respuesta inmune generada contra la infección o por efecto directo del agente patógeno (Fig. 1.3.1-1).

Una de las primeras enfermedades que describe alteraciones en el patrón es la encefalitis letárgica, de la cual aún se conoce poco. De agente etiológico aún desconocido, es un trastorno del SNC caracterizado por presentar faringitis seguida por la presencia de trastornos de sueño que incluyen somnolencia e inversión del sueño o insomnio [66]. Algunos estudios recientes la han asociado a una patología autoinmune aunque no se sabe con certeza su etiología [67].

De los agentes patógenos que causan de forma mas frecuente este tipo de trastorno son los virus. Particularmente los pacientes infectados con el virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) (que también afecta al SNC) presentan alteraciones como fatiga y trastornos del sueño desde el estadio asintomático [68]. Los reportes muestran alteración de la organización fisiológica del sueño, mismos que pueden aparecer desde la etapa temprana y progresar a lo largo de la infección tanto en individuos adultos como en niños [69]. En estos reportes se describió la disminución de sueño MOR, de sueño de ondas delta o SOL, que pueden progresar a medida que avanza la enfermedad para posteriormente presentar acortamiento del tiempo de sueño total y la reducción de la etapa del sueño 2 a la par que aumenta la vigilia [70].

Dado que las alteraciones de sueño aparecen desde una etapa temprana en la infección, se ha propuesto que estas alteraciones son ocasionadas por la infección directa en el SNC, pudiendo estar involucrados algunos péptidos del virus [71]. Los estudios realizados con gatos infectados con la variedad felina muestran alteraciones similares a las halladas en pacientes infectados con VIH o enfermos de SIDA [72], por lo que estos modelos son una buena estrategia experimental para dilucidar los mecanismos por los cuales esta infección produce alteraciones en el patrón de sueño, pudiendo ser por acción directa de componentes de virus sobre el SNC o mediante la acción del SI en respuesta a la infección.

Pacientes infectados con otros tipos de virus como el de la rabia, la hepatitis C, o varicela presentan síntomas similares, como reducción de SMOR y del tiempo total de sueño. Sin embargo no ha sido posible diferenciar si estos trastornos son causados por el propio virus o sin son una consecuencia de la respuesta inmune generada para contrarrestarlos [73, 74]. En este aspecto, algunos estudios proponen que las alteraciones de sueño pueden ser producidas por la continúa exposición a citocinas del SI Innato, tal es el caso del IFN- α . Proponiendo que estas citocinas reducen la continuidad de sueño e inducen un patrón consistente con el insomnio y el alertamiento [74].

Otros agentes infecciosos pueden causar alteraciones al sueño de forma indirecta afectando otros sistemas como el respiratorio o endocrino y no propiamente por causar daño en centros que

intervienen en la regulación del sueño, sin embargo la mayoría de procesos infecciosos, particularmente durante la fase aguda coinciden en alterar el patrón de sueño generalmente ocasionando un aumento en la duración del SOL y la disminución de la vigilia y/o sueño MOR. Esta alteración que puede ser observada de forma generalizada durante un proceso infeccioso y puede ser un mecanismo de organismo para adaptarse a estas circunstancias, que obligan a que el mayor aporte de energía sea enviada al SI para que este pueda ser capaz de eliminar la infección.

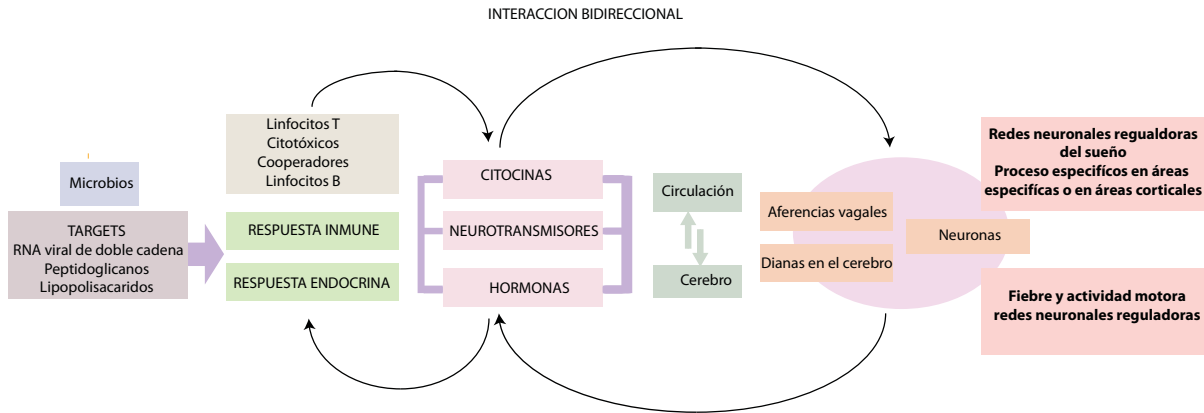


Figura 1.3.1-1. Interacciones durante procesos infecciosos. Se muestra la respuesta inmune resultante de la invasión de un patógeno con la consiguiente secreción mediadores inmunológicos, tales como interleucinas y citocinas, la cual es acompañada de la respuesta a nivel endocrino y del sistema nervioso. Las sustancias secretadas pueden encontrar a sus objetivos a nivel sistémico o pueden atravesar la barrera hematoencefálica para llegar a sus receptores en diferentes estructuras neuronales; o puede tener una modulación vía vagal, con el fin de modular los mecanismos de respuesta dirigidos a mantener la homeostasis. Esta modulación también puede ser utilizado por patógenos para asegurar el establecimiento de la infección, completar su ciclo de vida y asegurar su descendencia. (Modificado de Ibarra-Coronado, 2015)

También ha observado que sustancias asociadas a infecciones bacterianas son capaces de inducir el sueño. Entre estas sustancias se encuentran los componentes de la pared celular de bacterias. En este aspecto se conoce que el muramilo péptido es capaz de inducir un exceso de SOL cuando es administrada en conejos, ratas y gatos [75], mientras que los LPS y el antígeno A producen un aumento tanto en la cantidad de SOL como en su amplitud mientras que suprimen el sueño MOR cuando son administrados en conejos vía intracerebroventricular e intravenosa [76]. En humanos, la endotoxina de *Salmonella abortus* produce una notable disminución tanto de la vigilia como en sueño MOR, acompañado de un incremento en el sueño no-MOR, además de causar alteraciones durante el día, principalmente somnolencia diurna [77]. Sin embargo, así como las infecciones producidas por virus, los trastornos de sueño durante o posteriores a una infección bacteriana pueden ser debidos al efecto estas sobre el sistema inmune, o por efecto del sistema inmune sobre otros sistemas, como se muestra en la figura 1.4.3-1

1.3.2 EL SUEÑO DURANTE INFECCIONES PARÁSITARIAS

El sueño es una conducta de la cual los parásitos pueden tomar ventaja dado que hay una disminución en la capacidad de respuesta a estímulos externos, por lo que el huésped es más susceptible a ser infectado, sin embargo existe poca evidencia que aborde esta relación. En este sentido, la tripanosomiasis humana africana (THA) es la enfermedad parasitaria que produce alteraciones del sueño más estudiada. La THA está asociada a alteraciones graves en las funciones del sistema nervioso, que incluyen síntomas extrapiramidales y neuropsiquiátricos, alteraciones sensoriales y cambios característicos en el patrón de sueño. Debido a las alteraciones que produce sobre el sueño, la enfermedad también se conoce como la enfermedad del sueño [78]. Transmitida por medio de la mosca tsetsé, la enfermedad la causan dos subespecies de parásitos hemoflagelados *Trypanosoma brucei*. La variedad gambiense y la variedad rhodesiense [37]. Las alteraciones han sido observadas en pacientes infectados con la variedad gambiense e incluyen: patrones polifásicos del ciclo sueño-vigilia producida por una alteración profunda en la alternancia de sueño y la vigilia durante las 24 horas del día y modificaciones de la estructura interna del sueño, caracterizada por episodios de SREM, que generalmente aparecen antes de las alteraciones del ciclo sueño-vigilia. La gravedad de las alteraciones en el ciclo sueño-vigilia, involucran episodios breves de sueño que ocurren con una frecuencia casi igual durante el día y la noche, y que se agudizan conforme a la gravedad de la enfermedad. Este hallazgo indica que dichas alteraciones no están directamente relacionados con la presencia del parásito en el SNC, y apunta a que son alteraciones funcionales lentamente reversibles y/o mecanismos de compensación durante la infección [79].

En un estudio realizado con ratas infectadas con *Trypanosoma brucei brucei* el análisis de la arquitectura del sueño reveló una mayor proporción de SOL y una disminución en la cantidad de vigilia 2 días antes de la muerte. Adicionalmente se observó fragmentación considerable del sueño, con numerosas alternancias entre las etapas de sueño y vigilia, así como un mayor número de episodios de vigilia y SOL, fragmentación de SOL y una marcada reducción en la latencia de sueño MOR, dando lugar a interrupciones considerables en las secuencias de sueño MOR-NMOR. Se han observado transiciones anormales, sobre todo en el inicio del sueño MOR, que marcan la ruptura de la estructura interna del sueño [80].

Otro agente parasitario que también causa alteraciones de sueño es *Plasmodium falciparum*. Este parásito es el causante de la forma más severa de malaria. Evidencias recientes sugieren que sus efectos pueden estar directamente relacionados con el hecho de que la *P. falciparum* es capaz de producir PGD₂, PGE₂ y PGF_{2a} por medio de una vía que se distingue claramente de la biosíntesis de prostaglandinas (PG) por la ciclooxigenasa en mamíferos y de que PGD₂ es una sustancia somnogénica, lo que sugiere que los parásitos de la malaria tienen ciertas estrategias de evasión para evadir las defensas del huésped a fin de establecer la infección. [41]

1.4 *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis es un nematodo parásito intracelular que invade los músculos estriados de mamíferos y es responsable de la triquinosis, una zoonosis causada por el consumo de carne cruda o poco cocida de animales infectados (por ejemplo, carne de cerdo) [81, 82]. Es un nematodo gastrointestinal filiforme dioico, es decir, que presenta organismos de cada sexo en individuos distintos de la misma especie. Es propio de zonas geográficas templadas y con distribución cosmopolita [83].

Este parásito presenta tres estadios: las larvas recién nacidas que miden 120 μm de longitud por 7 μm de diámetro, los parásitos adultos machos y hembras, en el cual el macho mide entre 1.4 mm a 1.6 mm de longitud por 40 μm de diámetro y la hembra mide de 3 a 4 mm de longitud por 60 μm de diámetro; el último estadio son las larvas musculares que representan la etapa infectante del parásito, estas se encuentran enrolladas en espiral en lo que se conoce como célula nodriza, que mide de 300 a 400 μm de largo por 150 a 200 μm de ancho [84].

La enfermedad parasitaria causada por el nematodo *T. spiralis* es conocida como trichinelosis y afecta a todos los mamíferos ya sean silvestres o domésticos. Esta se transmite de modo accidental al hombre por ingestión de carne o productos cárnicos crudos o insuficientemente cocinados, procedentes de animales infectados [84]. El cerdo doméstico es el principal reservorio de *T. spiralis* [83]

1.4.1 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *T. spiralis*, consta de dos fases: la fase entérica a nivel del intestino delgado y la fase sistémica, que ocurre a nivel del músculo esquelético, aunque puede presentarse en otros órganos y tejidos del organismo [83].

El ciclo comienza con la fase entérica, cuando el hospedero ingiere carne cruda o mal cocida la cual está contaminada con larvas musculares (LM); posteriormente, las enzimas y los jugos digestivos del estómago (pepsina y ácido clorhídrico) digieren la carne; las larvas musculares son liberadas para alojarse en la primera porción del intestino delgado (duodeno) donde penetran la mucosa intestinal e invaden el epitelio para lograr su establecimiento. Poco después, las larvas mudan cuatro veces y maduran a adultos hembras y machos (36-48 horas post-infección). La copula entre los parásitos hembras y machos ocurre en el lumen intestinal (4-5 días después de la ingestión oral, dpi) [82, 84]

Tras colonizar el intestino delgado, e invadir el epitelio las larvas hembras comienzan a depositar sus larvas. La larviposición se prolonga un tiempo variable dependiendo de la especie hospedadora y su respuesta inmune frente a la presencia del parásito. Cada hembra produce de 500-1500 larvas recién

nacidas (LRN, inmaduros o larva L1), en un periodo de dos a tres semanas. Poco después los adultos mueren y son expulsados. Las larvas recién eclosionadas son capaces de cruzar el epitelio intestinal y entrar a vasos linfáticos y venosos, para luego diseminarse por todo el organismo por medio de la circulación mayor, ubicándose finalmente en los músculos estriados de mayor actividad (más oxigenados), tales como los masticatorios, diafragma, intercostales, oculares y miembros superiores e inferiores; sin embargo, pueden infectar otros tejidos y órganos como SNC o corazón. Una vez en las fibras musculares, se enquistan y se vuelven infecciosos [82, 84].

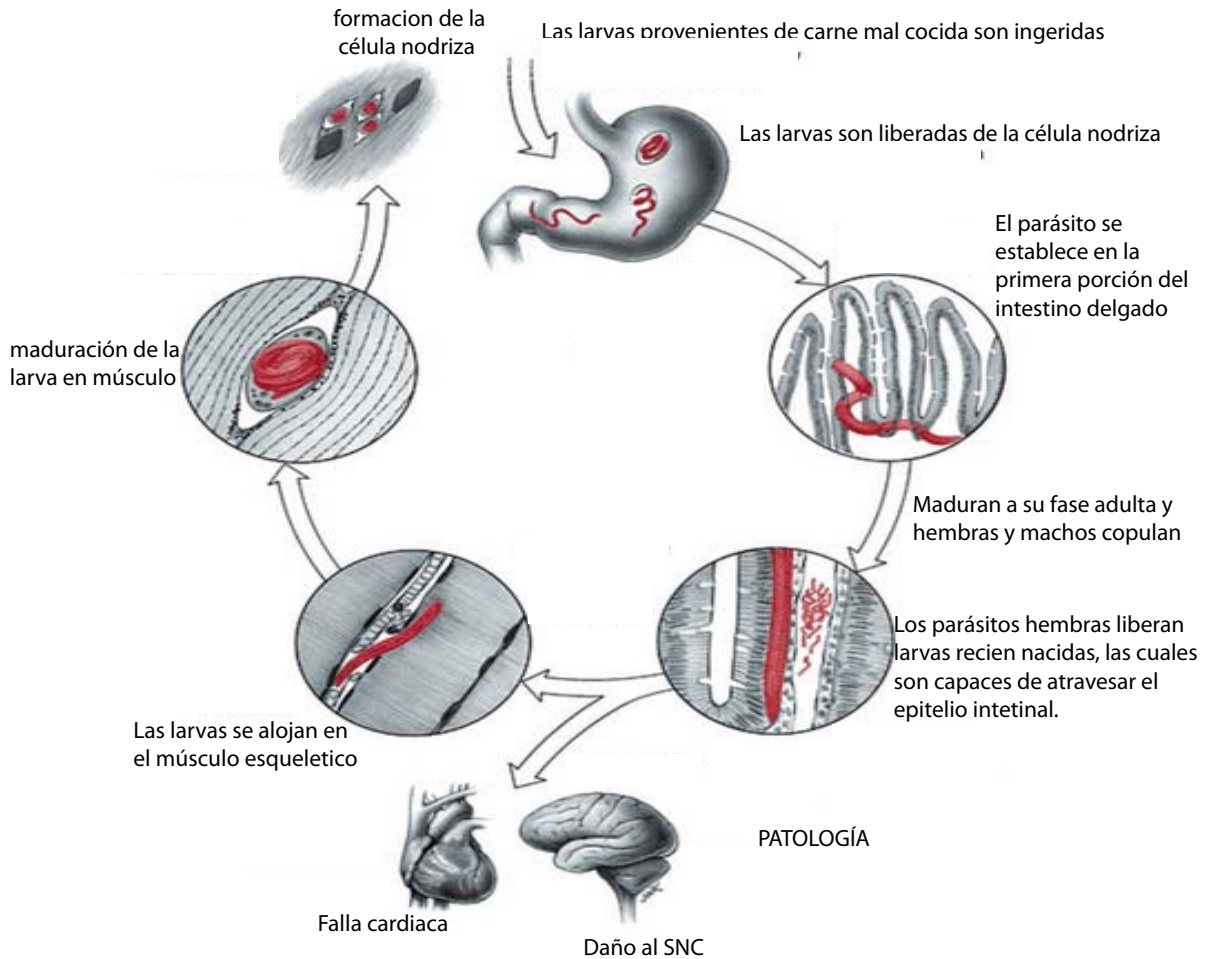


Figura 1.4.1-1. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. El recuadro rojo hace referencia a la fase infectiva del parásito. Modificada de <http://www.trichinella.org>

Cada larva se establece dentro de una fibra muscular (célula huésped), en su interior las larvas crecen durante 20 días, y pasan de 100 μm de longitud a 1 mm, después se enrollan en espiral, siendo envueltas en una cápsula fibrosa (producto de la reacción del hospedero) de forma elíptica, esta nueva estructura se le conoce como célula nodriza. El parásito modifica a la célula infectada, provocando la pérdida de los elementos contráctiles, vacuolización de las mitocondrias con desplazamiento central e hipertrofia de los núcleos y del retículo sacoplasmático, y desarrolla una doble membrana adyacente a

la cutícula de la larva, que da lugar a la elaboración de retículo endoplásmico rugoso y poliribosomas en la zona cercana a la cutícula larval, al tiempo que induce la síntesis de una cápsula de colágeno cuyo eje principal está orientado en el sentido de las fibras musculares que la rodean [85]

Cada célula nodriza desarrolla un fino plexo de vénulas periquísticas que facilitan el intercambio metabólico con el hospedero y la eliminación de desechos, estos cambios morfológicos y bioquímicos en la célula huésped le permiten al parásito protegerse de la respuesta inmune del hospedero. La larva muscular (LM) que se ha desarrollado es infectiva y puede permanecer viable durante años con capacidad de ser transmitida a otro hospedero. El ciclo reinicia cuando la carne que contiene larvas musculares es ingerida por otro hospedero [85, 86].

1.4.2 CUADRO CLÍNICO

La variabilidad y la intensidad de los síntomas de la Trichinelosis dependen del número de parásitos que afecten al individuo, la edad del paciente, sexo, estado nutricional, estado hormonal, estado inmunológico y tejido invadido.

La fases de la infección tienen rasgos clínicos característicos, a continuación se mencionan los más frecuentes para cada una de ellas:

Fase intestinal: en las primeras 24 horas a partir de la ingesta de carne infectada, la penetración de las larvas musculares a la pared intestinal ocasiona diarrea acompañada de dolor abdominal, náuseas y vómito que puede durar hasta una semana y de no hacer una historia clínica adecuada, generalmente se diagnostica como gastroenteritis o intoxicación alimentaria. Durante esta fase comprendida del día 1 al 15 solo existe infiltrado de poblaciones celulares y presencia de las hembras gestantes que van a liberar LRN, estas se desplazan desde las vellosidades hacia la mucosa intestinal y pasan a la circulación vía porta [87].

Fase parenteral: una vez que entran a la circulación mayor por medio de vasos venosos o linfáticos, estas se diseminan a diferentes partes del organismo pudiendo causar neumonía, encefalitis, nefritis y peritonitis. La muerte en esta fase puede ser debida a una miocarditis que ocurre en el 20% en los casos de pacientes hospitalizados [87].

Fase de penetración a las células: también llamada fase tardía o miopática: es generalmente de la primera a la octava semana, durante esta fase las larvas dañan a los vasos sanguíneos, lo que provoca el edema que es evidente en la cara y párpados, el paciente cursa con fiebre, hemorragias petequiales que se observan en la mucosa sublingual y conjuntivas, histológicamente se observa que la LRN se transporta a través del torrente circulatorio y tiene un paso transitorio a través del corazón [87].

Fase muscular: se presenta dolor, hiperestesia muscular, artralgias, cefalea y el edema periorbitario, los cuales son referidos como signos y síntomas clínicos. La Triquinelosis es la única helmintiasis que cursa con fiebre, la cual puede persistir por semanas simulando un cuadro de fiebre tifoidea. El dato más importante en las pruebas de laboratorio, es en la eosinofilia progresiva que varía entre 5 al 50%, además de una ligera leucocitosis de 12 a 15,000, estos datos asociados con fiebre, mialgias y trastornos gastrointestinales apoyan el diagnóstico de Triquinelosis [87].

1.4.3 RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA INFECCIÓN.

La infección por *T. spiralis*, en las fases agudas o locales, provoca una enteropatía caracterizada por hiperplasia de células caliciformes, una regulación a la alza de la producción y expresión de las mucinas Muc2, Muc3 e ITF (factor intestinal *trefoil*), así como un infiltrado inflamatorio en la lámina intestinal [88]. Esta etapa de la infección se caracteriza por que se presenta un proceso inflamatorio intestinal, en la que diversos tipos de poblaciones de células, incluyendo los linfocitos, células cebadas (mastocitos) y eosinófilos son reclutados a la lámina intestinal y a los nodos linfáticos [89]. La inflamación activa en la mucosa intestinal, es una respuesta inmune de tipo Th2, lo que sugiere la importancia de las células Th2 en la inmunidad protectora contra este parásito, ya que este tipo celular también participa en la generación de la hipercontractibilidad muscular. [88, 89]. La gravedad de los síntomas y la respuesta generada durante la fase entérica, pueden variar desde imperceptible, a síntomas tales como diarrea, postración y malestar general, dependiendo de la carga de parásitos con el que esté infectado el hospedero [90, 91].

Si bien no se entiende completamente el mecanismo inmunológico responsable de expulsión del parásito de la mucosa intestinal, se sabe que implica varios componentes de una respuesta tipo Th2, que incluye además de la participación de los linfocitos T cooperadores, la participación de las células cebadas, y citocinas y vías de señalización celular asociadas a este tipo de respuesta [92].

En la regulación de los mecanismos que facilitan la expulsión, además de los linfocitos T, otras células tales como las cebadas, las células intersticiales de Cajal (ICC) y células enteroendocrinas (EE) de la mucosa del intestino pueden desempeñar papeles importantes en el desarrollo de la hipercontractibilidad del músculo intestinal. La mastocitosis en la mucosa intestinal es un rasgo característico de la infección por este nematodo, y se considera que tienen un papel importante en la inmunidad protectora, su activación y posterior liberación de los mediadores que contienen han sido implicados no sólo en la expulsión de los gusanos, sino también en el desarrollo de una fisiología alterada observada durante la infección. En función de la célula epitelial, durante la infección por *T. spiralis* los mastocitos contribuyen a la expulsión del gusano alterando la permeabilidad de las células epiteliales (Fig. 1.4.3-1) [88].

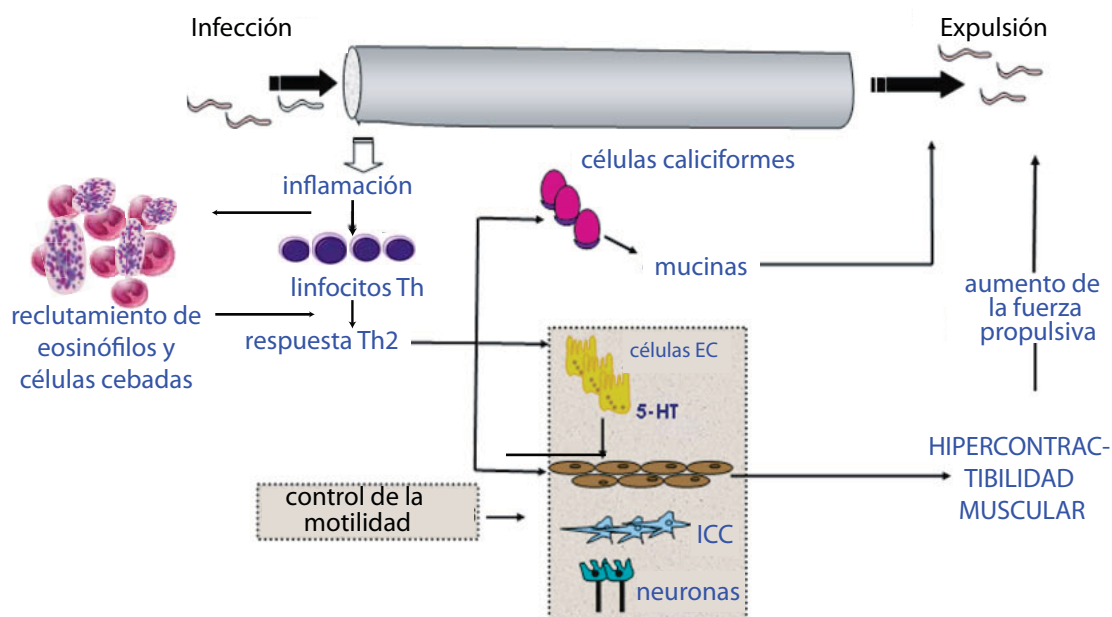


Figura 1.4.3-1. Respuesta inmune asociada a la infección por *Trichinella spiralis*. El proceso inflamatorio inicial se caracteriza por un aumento en el número de eosinófilos y células cebadas en el lugar de la infección, seguida por hiperplasia de las células caliciformes y el desarrollo de una respuesta tipo Th2, que es la encargada de robustecer la respuesta, aumentando la producción de moco, mucinas y de contractibilidad muscular (peristaltismo) a fin de que el parásito sea eliminado (Modificado con permiso de Khan, 2008 [88])

Adicionalmente, el aumento en el número de células cebadas parece jugar un papel importante en la generación de la inmunidad contra este parásito [92]. Estos mecanismos parecen involucrar la regulación por las citocinas IL-13 e IL-4, que actúan sobre las células que recubren las superficies de las mucosas, y sobre las células caliciformes [93]. En este aspecto la proteína secretada por células caliciformes, RELM- β , se ha implicado en este proceso, ya que tiene propiedades antihelmínticas que pueden antagonizar los sistemas neurosensoriales de múltiples nematodos *in vivo*, incluyendo los de *T. spiralis* [94]. Otras proteínas que al parecer aumenta en sus secreción, y son un mecanismo importante en la expulsión del parásitos son las que se encuentran en la superficie de las mucosas intestinales como las intelectinas y proteínas ricas en prolina [95].

Durante el proceso de expulsión se ha descrito que el yeyuno comienza a presentar edema e inflamación por lo que se ha planteado la hipótesis de que el aumento de la permeabilidad intestinal asociado con este tipo de respuesta Th2 es un mecanismo protector importante para el huésped [96]. El efecto de la señalización por IL-4/IL-13 durante la infección puede desencadenar una mayor resistencia de las células epiteliales y a la absorción de glucosa dependiente de Na^+ , lo cual conduce a un aumento de los fluidos luminales [97].

Durante la fase sistémica, la inflamación inducida por *T. spiralis* es limitada al parecer por la IL-10 y TGF β , que tienden a regular la respuesta desde el principio de la infección [98].

1.4.4 EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La triquinosis es actualmente considerada como una antropozoonosis que se distribuye en todo el mundo y dado que el parásito infecta una amplia variedad de especies de animales domésticos y al hombre, se le atribuye una distribución cosmopolita [83]. Se ha estimado que más de 11 millones de personas en todo el mundo son propensos a ser infectados [81]

La frecuencia varía según las regiones, siendo mayor en las zonas templadas que en las tropicales. Se pueden considerar tres ciclos epidemiológicos: el silvestre, el doméstico y el semidoméstico. En el primero intervienen los animales silvestres carnívoros, como osos, lobos, zorros, roedores, etc., y algunas aves depredadoras como la lechuza. El ciclo doméstico, afecta, en primer lugar, al cerdo, que se infecta al consumir carne de cerdos infectados por canibalismo o desperdicios de carne de cerdo o de rata contaminada. El ciclo semidoméstico afecta a perros, gatos, ratas, etc., estos animales se infectan al ingerir carne de cerdo infectada [84].

Una vasta cantidad de casos de trichinelosis han sido reportados mundialmente, excepto en las zonas al norte de Sudamérica, las zonas desérticas y algunas regiones de África donde no se han realizado estudios. La prevalencia mundial estimada alcanza las 11 millones de personas, sin embargo, se estima que este dato está subestimado debido a que síntomas de la enfermedad se confunden con una gastroenteritis [83].



Figura. 1.5.4-2. Distribución en México de *Trichinella spiralis*. (Tomada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trichinelosis>).

En México la prevalencia no se conoce con exactitud, pero se tienen antecedentes de brotes epidemiológicos en diferentes entidades de la República Mexicana, en el 2002 se detectó en 22 estados de la República Mexicana.

1.5 LA MUCOSA INTESTINAL

El intestino delgado (ID), es un órgano altamente diferenciado que cumple la función tanto de digestión como de absorción. Esta última función se encuentra asistida, en esencia, por las secreciones del páncreas y del hígado. La función del intestino delgado es auxiliada por el sistema nervioso y una enorme cantidad de células epiteliales endocrinas diversas [99].

El intestino delgado se divide en tres segmentos no bien limitados entre sí: Duodeno, Yeyuno e Íleon. En la rata llega a medir de 3 a 4 mm de diámetro y 90 cm de largo [100]. El duodeno es la primera porción, la más corta y la más ancha del intestino delgado, tiene la forma de una "U" o una "C" y se sitúa alrededor de la cabeza del páncreas. Comienza a la altura del píloro del estómago y termina en el ángulo duodeno-yeyunal. El duodeno es la porción donde desembocan los conductos provenientes del páncreas (accesorio y principal) y el colédoco proveniente del hígado. El ligamento de Treitz es la marca anatómica del inicio del yeyuno. El yeyuno que comienza en el ángulo duodenoyeyunal y constituye las dos quintas partes proximales del intestino delgado. Gradualmente cambia sus características morfológicas para convertirse en el íleon [99].

El epitelio del intestino delgado y del intestino grueso, poseen una estructura histológica semejante, que se caracteriza por una arquitectura gástrica de cripta-vello. En general, las criptas están primariamente involucradas en la renovación celular y en la secreción de iones y agua, mientras que las funciones del epitelio vellosos están dirigidas a la asimilación de nutrimentos [99], adicional a la internalización de estas moléculas exógenas que son los nutrientes, en mamíferos las vellosidades representan una defensa del Sistema Inmune [100].

La mayor parte de los procesos de digestión y de absorción de nutrientes se producen en el intestino delgado. Debido a ello, su estructura está especialmente adaptada para esta función. Su longitud proporciona una gran área superficial para la digestión y la absorción, dado que es incrementada aún más por los pliegues circulares, las vellosidades, y las microvellosidades [100, 101]. Como se mencionó anteriormente el epitelio intestinal es una barrera que separa el mundo microbiano en el lumen intestinal del ambiente aséptico del intersticio. El intestino posee mecanismos de defensa que limitan el paso de alérgenos, toxinas y patógenos al organismo. Esta barrera intestinal de superficie mucosa está integrada por diversos elementos. Dentro del epitelio existen varios tipos de células altamente especializadas dedicadas a la regeneración epitelial, la adquisición de nutrimentos, la defensa innata, el transporte de inmunoglobulinas y la vigilancia inmunológica [99].

En este estudio es de particular interés el duodeno, ya que es la porción del intestino delgado en donde se establece el parasito *Trichinella spiralis*. A continuación hablaremos sobre la histología y morfología del duodeno.

1.5.1 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL

La pared del intestino delgado se compone de las mismas cuatro capas que componen la mayor parte del tracto gastrointestinal: mucosa, submucosa, muscularis y la serosa (fig.1.5.1-1). La serosa exterior dura cubre la pared, las dos capas musculares (longitudinal y circular) generan las contracciones rítmicas responsables de la peristalsis, mientras que la mucosa y una submucosa intestinal alojan a los tejidos conectivos [99, 101].

La mucosa se compone de una capa simple de epitelio, de la lámina propia y de la muscular. Los pliegues circulares también conocidos como válvulas de Kercking, consisten en repliegues transversales permanentes que contienen un centro de submucosa, y se extienden alrededor de la luz intestinal [99, 101].

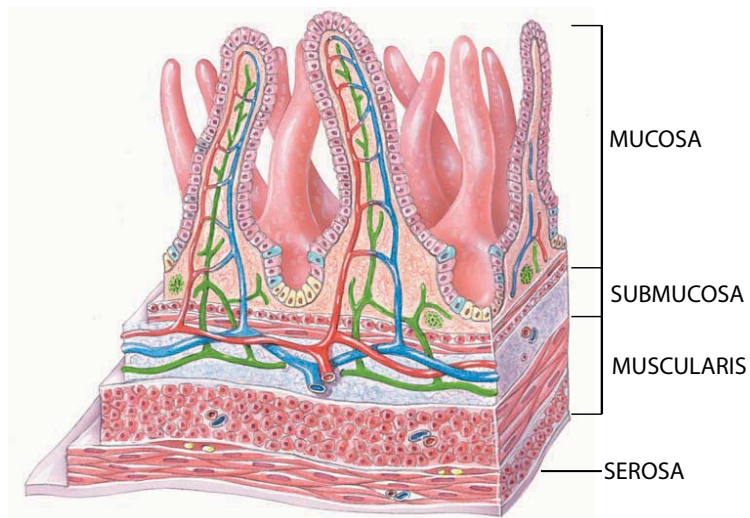


Figura 1.5.1-1. Constitución de la pared del Intestino delgado. Se muestran la morfología de cuatro capas mucosa, submucosa, la muscularis y la serosa. (Modificado con permiso de Tortora, 2012 [101])

Las vellosidades, las microvellosidades, las glándulas intestinales, la lámina propia junto al GALT asociado y la muscular de la mucosa, son características esenciales de la mucosa. Las vellosidades son evaginaciones de la mucosa que sobresalen en la luz intestinal, en el duodeno las vellosidades son anchas y cortas (su altura es solamente de 0.2 a 0.5 mm), en la formación de cada vellosidad participan todos los estratos de la mucosa. Estas se encuentran próximas unas a las otras, y dan a la superficie de la mucosa un aspecto aterciopelado [99]. En ratas y humanos el epitelio de la vellosidad esta formada por tres tipos de células: absortivas, células endocrinas y células caliciformes [100].

El epitelio está recubierto por una capa continua de moco, el cual tiene la función de lubricar y proteger la mucosa de la deshidratación además de ser una barrera física. El moco es permeable a los componentes de bajo peso molecular, esta propiedad es importante para la absorción intestinal de nutrientes, unos de sus componentes principales son las mucinas las cuales también son sintetizadas y secretadas por las células caliciformes [102].

Los enterocitos son células absortivas especializadas en el transporte de sustancias desde la luz del intestino hacia el torrente sanguíneo, son células cilíndricas altas que tienen un núcleo en posición basal, como se puede observar en la figura 1.5.1-2. Las microvellosidades aumentan la extensión de la superficie apical hasta 600 veces. La región apical de estas células adquiere un aspecto estriado a la inspección con el microscopio óptico, de ahí el nombre de “chapa estriada” que recibe el conjunto de microvellosidades apicales de las células epiteliales intestinales [99].

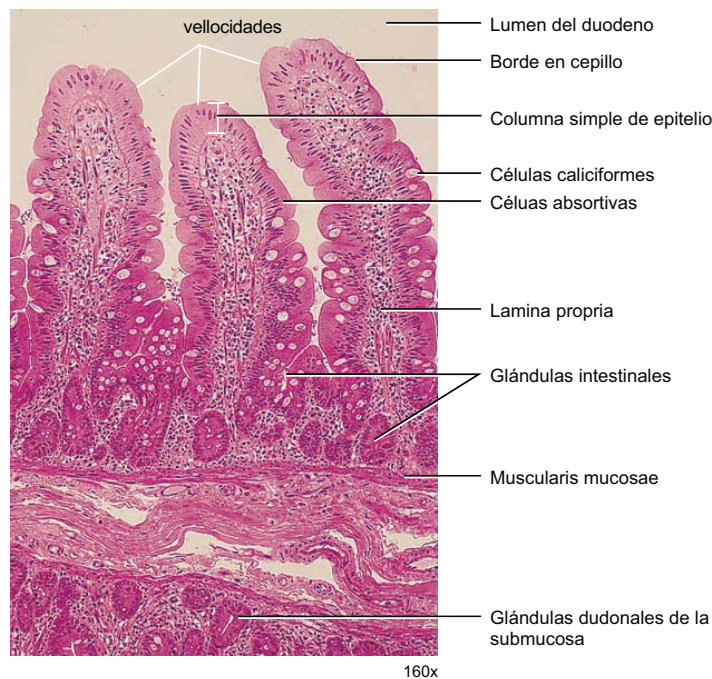


Figura 1.5.1-2. Histología y organización de la mucosa Intestinal. Histología realizada con tinción de H-E, se observan los principales componentes en los vellos y en la zona peri-criptal. Por debajo se indica la capa Muscularis. (Modificado con permiso de Tortora, 2012 [101])

Los enterocitos están unidos entre si y a diferentes tipos celulares como a las células caliciformes, a las células enteroendocrinas y a otras células del epitelio por uniones complejas. Estas uniones estrechas (zonulae occludens) establecen una barrera entre la luz intestinal y el compartimiento intercelular epitelial, de esta manera se permite la retención selectiva de las sustancias absorbidas por los enterocitos. Por debajo del endotelio se encuentra la lamina propia, la cual constituye el contenido de las vellosidades (Fig. 1.5.1-2); esta compuesta por tejido conjuntivo laxo que contiene una cantidad

abundante de fibroblastos, células musculares lisas, linfocitos, plasmocitos, eosinófilos, mastocitos, macrófagos y una red de capilares sanguíneos que están justo debajo de la lámina basal del epitelio [103].

Además, la lámina propia de la vellosidad posee un capilar linfático que se origina localmente en un fondo de saco ciego y recibe el nombre de vaso quilífero central. Posee muchos nódulos de tejido linfático que constituyen el componente principal del GALT (tejido linfático asociado con el intestino). Estas aglomeraciones nodulares se conocen como conglomerados linfonodulares ileales o placas de Peyer. En la anatomía macroscópica se ven como conjuntos de manchas blanquecinas en la mucosa [99].

La capa de células epiteliales de la mucosa contiene varios tipos de células: células absortivas, caliciformes, enteroendocrinas, y de Paneth [101], que se distribuyen a lo largo de las vellosidades, como se muestra en la figura 1.5.1-3.

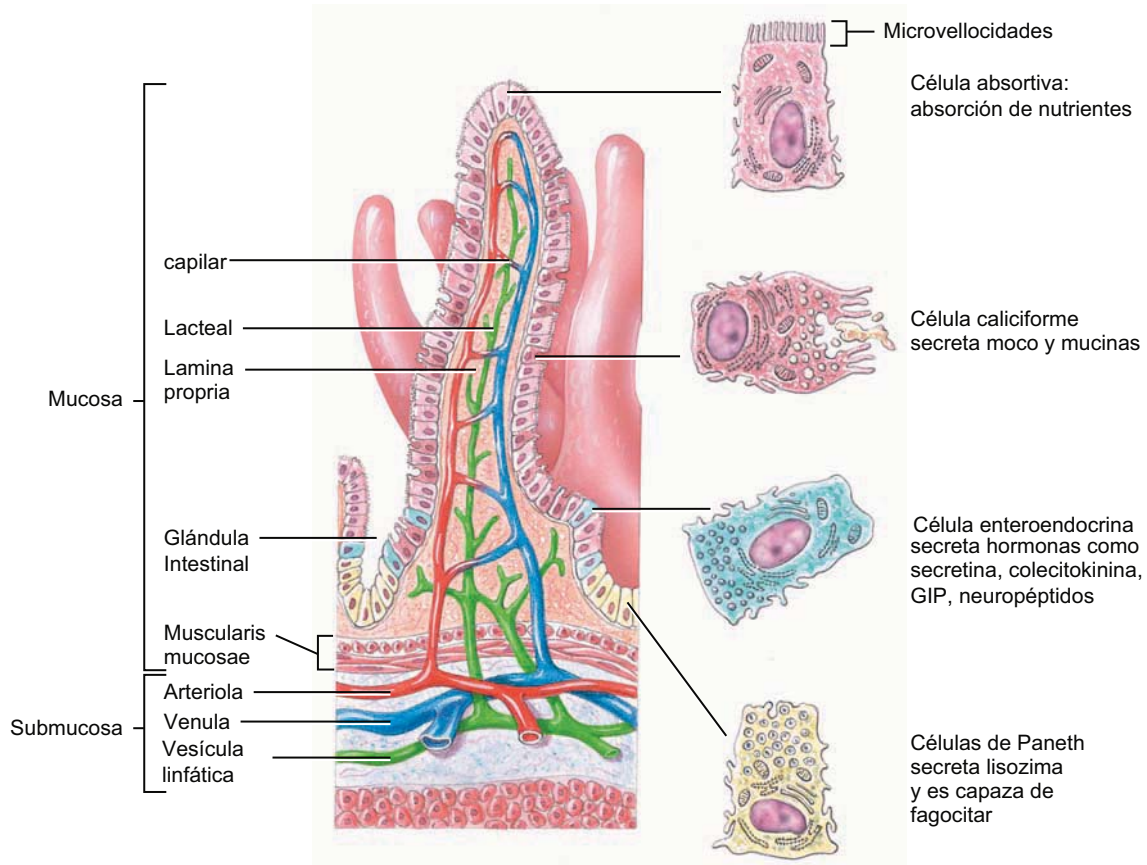


Figura 1.5.1-3. Constitución de la pared del Intestinos delgado. Del lado izquierdo se muestran las capas mas superficiales de las que se compone el tracto gastrointestinal a nivel del intestino delgado: mucosa, submucosa. En la segunda columna se muestra la constitución de la lamina propia, mientras que en la columna del lado derechos se muestra la conformación del epitelio, así como los tipo celulares que se localizan en esta capa. (Modificado con permiso de Tortora, 2012)

Distales a las vellosidades se encuentran las glándulas intestinales o criptas de Lieberkühn, las cuales son estructuras tubulares simples que se extienden desde la muscular de la mucosa a través de todo el espesor de la lámina propia y desembocan en la superficie luminal del intestino a la altura de las vellosidades (fig. 1.5.1-2). Las glándulas están revestidas por un epitelio simple cilíndrico que es continuo y dan origen a cuatro linajes epiteliales primarios: enterocitos absorbentes, células caliciformes secretoras de mucina, células enteroendócrinas y células de Paneth (fig. 1.5.1-3) [99, 104].

Los constituyentes celulares de las criptas, son responsables de la secreción de agua y de iones, así como de secreciones exocrinas, paracrinas y endócrinas, mientras que los vellos intestinales son primariamente responsables de la absorción de fluido y nutrimentos. La muscular de la mucosa (*Muscularis mucosae*) es una banda delgada de tejido muscular liso y de fibras elásticas. El tejido muscular está compuesto de una banda circular interna y una banda longitudinal externa. Pequeñas bandas de ésta se extienden por la lámina propia hacia las vellosidades [99].

La submucosa esta formada por un tejido conjuntivo denso que en algunos sitios localizados contiene acumulaciones de adipocitos. Una característica del duodeno es la presencia de glándulas submucosas, también conocidas como glándulas de Brunner (Fig. 1.5.1-2). Las glándulas submucosas tubulares ramificadas del duodeno poseen células secretoras con características tanto de células productoras de cimógeno como de células productoras de moco. La secreción de estas glándulas tiene un pH de 8.1 a 9.3 y contienen glucoproteínas neutras y alcalinas e iones de bicarbonato. Es muy probable que esta secreción de característica muy alcalina sirva para proteger al intestino delgado proximal al neutralizar el quimo ácido que llega desde el estomago. También acerca el pH del contenido intestinal a los valores óptimos para la acción de las enzimas pancreáticas que llegan al duodeno [99].

La muscular externa esta compuesta por una capa interna de células musculares lisas de disposición circular y una capa externa de las mismas células pero distribuidas en sentido longitudinal. En el intestino delgado se producen dos clases de contracciones musculares. Las contracciones locales desplazan el contenido intestinal en dirección tanto proximal y distal y se denominan contracciones de segmentación; estas contracciones son causadas principalmente por la capa de musculo circular y tiene la función de movilizar localmente el quilo, mezclarlo con los jugos digestivos y hacerlo entrar en contacto con la mucosa para que absorba el producto de la digestión. Las contracciones peristálticas, que constituyen la segunda clase, se deben a la acción coordinada de ambas capas musculares (circular y longitudinal) y desplazan el contenido del intestino en dirección distal. Finalmente la serosa es la capa más superficial del tracto GI, es una membrana compuesta por una capa de epitelio simple plano llamado mesotelio y una pequeña cantidad de tejido conjuntivo subyacente [99].

La inervación del tracto digestivo está dada por un componente extrínseco y otro intrínseco. Los nervios del intestino delgado son suministrados por el plexo mesentérica superior. Las ramas del plexo

contienen fibras post-ganglionares simpáticas, fibras parasimpáticas pre-ganglionares y fibras sensoriales. Las fibras sensoriales son componentes del nervio vago (X) y los nervios de la columna vertebral de las vías simpáticas. En la pared del intestino delgado se encuentran los dos plexos autonómicos: el plexo mientérico entre las capas musculares y el plexo submucosa en la submucosa. La inervación intrínseca es llevada a cabo por el Sistema Nervioso Entérico que está formado por dos plexos nerviosos: el plexo de Auerbach ó mientérico (localizado entre las subcapas de la muscular propia) y el plexo de Meissner ó submucoso (localizado en la submucosa) [99, 101]. Las fibras nerviosas en el músculo liso de los vasos sanguíneos surgen principalmente de la división simpática del sistema nervioso autónomo, mientras que las fibras nerviosas en el músculo liso de la pared intestinal se originan a partir del nervio vago (X) [101].

En estos plexos se encuentran neuronas efectoras, neuronas sensitivas (afectoras) e interneuronas. Las neuronas efectoras del plexo de Auerbach (mientérico) inervan a las células musculares de la capa muscular propia, controlando el movimiento peristáltico. Las neuronas efectoras del plexo de Meissner (submucoso) controlan la secreción mediante la innervación de las células secretoras de la mucosa, y controlan el movimiento de la muscular de la mucosa. Las células sensitivas del plexo mientérico actúan como mecanorreceptores del músculo liso de la muscular propia, mientras que las células sensitivas del plexo submucoso funcionan principalmente como quimiorreceptores. Las interneuronas conectan ambos plexos. La inervación extrínseca esta dada por el sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático), que a su vez regula el sistema nervioso entérico [105].

1.5.2 HISTOFISIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO INTESTINAL

El tracto gastrointestinal es una barrera física y bioquímica adaptada a la colonización por bacterias comensales que ayudan en la digestión, e influyen en el desarrollo y función del sistema inmune de la mucosa. La superficie del epitelio intestinal se renueva continuamente por las células madre del epitelio intestinal que residen en la base de las glándulas. A lo largo del eje glándula-vellosidad del epitelio, las células madre intestinales experimentan una rápida proliferación y diferenciación en diversas poblaciones celulares, para dar lugar a las células absorbentes o enterocitos, a las células caliciformes secretoras de mucina, a las células enteroendocrinas, a las células de Paneth, y a las células M (células con micropliegues) (Fig 1.5.2-1). Las células epiteliales migran hacia arriba en la glándula intestinal y ascienden por la vellosidad hasta que se exfolian en su extremo. Para que este proceso de renovación celular se mantenga, las células madre epiteliales deben ser capaces de someterse a repetidos ciclos de replicación y poseer la capacidad continua de auto-renovación. El nicho intestinal de la célula madre epitelial contiene epitelio, estroma y células hematopoyéticas, que controlan la continua renovación de epitelio intestinal [102].

Las diversas funciones de las células epiteliales resultan en una barrera dinámica, que protege al huésped de la infección y la exposición continua a estímulos potencialmente inflamatorios. Para cumplir esta función, las células epiteliales intestinales están estrechamente interconectadas por diferentes complejos de proteínas que comprenden uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas. Estas conexiones célula-célula facilitan la estabilización de la cohesión mecánica de las células que definen la frontera entre la membrana basolateral y las regiones apicales; tales conexiones también son esenciales para la regulación de la permeabilidad paracelular. Los tres tipos de adhesión compleja en el contacto célula-célula están mediados por una interacción entre la región extracelular específica, por proteínas transmembrana, además de una región intracelular. Estas proteínas se conectan a través de proteínas adaptadoras al citoesqueleto. Existen cuatro tipos de proteínas de membrana integrales, llamadas ocludinas, los claudinas, y tricellulinas y moléculas de adhesión de unión, que son los principales componentes de las uniones estrechas (tight junctions) [106].

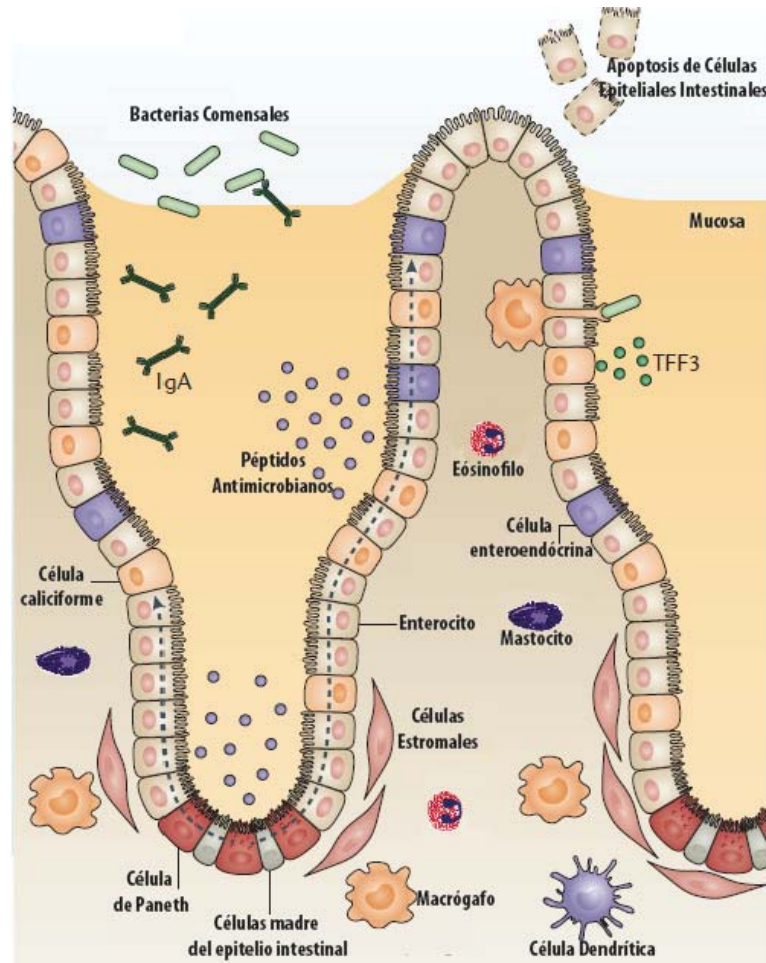


Figura 1.5.2-1. Células epiteliales de la barrera intestinal. Las células epiteliales diferenciadas –con la excepción de las células de Paneth – migran hasta el eje cripta-vellosidad. Las células caliciformes y células de Paneth secretan moco y péptidos antimicrobianos para promover la exclusión de las bacterias de la superficie epitelial. La secreción y liberación luminal de IgA contribuyen aún más a esta función de barrera. Las células de los micropliegues (células M) y las células caliciformes median el transporte de antígenos luminales y bacterias vivas a través de la barrera epitelial de las células dendríticas, y los macrófagos intestinales residente migran a la luz a través de las dendritas transepiteliales. TFF3, factor trébol 3 (Imagen modificada con permiso de Peterson LW y A David A, 2014 [107]).

La mayoría de las células que bordean el lumen intestinal son enterocitos de absorción, que están adaptados para la función digestiva y metabólica. Las células secretoras de mucinas y péptidos antimicrobianos, las células caliciformes y las células de Paneth, establecen una barrera física y bioquímica, al contacto microbiano con la superficie epitelial y las células inmunes. Las células enteroendocrinas representan un vínculo entre el sistema neuroendocrino central y el entérico, a través de la secreción de numerosas hormonas reguladoras de la función digestiva [108, 109].

Las células enteroendocrinas migran junto con las células absortivas y caliciformes, pero con un ritmo mas lento. Las células de Paneth no migran sino que permanecen en la base de la glándula intestinal cerca de las células madre de las que derivan [99].

Las células epiteliales intestinales (IEC) pueden detectar y responder a los estímulos microbianos para reforzar su función de barrera y para participar en la coordinación de las respuestas inmunes apropiadas, e incluye la tolerancia de la inmunidad. Por lo tanto, las IEC mantienen un rol, inmunorregulador fundamental ya que participan en el desarrollo y la homeostasis de las células inmunitarias de las mucosas. Otros componentes importantes, que participan en la inmunidad intestinal son células eosinofílicas y masocitos que se encuentran en la lamina propia [99]

En el intestino delgado humano, la migración de células a lo largo de la estructura cripta-vello toma de 5 a 7 días y finalmente resulta en la extrusión o el descamado de células epiteliales apoptóticas en las puntas de los vellos.

1.5.2.1 EOSINÓFILOS

Los eosinófilos son leucocitos pro-inflamatorias multifuncionales que se encuentran en el sistema hematopoyético, y en ciertos tejidos que incluyen las mucosas y submucosas del sistema gastrointestinal, respiratorio y en el tracto urinario [110]. Son reclutados de la circulación al foco de la inflamación, en donde pueden modular la respuesta inmune. Son capaces de iniciar respuestas inmunes específicas, al actuar como células presentadoras de antígeno. En este contexto, los eosinófilos expresan moléculas co-estimuladoras (CD40, CD28, CD86, B7.1 y B7.2), secretan citocinas capaces de estimular los linfocitos (IL-2, IL- 6, IL-12, IL-4, IL-10), y pueden ser inducidas a expresar el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II. Adicionalmente, los eosinófilos pueden tener efectos pro-inflamatorios, ya que pueden secretar una variedad de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-16, y el factor de crecimiento transformante (TGF) α/β), quimiocinas (RANTES y eotaxina) y mediadores lipídicos [111].

Estas células también pueden fungir como células efectoras e inducir daño tisular y disfunción mediante la liberación de mediadores lipídicos (factor activador de plaquetas (PAF) y leucotrieno C4) y de proteínas contenidas en sus gránulos, como la proteína básica mayor (MBP), la proteína catiónica eosinofílica (ECP), peroxidasa eosinofílica (EPO) y neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) [110, 111].

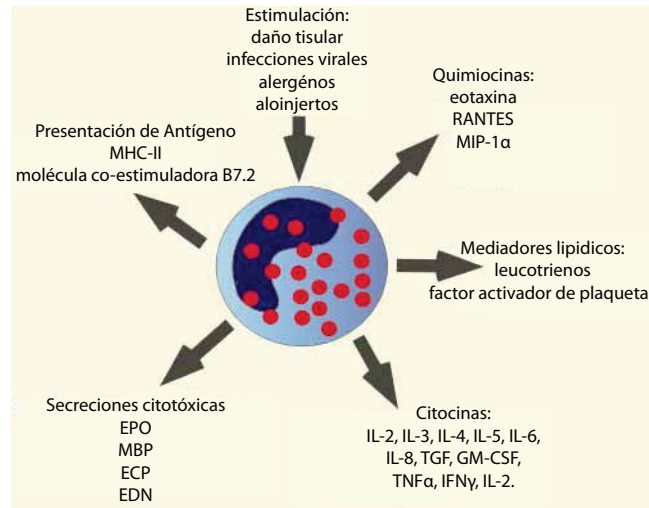


Figura 1.5.2.1-1 Diagrama de los efectos pleiotrópicos de los eosinófilos. Se muestran los efectos de las moléculas contenidas en sus gránulos, los cuales son liberados cuando la célula se transforma a su fase madura, en la cual también aumenta la expresión del MHC-II y su molécula co-estimuladora. Se incluyen los agentes que pueden provocar su activación y posterior maduración. (Modificada con permiso de Rothenberg, 2001 [111]).

Particularmente en el intestino delgado, su distribución varía en diferentes regiones. En el duodeno, los eosinófilos se observan principalmente a lo largo de las vellosidades, mientras que en el yeyuno y el íleon, la mayoría se encuentran en la base de las vellosidades en la región de las criptas de Lieberkühn. Durante procesos infecciosos se pueden encontrar en placas de Peyer, sin embargo en ausencia de infección solo se han encontrado en la lamina propia [111].

Se ha observado que esta población aumenta notablemente durante procesos patológicos e infecciones, su reclutamiento es mediado por numerosos moduladores pro-inflamatorios como IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, y por quimiocinas como, RANTES, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-3, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α y el factor estimulante de colonias de macrófagos, así como por eotaxina [110]. La IL-3 y el GM-CSF en asociación con IL-5 aumentan el desarrollo de eosinófilos, su migración y sus funciones efectoras, mientras que IL-1, IL-4 e IL-13 y el TNF podrían regular su tráfico por medio de la activación del sistema de adhesión del endotelio. La IL-5 en colaboración con otras quimiocinas y mediadores lipídicos promueven también su tráfico aumentando la quimioatracción. La acumulación de los eosinófilos está mediada por una familia de quimiocinas recientemente descubierta, llamadas eotaxinas, las cuales se ha observado, son específicas para esta población (Fig. 1.5.2.1-1) [111].

Los eosinófilos son células que juegan un rol importante durante la infección por helmintos. En esta situación su expansión es regulada por linfocitos T, a través de la secreción de IL-5. Durante la infección por *Trichinella spiralis*, se ha observado su acumulación en la lamina propia, ganglios linfáticos mesentéricos y en bazo, particularmente se le encuentra adyacentes al parásito [110]. Durante procesos inflamatorios, la secreción de las moléculas contenidas en sus gránulos, como MBP, ECP y EPO aumenta el potencial citotóxico de estas células ya que aumenta la actividad de estas mismas moléculas como ribonucleasas, así mismo, la liberación de estos componente causa la degranulación directa de células cebadas y basófilos [111].

1.5.2.2 CÉLULAS CEBADAS

Las células cebadas son células residentes de los tejidos, se derivan de progenitores que se mantienen en circulación después de su salida de la medula ósea. Este tipo celular madura cuando ya se encuentra dentro del tejido bajo la influencia de factores de crecimiento locales, especialmente el factor de células pluripotenciales (SCF; también conocido como ligando de KIT) e IL-3. Aunque su distribución es amplia en el organismo, se le encuentra mas abundantes cerca de barreras que están en contacto con el ambiente, como la piel y las mucosas, por lo que se considera que participan en la primer línea de defensa contra patógenos y otras agresiones ambientales [112].

La característica más distinguible es su alto contenido de gránulos densos de propiedad lisosomal, (también conocidos como lisosomas secretores), que además ocupan la mayor parte de su citoplasma. Estos gránulos secretores están llenos de una amplia variedad de componentes preformados, que son secretados cuando la célula se activa. Estos componentes pueden tener un efecto importante sobre otras funciones fisiológicas, pero también sobre eventos patológicos [112].

La degranulación de las células puede ser inducida por varios estímulos, el más importante por medio del reconocimiento de IgE, pero también por activación del complemento, algunos péptidos y ciertas toxinas. La degranulación también es acompañada por la síntesis de *novo* de algunos componentes bioactivos, que incluyen mediadores lipídicos (como leucotrieno C4, prostaglandina D2, y factor activador de plaquetas; así como interleucinas y citocinas). Es este aspecto, cabe señalara que la activación de estas células no siempre conlleva a la degranulación, pero si la secreción de citocinas [112, 113].

La acciones fisiológicas o bien, las patológicas están estrechamente relacionadas con las acciones biológicas de los componentes de sus gránulos, ya que la ausencia o disminución de algunos de sus componentes parecen parece tener impacto sobre varias condiciones inmunes, al mismo tiempo que pueden tener una participación importante en la regulación de numerosas funciones inmunes.

De los componente mas abundantes en sus gránulos, se encuentra la histamina y la serotonina. De acuerdo con sus propiedades lisosomales, estos gránulos contienen hidrolasas, además de que son capaces de almacenar citocinas y factores de crecimiento preformados como TNF y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [114]. La proteasa de estas células son específicas de ellas, entre las que se encuentran, la tripsasa, quimasa, y la carboximetilpeptidasa A3(CPA3) como principal constituyente de sus gránulos. Otros de los principales componentes son los proteoglicanos de tipo seringlicina, estas moléculas tiene una gran densidad de carga aniónica, y son capaces de interactuar electroestáticamente con otros gránulos, y son las responsables de la tinción característica para estas células [115].

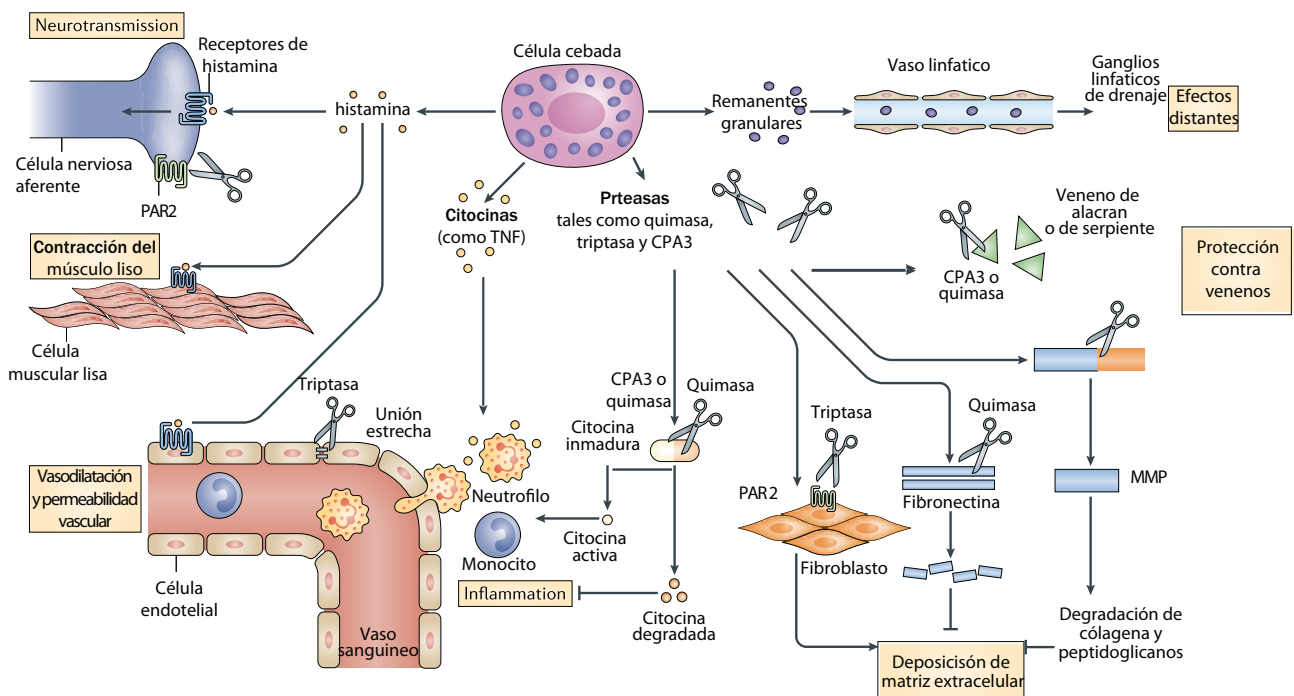


Figura 1.5.2.2-1. Efectos biológicos de los componentes de los gránulos de las células cebadas. Se muestran algunos ejemplos de los efectos biológicos que se les atribuyen a los componentes de los gránulos como la histamina, las citocinas y proteasas (Modificado con permiso de Wernersson, 2014 [112]).

La respuesta pro-inflamatoria a consecuencia de la degranulación es llevada a cabo por los componentes preformados contenidos en sus gránulos, como la histamina, el TNF α , y proteasas como la quimasa, tripsasa y carboximetilpeptidasa A3. La histamina tiene múltiples efectos cuando esta es reconocida por su receptor, e incluyen la estimulación de células nerviosas afrentes, estimulación de la contracción muscular (causando por ejemplo broncoconstricción), así como inducción de vasodilatación y aumento en la permeabilidad vascular. La secreción de citocinas preformadas, como TNF, contribuye de manera significativa a la respuesta pro-inflamatoria, la cual también es favorecida por otras citocinas y mediadores lipídicos sintetizados de *ново*. Otra forma en que las células cebadas contribuyen al

proceso inflamatorio es por medio de la activación del receptor activador de proteasas 2 (PAR2), la cual degrada las uniones adherentes o las proteínas del hemidesmosoma. Por otro lado, estas células también pueden tener efectos anti-inflamatorios, principalmente por medio de la degradación de quimiocinas y citocinas. Los componentes de los gránulos (en particular las proteasas) pueden tener efectos diversos en la matriz extracelular (ECM). En este aspecto las proteasas pueden funcionar como agentes pro-fibroticos y promover la deposición de ECM, por medio de la activación de PAR2 o de fibroblastos (induciendo así la síntesis de colágeno) o por activación del factor de crecimiento transformante pro-fibrotico. Las proteasas también pueden promover el desarreglo de la matriz directamente por medio de la degradación de los componentes de la ECM como la fibronectina, o indirectamente por medio de pro-enzimas metaloproteinasas de la matriz causando en consecuencia la degradación de colágenos y proteoglicanos como se muestra en la figura 1.5.2.2-1. [112, 115, 116]

Las proteasas de las células cebadas son además esenciales para la protección contra componentes nocivos como varias toxinas que están presentes en los venenos como en el de las serpientes y escorpiones. Las secreciones de los gránulos pueden ser transportadas a través del sistema linfático hacia los ganglios, donde actúan como acarreadores para los componentes bioactivos como el TNF (Figura 1.5.2.2-1) [112].

1.5.2.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas son una población heterogénea que consiste en células dendríticas clásicas (DCs) y células dendríticas plasmocitoides (pDCs), con habilidades específicas para responder a estímulos externos diferentes y que activan a diferentes tipos de linfocitos efectoros [117, 118]. Reconocen y captan patógenos, y son esenciales en la presentación de antígenos para iniciar la respuesta específica adaptativa, por lo que son una conexión importante entre la respuesta innata y la adaptativa [119].

En su estado inmaduros, funcionan como centinelas. Se encuentran recorriendo continuamente la periferia, reconociendo antígenos propios y no propios. Las células dendríticas también abundan en lugares que están en contacto directo con el ambiente, como la piel y las mucosas, así como en la zona marginal del bazo y en ganglios linfáticos. Expresan un set de patrones de reconocimiento (PRRs), que reconocen bacterias, virus, hongos, parásitos, así como, cuerpos necróticos y células muertas. Su activación puede ser inducida por microorganismos, células infectadas, así como por cuerpos apoptóticos. Después de ingerir al antígeno, este es procesado y cargado en forma de péptidos en el MHC [120].

Este tipo de células deriva de un progenitor común que da lugar tanto a células dendríticas como a macrófagos y monocitos. Este progenitor después se diferencia en el precursor de células dendríticas restringido a la generación de células dendríticas plasmocitoides (pDCs) y de células dendríticas

convencionales (cDCs). Las células dendríticas plasmocitoides se terminan de diferenciar en médula ósea, y originan a una células preDC que completan su maduración al salir, migrar y establecerse en órganos linfoides y no-linfoides, en estos tejido terminan de diferenciarse en otras poblaciones que incluyen a las $CD8\alpha^+/CD103^+$, y $Cd11b^+$ [121].

En ratones se han caracterizado dos poblaciones diferentes de células dendríticas. Ambas expresan CD115 (M-CSFR), CD11b, y bajos niveles de F4/80. La primera de estas poblaciones ha sido llamada monocitos inflamatorios y expresan además de las moléculas anteriores los siguientes marcadores: Ly6c, la quimiocina receptor CCR2, la molécula de adhesión L-selectina (CD62L) y el antígeno 7/4. Son selectivamente reclutados a los tejidos inflamados y ganglios linfáticos, en donde se diferencian en células dendríticas inflamatorias. La segunda población se caracteriza por su alta expresión del receptor para la quimiocina CX3CR1, LFA-1 y CD43, y baja expresión de Ly6c, y no expresan CCR2. Son de tamaño mas pequeño y una vida media más larga, se encuentran recorriendo tejidos periféricos bajo condiciones no-inflamatorias. Se le denomina monocitos residentes, debido a que ellas reconstituyen a los macrófagos y CD de los tejidos [122].

Los ligandos de TLRs en la célula dendrítica inducen una maduración fenotípica y funcional que puede modular el metabolismo celular y su expectativa de vida, así como la dinámica entre el citoesqueleto y los orgánulos. Presentan una alta señalización durante su estado estable, sin embargo la señalización que proviene de los comensales no conduce a su maduración [122].

La activación de células no maduras conlleva su migración a los ganglios linfáticos o bazo de una forma dependiente a la expresión quimiocinas como de CCR-7, en estos tejidos terminan de diferenciarse a su forma madura. El proceso de maduración es acompañado por un re-arreglo en el citoplasma, el cual incluye la pérdida del aparato con el que ingiere al patógeno, así como aumento en la expresión del MHC acomplejado a péptidos antigénicos, así como moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD54. Tales cambios inducen una excelente habilidad de presentar antígeno y activar a los linfocitos T. Juegan un papel importante en la inducción de la respuesta anti-viral de los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$), y por otro lado, también son células muy eficientes activando linfocitos T cooperadores a través del MHC-II durante infecciones bacteriana. También son capaces de promover la proliferación de linfocitos B a células plasmáticas por medio de la secreción de factores solubles. De forma adicional, contribuyen también a la formación de la tolerancia inmunológica presentando antígenos derivados de diferentes tejidos a los linfocitos T citotóxicos (presentación cruzada) y a los linfocitos T cooperadores (presentación directa) [122-124].

Esta población es esencial para el mantenimiento de las células NK, para los linfocitos T citotóxicos de memoria ($CD8^+$), y los linfocitos T reguladores ($Foxp3^+$), e indirectamente controlan la población de células mieloides. Citocinas, factores de crecimiento y factores de transcripción son el soporte del

desarrollo y maduración de la célula dendrítica, como GM-CSF-STAT5, que son universalmente requeridos para el desarrollo tanto de las poblaciones convencionales como de las plasmocitoides. Otros factores que facilitan estos procesos son FLT3- STAT3, sin embargo, existen poblaciones que se desarrollan de forma independiente a este ultimo factor, como las células de Langerhans [122].

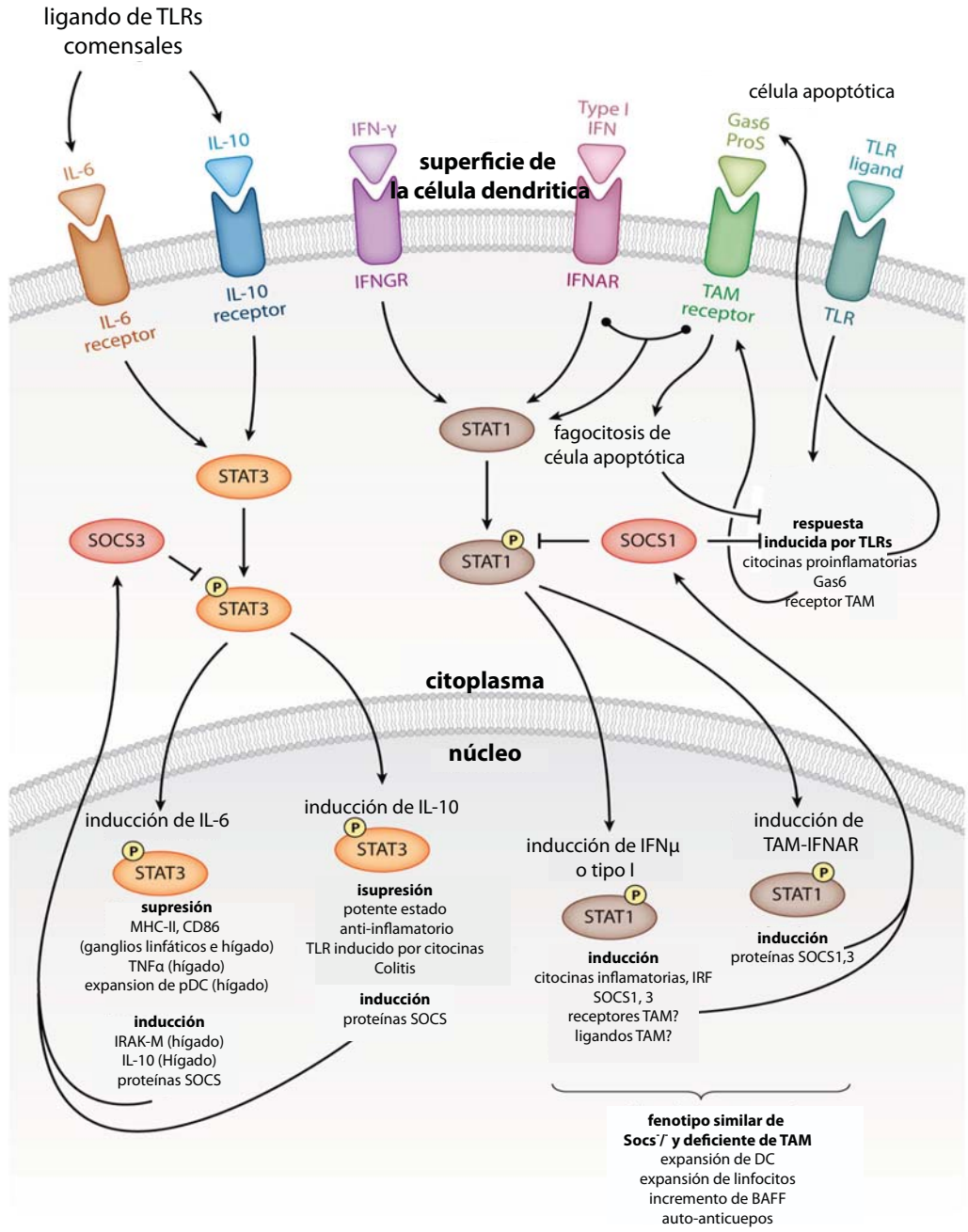


Figura 1.6.2.3-1. Efectos de las citocinas, ligandos del receptor TAM y TLRs; así como su cascada de señalización en la maduración de la célula dendrítica. (Modificado con permiso de Hammer GI, 2013 [125])

En infecciones tempranas las células dendríticas son importantes productores de citocinas, son un fuente rica de IL-12, la cual estimula a las células NK durante infecciones por listeria, induciendo la

producción de IFN μ , el cual es un fuerte activador a su vez de células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. La organización de la respuesta temprana por las células dendríticas asegura la activación funcional de las células del sistema inmune innato [122].

Su activación es inducida por medio de PRRS o citocinas, modulando de formas diferentes sus funciones, por ejemplo la IL-6 que se ha caracterizado como una citocina pro-inflamatoria, por medio de la activación de STAT3 suprime la expresión de marcadores de activación. Esta supresión también puede ser inducida por IL-10 por medio STAT3; e induce un estado anti-inflamatorio más potente, por medio de la represión de vías transcripciones propios de genes inflamatorios así como la activación de SOCS y parecen jugar un rol importante en la generación de tolerancia (Fig. 1.5.2.3-1) [125].

El IFN μ y los receptores TAM, inducen la activación y fosforilación de STAT 1, así como la expresión de SOCS. La activación de STAT1 mediada por el receptor TAM, depende de la formación del modulo IFNAR-STAT1, que induce un respuesta pro-inflamatoria en adición a SOCS1 y SOCS3, las cuales proveen una regulación negativa de IFNAR. Los receptores TAM, también pueden trasducir señales inhibitorias de reconocimiento de células apoptóticas, que pueden suprimir las señales producidas por los TLRs. A su vez los TLR inducen una respuesta que regula a los TAM y al ligando de TAM, Gas6 que provee un mecanismo intrínseco de regulación de los TLRs [125].

1.5.2.4 CÉLULAS CALICIFORMES

Las células caliciformes son glándulas unicelulares que sintetizan mucinogeno (nombre de la secreción dentro de la célula) o mucina (nombre fuera de la célula), y aparecen distribuidas de forma difusa entre las células absorbentes del epitelio intestinal. Desde su desarrollo, migran desde las criptas hasta las vellosidades, tienen una vida corta que va de 2 a 3 días, es por ello que son reemplazadas constantemente. Desde que son inmaduras y se encuentran en criptas, comienzan a sintetizar y secretar gránulos de mucina, en esta etapa tienen una forma larga y piramidal [109, 126]. En la boca de la cripta, las células obtiene la forma de copa, su porción apical se distiende debido al almacenaje de los gránulos en esta zona, mientras la porción basal de la célula parece una columna delgada. Esta región basal se observa basófila en los preparados histológicos ya que es ocupado por un núcleo heterocromático, un RER extenso y ribosomas libres. Las mitocondrias también están concentradas en el citoplasma basal. Se distribuyen a lo largo del tracto gastrointestinal, y generalmente su densidad se incrementa desde el intestino proximal a distal [102].

La forma característica de esta células, con su dilatación apical por la acumulación de gránulos y su región basal muy estrecha, es la causa de su nombre “caliciforme”, por su semejanza con un “cáliz”. En el estadio de eliminación del moco, la célula caliciforme se convierte en estrecha, su núcleo disminuye y el citoplasma se libera de los gránulos de mucinogeno [127].

El moco se libera en forma continua por exocitosis simple, es decir por la exocitosis de un gránulo en cada vez, aunque en la situación de secreción acelerada se puede producir la fusión de las membranas de los gránulos, formándose cadenas de gránulos comunicados que se abren en la superficie celular en un proceso denominado exocitosis compuesta. Su volumen se expande muchísimo por la captación de agua y forma una capa gelatinosa sobre el glicocalix de las microvellosidades. El material de secreción aparece en forma de grandes gránulos pálidos [127].

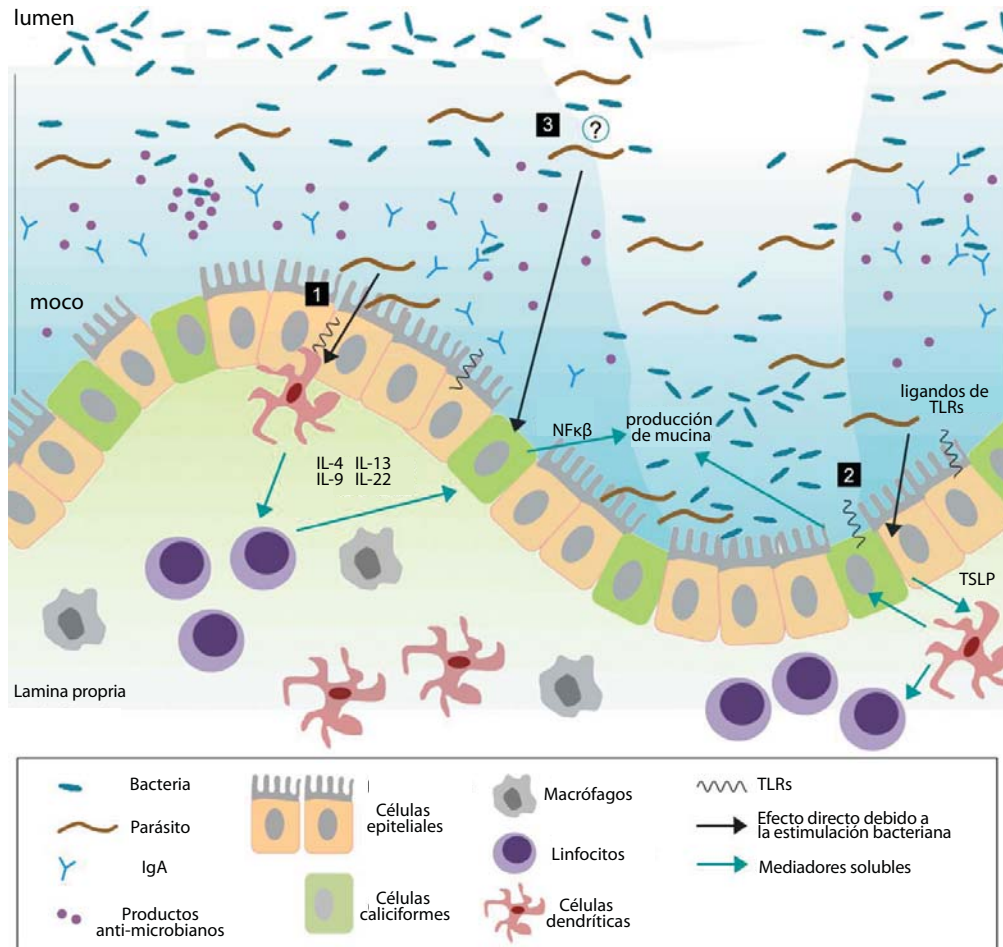


Figura 1.5.2.4-1. Interacción de las células caliciformes con los componentes de la mucosa intestinal. Las células caliciformes residen a lo largo del tracto gastrointestinal (GI) y son responsables de la producción y conservación de una capa protectora ya que lo sintetizan y lo secretan. Se muestran enumeradas (1,2,3) las diferentes interacciones, así como los efectos producidos por mediadores solubles y por estimulación de patógenos, (Modificado de Kim, 2013 [128]).

Bajo condiciones normales, las células caliciformes individuales secretan mucinas. El moco es un agregado altamente hidratado, que sirve como frontera entre el sistema inmune innato contra los irritantes exógenos, el establecimiento e invasión de microorganismos, pero también permite el transporte de nutrientes. Esta formado por macromoléculas de glucoproteínas, muestra un contenido

aproximado de 20% péptidos y 80% de carbohidratos. Estas glicoproteínas de alto peso molecular consisten en polipéptidos centrales con cadenas laterales de oligosacáridos unidas tanto con uniones N- como con O- [127].

Estos gránulos de moco son hidrófilos, por lo cual son buenos captadores agua. El mucinogeno es una glicoproteína, cuya forma hidratada es la mucina, principal del moco. Los péptidos son sintetizados por el RER y transportados hasta el complejo de Golgi, en donde se les añaden diferentes oligosacáridos. Estas mucinas son un componente fundamental del moco, son poliméricas, viscosas y elásticas, y son los protectores del moco. Además de las mucinas, el moco se compone por iones, moléculas del sistema inmune innato como IgA y péptidos antimicrobianos [128-130].

Las mucinas se dividen en 2 grupos. El primer grupo comprende las mucinas secretoras, que son las mucinas formadoras de gel que se encuentran en la superficie de la mucosa. El segundo grupo comprende las mucinas asociadas a la membrana, que se encuentran en las membranas apicales de las células epiteliales [131]. Hasta la fecha, se han identificado 12 genes que codifican las proteínas de mucina, de los cuales 2 (designado MUC2 y MUC3 en los seres humanos y Muc2 y Muc3 en ratones) se expresan en el intestino, de estos dos la mucina Muc2 es secretora, mientras que Muc3 está unida a la membrana. [132, 133].

El gel viscoso de moco limita la difusión de macromoléculas e impide la motilidad de los parásitos y patógenos bacterianos. A través de las cadenas laterales heterogéneas de oligosacáridos ligados por N- y O- en las mucinas, la capa mucosa también provee ligandos “señuelo” para las adhesinas tipo lectina expresadas por los patógenos y toxinas microbianos, inhibiendo competitivamente estos agentes del acceso a sus receptores en las superficies apicales de los enterocitos [133].

Esta secreción basal de mucinas es necesaria tanto para el mantenimiento como para la renovación de la capa mucosa, que es importante tanto en la función epitelial como en la defensa (la capa mucosa ayuda en la lubricación y protección de la mucosa intestinal al tiempo que sirve como un importante mecanismo de defensa contra patógenos y toxinas microbianos).

En situaciones donde el epitelio intestinal es expuesto a patógenos microbianos, toxinas y algunos otros irritantes intraluminales, las células caliciformes pueden liberar mucinas adicionales que están normalmente almacenadas en gránulos que residen en el ápice (apicales).

1.5.2.5 CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS

En el epitelio intestinal hay una gran cantidad de células endocrinas individuales, que se presentan en tipos diversos y sintetizan hormonas peptídicas diferentes, las cuales se secretan hacia el torrente sanguíneo y alcanzan sus dianas celulares.

Las células Enteroendocrinas difieren de otras células endocrinas no sólo en el funcionamiento, sino también por el hecho de que tienen una vida útil muy limitada, de pocos días a una semana, por lo que también se renuevan de forma continua a partir de células madre localizadas en las criptas de la mucosa [134].

Las células enteroendocrinas (EEC), tienen un RE rugoso (RER) bien desarrollado y un aparato de Golgi activo, del cual surgen los pequeños gránulos de secreción característicos limitados por membrana en todo el citoplasma. Además de la hormona los gránulos suelen contener proteínas transportadoras y ambas sustancias se expulsan de la células por medio de un proceso de exocitosis. Las células enteroendocrinas son numerosas en la porción basal de las glándulas intestinales, migran lentamente y pueden aparecer a cualquier altura en cada vellosidad [127].

Pueden ser basales y estar ubicadas entre las otras células del epitelio intestinal, sin alcanzar la superficie epitelial (de tipo cerrado), o ser células que alcanzan la superficie del epitelio con una región apical estrecha (de tipo abierto). Sin embargo algunas poseen una extensión citoplasmática delgada con microvellosidades que están expuestas en la luz de la glándula. Se cree que estas células examinan el contenido de la luz glandular y liberan hormonas según la información obtenida en ese proceso [127].

Su forma es muy variable, de manera que en las criptas tienden a ser ovoideas o piramidales, mientras que en las vellosidades suelen ser cilíndricas. En la bibliografía antigua la nomenclatura de las células enteroendocrinas hacía referencia a su capacidad de tinción con sales de plata o cromo (células enterocromafines, células argentafines y células argirofilas). En la actualidad estas células se identifican y caracterizan por métodos inmunohistoquímicos que detectan los más de 20 agentes reguladores peptídicos y polipeptídicos de tipo hormonal que secretan [127].

Estas células secretan péptidos especializados que regulan el apetito y respuestas digestivos. Además, los datos recientes muestran que sostienen interacciones clave con el sistema inmune de la mucosa. Las células que contienen: colecistoquinina (CCK), secretina, inhibidor gástrico polipéptidico y moltipina, se hallan en la porción proximal del ID mientras que las que contienen enteroglucagón, sustancia P y neurotensina se hayan con mucho más frecuencia en el íleon. Las células que contienen serotonina y somatostatina se encuentran a lo largo del intestino [127].

Pueden ser clasificadas según la naturaleza a de sus gránulos. Las células tipo I, liberan CCK en la parte proximal del duodeno en respuesta a la alimentación. La CCK retrasa el vaciado gástrico y estimula la liberación de la bilis y secreciones pancreáticas. A nivel del SNC, aumenta la saciedad a través de una vía vagal. Las células L del intestino grueso y delgado secretan GLP-1, GLP-2 (glucagon-like peptide-1 or 2) y PYY (peptide YY). Después de una comida, el GLP-1 aumenta la saciedad y la liberación de insulina, al mismo tiempo que retrasa el vaciamiento gástrico. GLP-2 promueve la reparación de la mucosa y la homeostasis mediante el aumento de la proliferación celular y la reducción de la apoptosis. PYY inhibe el vaciado gástrico y la liberación de ácido gástrico, reduce la motilidad intestinal y la función exocrina pancreática e inhibe la secreción de agua y mientras que aumenta la absorción de iones. Además, suprime el apetito y estimula la proliferación enterocito [135].

Se ha observado que juegan un papel fundamental entre la conexión del Sistema inmune y El sistema nervioso entérico durante procesos infecciosos. Ratones infectados con *Trichinella spiralis* muestran un aumento en los niveles de CCK en plasma, así como un aumento en la expresión en tejido. Durante la infección por este parásito se desarrollan una respuesta inflamatoria transitoria en el intestino delgado asociado con hiperplasia de células tipo I, promovida por los linfocitos T cooperadores (CD4⁺) a través de una respuesta dependiente de IL-4/IL-13, se observa también una pronunciada atrofia de las vellosidades. Durante la infección el consumo de alimentos y el peso presentan una disminución, a la par de un aumento de la CCK, estos efectos se revirtieron cuando se les administró un antagonista de la CCK [136].

Estudios recientes demuestran que la respuesta adaptativa de las CEE es potencialmente beneficiosa. La pérdida de peso como consecuencia de la hiperplasia de las células I y reducción de la ingesta de alimentos conduce a una caída de la leptina en suero, y a un estado pro-inflamatorio en los adipocitos. Como resultado, aumenta la inmunidad protectora que facilita la resolución de la infección. Por lo tanto, la respuesta de las CEE es un componente mecánico de la inmunidad adaptativa [136, 137].

1.5.2.6 CÉLULAS DE PANETH

Son un tipo de célula secretora del epitelio intestinal, de vida larga y normalmente están confinadas al intestino delgado, donde se localizan en la parte inferior de las criptas de Lieberkühn. Poseen un citoplasma basal basófilo, un aparato de Golgi supranuclear y grandes gránulos de secreción apicales [99, 106].

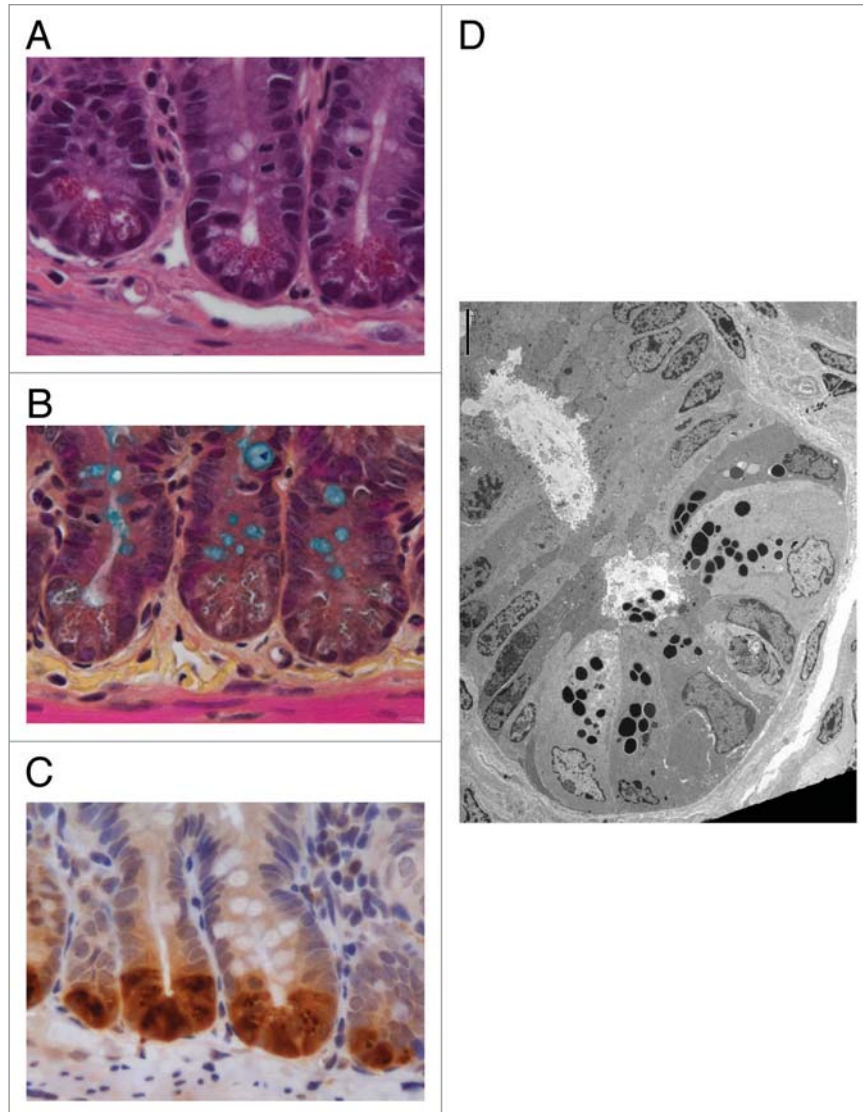


Figura 1.5.2.6-1 Células de Paneth. Evaluación microscópica de las células de Paneth en ratón. (A) La tinción con Hematoxilina-Eosina (640 ×) de tejido del intestino delgado revela los gránulos secretores de las células de Paneth por su coloración eosinofílica. (B) Por otra parte, estas estructuras subcelulares se pueden evidenciar con la tinción de floxina-tartrazina (640 ×). En esta imagen, las células caliciformes son co-localizadas usando azul Alciano. (C) Reconocimiento inmunohistoquímico de la expresión de los productos de las células de Paneth, como la lisozima (640 ×). (D) Micrografía la transmisión de la estructura de una célula de Paneth. La barra de escala es de 5 micras. Imágenes en paneles (B-C) (Tomado de Shanahan M, 2014)

Este tipo celular es fácilmente identificado por sus prominentes gránulos eosinófilos, que contienen un repertorio diverso de secreciones que incluyen péptidos antimicrobianos (AMP), mediadores pro-inflamatorios y proteínas de transducción de señales. Los AMP en particular son altamente abundantes dentro de sus gránulos de secreción e incluyen: α -defensinas (cryptdins), péptidos relacionados a la secuencia de criptdinas (CRS), lisozima-P (Lyz), fosfolipasa A2, lectinas de tipo C (Reg3 α , Reg3 γ), e islotes de proteínas 3- α regeneradoras derivadas de lectina tipo C (también conocida como HIP/PAP,

proteína hepato-pancreática), y angiogenina 4. Esta notable diversidad AMP ofrece un componente importante de la defensa innata contra bacterias, hongos, virus y organismos protozoarios [138].

Las células de Paneth no sólo participan en la inmunidad contra organismos patógenos, sino que, también modulan la carga bacteriana endógenas. Esto sugiere que la importancia fisiológica de estas células se extiende más allá del control de patógenos, e incluye la regulación de las interacciones huésped-comensal en la superficie intestinal [138].

La capacidad de las células de Paneth para controlar a los microbios del intestino depende de su correcto desarrollo y maduración. Por ejemplo, los ratones con una disminución en el número de células de Paneth muestran un aumento de la translocación bacteriana intestinal. Específicamente, la función de las células Paneth está regulada a múltiples niveles que incluyen: (1) el control de desarrollo de las células y su maduración; (2) la regulación transcripcional de la expresión AMP; (3) la activación posterior a la traducción de las moléculas de AMP; y (4) la modulación de la secreción de células Paneth. En este aspecto la expresión de las AMP ha sido difícil de estudiar ya que representan una clase extremadamente diversa de moléculas, en el que varios subconjuntos de péptidos son sujetos a mecanismos de regulación distintos [138].

En cuanto a la regulación de la secreción, numerosos estímulos, incluyendo bacterias, productos bacterianos, y agonistas colinérgicos, son capaces de inducir su exocitosis. Este proceso se ha asociado con un aumento bifásico de Ca^{2+} citosólico, el cual está regulado por un canal de potasio activado por Ca^{2+} conocido como Kcnn4. Estos mecanismos se han dilucidado mediante la estimulación de pequeñas criptas intestinales aisladas con diversos agentes microbianos o farmacológicos. Después de la secreción, el medio ambiente en la lamina intestinal del huésped puede modular la actividad microbicida de las AMP. Generalmente los AMP secretados se concentran dentro de la capa de moco ubicada en la superficie del intestino delgado, centrándose la actividad antimicrobiana a este compartimento. Los factores lumbales tales como el microambiente iónico, estado redox, e incluso el tránsito intestinal pueden modular la actividad microbicida de los AMP [138].

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que existen diversos trabajos de investigación que sugieren la existencia de la comunicación bidireccional entre el sueño como un proceso orquestado por el SNC y la Respuesta Inmune, es aún poco lo que se sabe de los mecanismos que pueden intervenir como moduladores en esta interacción. El abordaje del efecto que tiene la privación de sueño sobre la respuesta inmune temprana durante una infección parasitaria, como lo es la producida por *Trichinella spiralis* nos dará pauta para conocer los mecanismos que intervienen en esta dirección de la comunicación a dos niveles diferentes de organización: la local y la sistémica. Al mismo tiempo que el estudio de la forma en como se modifica el patrón de sueño a causa de la respuesta inmune frente a este mismo parásito nos evidenciara los mecanismo que pueden estar participando en el sentido inverso de la comunicación. El conocimiento de los mecanismos que regulan ambos sentidos de esta interacción nos aportará evidencia para entender como la alteración del sueño o un respuesta inmune pueden modificar el equilibrio en esta comunicación y nos dará evidencias para conocer cuál es la función del sueño durante la respuesta inmune.

3. HIPÓTESIS

Dado que la interacción entre los procesos de sueño y respuesta inmune son recíprocos y bidireccionales, la privación de del sueño alterará el reclutamiento celular durante la repuesta inmune temprana, en tanto que la respuesta inmune producirá modificaciones en el patrón de sueño, ambas situaciones durante la infección de tipo parasitario producida por *Trichinella spiralis* en ratas macho wistar.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer evidencias de la modulación en la relación bidireccional entre el sueño y la respuesta inmune durante la infección producida por *Trichinella spiralis* en ratas Wistar macho.

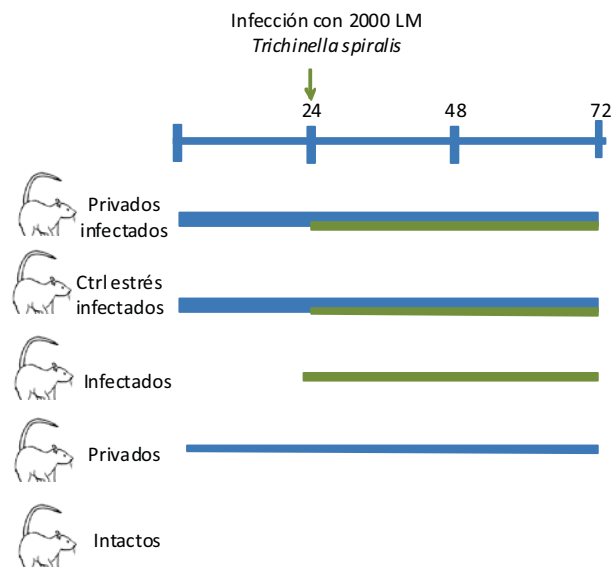
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la privación de sueño sobre el reclutamiento de linfocitos T, linfocitos B y células NK a nivel sistémico estudiando las proporciones celulares en bazo durante la infección aguda por *Trichinella spiralis* en ratas macho Wistar.
2. Evaluar el efecto de la privación de sueño sobre el reclutamiento de linfocitos T, linfocitos B y células NK nivel local estudiando las proporciones celulares en ganglios linfáticos mesentéricos durante la infección aguda por *Trichinella spiralis* en ratas macho Wistar.
3. Evaluar el efecto diferencial de las alteraciones producidas por la privación de sueño y el estrés sobre el reclutamiento de las poblaciones celulares a nivel sistémico y local (en ganglios mesentéricos y bazo) durante la infección por *Trichinella spiralis* en ratas macho wistar.
4. Determinar si la privación de sueño causa alteraciones en la mucosa intestinal en los animales infectados por *Trichinella spiralis*.
5. Evaluar si la privación de sueño causa diferencias en la cantidad de eosinófilos, células caliciformes, células enteroendocrinas y células cebadas reclutadas en la mucosa intestinal durante la infección causada por *Trichinella spiralis* en ratas macho wistar.
6. Evaluar el efecto diferencial de las alteraciones producidas por la privación de sueño y el estrés sobre el reclutamiento de las poblaciones celulares en la mucosa intestinal durante la infección por *Trichinella spiralis* en ratas macho wistar
7. Evaluar si la infección con *Trichinella spiralis* genera alteraciones en el patrón de sueño de ratas macho wistar a diferentes tiempo de infección.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para los objetivos 1 al 5, en donde se estudió el efecto de la privación de sueño MOR sobre la respuesta inmune sistémica y local, la cual se presenta en los primeros 5 días de infección y a que se ha reportado que la privación crónica de sueño MOR resulta en la desregulación metabólica y en bacteremia, la privación se realizó por un período corto de 72 hrs, infectando a las 24hrs a partir del inicio de la privación y sacrificando a las ratas al cumplir 72 hrs de privación y 48 hrs de infección, de acuerdo al siguiente esquema:



El protocolo experimental para los grupos infectados incluyó un período inicial de 24 horas de privación del sueño o de estrés, después de lo cual los grupos se infectaron con 1,500 ML de *Trichinella spiralis*. El procedimiento de estrés o privación continuó durante otras 48 horas.

Posterior al periodo de experimentación las ratas se sacrificaron por decapitación para obtener diversos órganos y suero. El suero obtenido se congeló y posteriormente se realizó la determinación de corticosterona por medio de EIA. Se extrajo el intestino delgado para realizar el conteo de parásitos.

Para cumplir con el objetivo 1, el cual evaluó el efecto de la privación de sueño sobre el reclutamiento celular a nivel sistémico se disecó el bazo de cada uno de los individuos, para posteriormente analizar las subpoblaciones de linfocitos T totales ($CD3^+$), los cooperadores ($CD3^+CD4^+$) y los citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), linfocitos B ($CD45^+$), y células NK ($NK1.1^+$) por medio de citometría de flujo.

Para el objetivo 2 el cual consistió en evaluar el efecto de la privación de sueño sobre el reclutamiento celular se disecaron ganglios linfáticos mesentéricos, a partir de los cuales se realizó la determinación de las subpoblaciones de linfocitos T totales (CD3⁺), los cooperadores (CD3⁺CD4⁺) y los citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), linfocitos B (CD45⁺), y células NK (NK1.1⁺) por medio de citometría de flujo.

Para el objetivo 3, se realizó el mismo procedimiento para ambos tejidos (bazo y GLM) en los grupos privados de sueño comparándolos con un grupo sometido a estrés, el cual se detalla posteriormente.

Para los objetivos 4 y 5, en donde determinamos si la privación de sueño causa alteraciones en la mucosa intestinal en los animales no-infectados e infectados se obtuvo la primera porción de 1 cm del duodeno de cada uno de los individuos para realizar técnicas histológicas y tinciones especiales con el fin de analizar la cantidad de eosinófilos, células calciformes, células enteroendocrinas y células cebadas reclutadas en la mucosa intestinal.

Para el objetivo 6, se realizó el mismo procedimiento para los grupos privados de sueño y estrés, para posteriormente realizar la comparación de ambas condiciones en los grupos no-infectados e infectados.

Para estudiar el objetivo 7, se realizó una estrategia experimental diferente a los objetivos anteriores, la cual consistió en realizar un registro poligráfico a 5 ratas para posteriormente infectarlas con el parásito *Trichinella spiralis* y realizar registros posteriores a los 5, 10 y 15 días post-infección.

5.2 ENSAYOS DE PRIVACIÓN DE SUEÑO

5.2.1 ANIMALES Y LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas Wistar machos (200 g de peso). Se mantuvieron bajo temperatura controlada (22-24° C) y condiciones de luz-oscuridad 12:12 (encendido de luces a las 0700 hrs). La dieta consistió en comida para ratas Harlan y agua esterilizada *ad libitum*.

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos de 7 animales cada uno:

- 1) no privados de sueño (sueño-suficiente, SS) no infectadas
- 2) control de estrés, no infectada (estrés)
- 3) privadas-sueño (PS), no infectada
- 4) sueño suficiente, infectado
- 5) control de estrés, infectado
- 6) PS, infectado.

5.2.2 PRIVACIÓN DE SUEÑO

La privación de sueño se indujo mediante la técnica de isla. Este modelo fue diseñado inicialmente por Jouvet y colaboradores en 1964 para privar de sueño MOR a gatos; posteriormente fue adaptado

para ratas por Cohen y Dement en 1965. El método consiste en mantener al animal en una plataforma con un diámetro (4,5 cm de diámetro y 5 cm de alto) suficiente para que se pueda sostenerse, se encuentra rodeada de agua a un nivel de 2,0 a 2,5 cm de profundidad. Cuando el animal concilia sueño MOR, caracterizado por atonía muscular, entonces cae al agua; este mecanismo provoca que despierte el animal, [139, 140]. El grupo control consiste en mantener a los animales en las mismas condiciones ambientales, pero con plataformas lo suficientemente grandes para poder conciliar el sueño MOR, usualmente de alrededor de 16 cm de diámetro, como se describe en Velazquez-Moctezuma, 2004 [141]. El cambio de agua del tanque se realiza cada 12 horas y manteniendo agua y comida *ad libitum*.

5.3 ENSAYOS DE REGISTRO DE SUEÑO

5.3.1 ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron 5 ratas wistar macho de 200-300 gramos a las cuales se le implanto un electrodo de registro por medio de cirugía esterotáxica.

Los animales se recuperaron por 3 semanas y posteriormente se les realizó el registro basal de sueño con un duración de 12 horas. Al día siguiente las ratas fueron infectadas y se les realizó un registro de sueño a los 5, 10 y 15 días post-infección. Cada periodo de registro fue acompañado por 12 horas de habituación en jaulas adaptadas para el registro.

5.3.2 IMPLANTACIÓN DE ELECTRODOS PARA REGISTRO DE SUEÑO

Para realizar la implantación de los electrodos, las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal con 0.8-1.0 ml de una mezcla que contiene, 2.5ml de Ketamina (Anesket), 0.5 ml de Xilacina (Rompun), 1 ml de Acepromazina (Calmivet) y 6 ml de Solución Salina. Se desinfectó la cabeza con benzaldehído y se afeitó para limpiar la zona de la cirugía estereotáxica

Una vez anestesiada y afeitada, la rata fue montada en el estereotáxico y se fijó de los canales auditivos con lápices de acero inoxidable y de los incisivos superiores. Se realizó un corte longitudinal del cráneo de aproximadamente 3 cm, y se sujetó el periostio hacia los extremos para exponer la zona del cráneo. Se retiró el periostio con una legra, limpiando el exceso de sangre y tejido desprendido con la ayuda de un hisopo y solución salina fría. Una vez que el cráneo está completamente limpio, se visualizaron la línea media y lambda, a partir de la línea media se midieron 2 mm de manera longitudinal y a partir de la línea lambda 2mm de manera transversal, localizando la zona del hipocampo en donde se colocaron los electrodos de registro, uno para cada lado. Adicionalmente se colocaron 2 electrodos transversales de soporte para cada uno de los electrodos de registro y dos más en la parte frontal, tal como se muestran en la figura 5.2.2-1.



Figura 5.2.2-1. Cirugía estereotáxica que muestra; a) Montaje en el estereotáxico, b) Exposición del cráneo y eliminación del periostio, c) Trepanación, d) Introducción de tornillos de tierra, hipocampo y soporte, e y f) Unión a los alambres del electrodo, g) Sellado de los cables con acrílico, h) Inserción de los alambres enroscados en el musculo del cuello para obtener el EMG, i) Recubrimiento con acrílico. Posteriormente se realizan los orificios para insertar los tornillos que servirán de electrodos de registro como muestra la figura 1c. Se colocan dos electrodos en Hipocampo, dos de tierra (orificios delanteros), cuatro de soporte, (orificios centrales y traseros).

Posteriormente los electrodos de registro fueron conectados a un soporte, el cual se fijo con acrílico dental (mezcla de polímero-monómero) para sellarlos a la superficie del cráneo, siendo indispensable que toda la superficie del cráneo estuviera completamente seco. Una vez seco el acrílico se colocaron los electrodos musculares, lo cuales fueron conectados al mismo soporte y recubiertos con el acrílico. Por ultimo se sutura si es necesario, dejando expuesto únicamente el implante.

5.3.3 REGISTRO POLISOMNOGRÁFICO

Se realizó una habituación de 24 horas en un ciclo de luz-obscuridad para posteriormente obtener el registro de 12 horas de actividad eléctrica del cerebro, obteniendo el Electroencefalograma y Electromiograma de manera digital con el programa de recopilación de datos ICELUS 071503 .

Los registros obtenidos se analizaron en el programa ICELUS Analysis 071503 basándose en el EEG y EMG para diferenciar las etapas de Vigilia, SOL y SMOR.

5.4 INFECCIÓN

5.4.1 OBTENCIÓN DEL PARÁSITO

El nematodo *Trichinella spiralis* (ISS 406) se ha mantenido en nuestro laboratorio por medio del pase de la infección en ratones Balb/c o ratas Wistar. Las larvas musculares (ML), las cuales constituyen la etapa infectiva se recuperan de ratas infectadas experimentalmente después de 30 días de infección. La obtención se realizó a partir del tejido muscular extraído de una rata infectada, a la cual se le retira la piel, se desvisera, y se le abre el esternón a fin de verificar la presencia de infección en el diafragma, el musculo obtenido se coloca en una multiprocesadora para triturarse. Por cada 10 gramos de musculo triturado se preparan 100 ml de solución de digestión, la cual consta de HCl-Pepsina al 1% en PBS 1X. Los tejidos en solución fueron incubados en agitación a 37°C/3hrs/190 rpm. Posteriormente el digerido fue filtrado con 3 hojas de gasa dejando reposar 10 minutos, se lavó 3 veces con PBS 1X dejando sedimentar las larvas en cada ocasión y posteriormente se procedió a realizar la cuantificación, haciendo conteos repetidos (20 veces) del contenido en 200µl de solución sobre un portaobjetos y bajo un microscopio estereoscópico.

5.4.2 INFECCIÓN

Ensayos de privación de sueño: veinticuatro horas después de iniciada la privación de sueño, los animales en los grupos infectados se inocularon con el parásito insertado un catéter gástrico. Se inocularon 1500 larvas musculares (ML) suspendidas en 500 µl de solución de PBS1X directamente en la parte superior del estómago. Cuarenta y ocho horas después de la infección las ratas se sacrificaron por decapitación.

Ensayos de registro de sueño: después del registro basal las ratas fueron infectadas utilizando el mismo procedimiento con 1500 larvas musculares (ML) suspendidas en 500 µl. La infección tuvo una duración de 20 días.

5.4.3 DETERMINACIÓN DE CARGA PARÁSITARIA

Al termino del periodo de infección de los ensayos de privación de sueño, los parásitos adultos se recuperaron en el intestino delgado. El intestino delgado se disecó, y fue cortado longitudinalmente, se lavó dos veces en PBS1X. A continuación, el intestino se cortó en trozos pequeños y se incubaron en 1X PBS estéril por 3 hrs a 37 ° C. Después de la incubación, se colecto el sedimento, el cual se lavo tres

veces con PBS1X y se contaron los parásitos repetidas veces en un volumen de 200 μ l bajo un microscopio estereoscópico.

5.5 DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA

La sangre se obtuvo del tronco por decapitación y se colectó en tubos estériles. Dos horas después, las muestras fueron centrifugadas a 2300 rpm a 4°C durante 20 minutos. Al terminar se separó el suero se congeló a -80°C para su posterior análisis. La concentración de corticosterona se determinó utilizando un kit de radioinmunoensayo (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA) con el método Coat-A-Count de determinación de corticosterona en rata, el cual consta de una fase sólida radioinmunoensayo -125I. El límite de detección de los cuales es 5,7 ng/mL. Las muestras (50 μ l) se analizaron por duplicado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células de los ganglios linfáticos y de bazo fueron disgregadas para obtener una suspensión celular libre de tejido. Posteriormente se purificaron (lisis de eritrocitos) y se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-rata-CD3-Alexa 647, anti-rata CD4-PE-Cy5, anti-CD8 de rata-PE, anti-rata CD45RA-PE y anti-rata NK1.1-APC (Biolegend). Las células se fijaron con 500 μ l de buffer de fijación (4% de paraformaldehído, 1X PBS, pH 7,4). Las muestras se analizaron por citometría de flujo utilizando un FACSCalibur (BD Biosciences), y los datos se analizaron con el software FlowJo®.

5.7 HISTOLOGÍA E HISTOQUÍMICA

Las muestras de tejido fueron procesadas para su deshidratación en un tren automático, pasando en cada solución en el siguiente orden: Alcohol 50 %, alcohol 70%, alcohol al 80%, alcohol al 90%, alcohol al 96%, alcohol absoluto, xilol, dos baños por cada uno, durante 1:30 horas.

Posteriormente se incluyeron de forma longitudinal en parafina y se realizaron los cortes discontinuos (en el cual se recogía un corte por cada 5) con un grosor de 4 μ m en el micrótopo. Los cortes se montaron en laminillas previamente tratadas poli-L-lisina. Las laminas se desparafinaron en la estufa a 60° C y se procesaron en un tren de hidratación para cada una de las tinciones: Hematoxilina-Eosina, de Fontana Masson, Ácido Peryódico de Schiff (PAS), y tinción de Giemsa.

La cuantificación de cada tipo celular: células caliciformes, enteroendocrinas, cebadas y eosinófilos en el tejido intestinal, se realizó por separado en la zona glandular y en la zona de vellosidades, ya que como se describió anteriormente, estas dos estructuras realizan funciones diferentes.

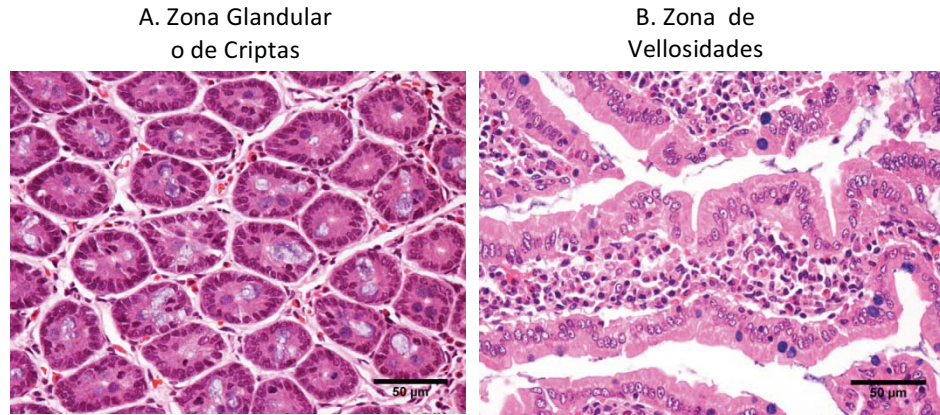


Figura 5.6-1. Fotografías de epitelio duodenal. **A** Glándulas intestinales, se observa que el área total del campo es tejido glandular. **B** Vellosidades intestinales, el área de campo en esta zona, no está ocupada totalmente por tejido, se observan espacios vacíos. HE 40x.

Las preparaciones histológicas de cada una de las tinciones se observaron en un microscopio óptico Nikon (mod), y se obtuvieron las imágenes digitales para cada uno de los campos a analizar (almacenadas como archivos TIFF de alta resolución). De cada corte histológico se capturaron imágenes con una magnificación de 40x, en zona glandular y en zona de vellosidad intestinal. De cada zona se analizaron de 8 a 9 campos con la finalidad de contar en 1mm^2 de área de tejido para cada zona.

Con el fin de discriminar los espacios vacíos de tejido en la zona de las vellosidades, la cuantificación se ajusto o normalizo utilizando el software *ImageJ Pro Plus* (programa de procesamiento y tratamiento de imágenes), en cada imagen se calculo el área de tejido a partir de el área total (AT) del campo en μm^2 , convirtiendo la imagen en escala de blanco y negro.

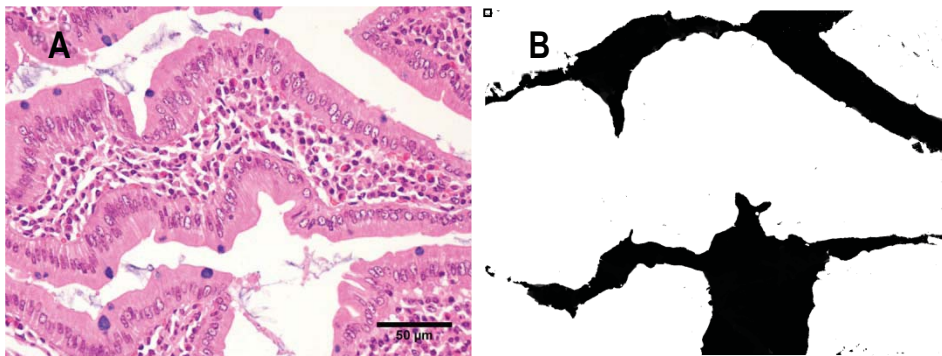


Figura 5.6-2. Cuantificación celular en vellosidad intestinal. (A) Imagen de vellosidad intestinal, HE x40. (B) La imagen (A) es procesada en el programa *ImageJ Pro Plus*, el área seleccionada con el color blanco pertenece al área con tejido ACT y el color negro al área sin tejido AST, del área total AT del campo.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROCESAMIENTO DE DATOS

5.8.1 ENSAYOS DE PRIVACIÓN DE SUEÑO

Los resultados se determinaron en 2 experimentos independientes. Las variables dependientes incluyen el número de parásitos, los niveles de corticosterona en suero, el porcentaje de linfocitos totales, linfocitos cooperadores, linfocitos citotóxicos, linfocitos B, y células NK en los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo, así como el número de eosinófilos, caliciformes, enteroendocrinas y cebadas por mm^2 de la mucosa intestinal (duodeno) en vellosidades y en la zona glandular. Las variables independiente fueron la privación de sueño (PS), el estrés y sueño-suficiente (SS). Los datos se obtuvieron de 2 repeticiones ($n = 5$ ó 4) de cada grupo experimental y se expresaron como media \pm error estándar. Se analizaron por medio de un ANOVA de dos vías con Bonferroni como una prueba post hoc y una "n" total de 7 individuos por grupo. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad PRISM.

Se aplicó un análisis de correspondencias múltiples (ACM) para determinar el patrón de asociación entre el efecto diferencial de la privación del sueño o la inducción de estrés, sobre el porcentaje de cambio (aumento, disminución o ningún cambio) de las poblaciones de células inmunes en el bazo o los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de ratas infectadas o ratas infectadas con *Trichinella spiralis*.

El MCA es una técnica de análisis de datos multivariantes que proporciona un análisis simple y exhaustiva que permite una descripción detallada de los datos. Este análisis incorpora una salida gráfica bidimensional que muestra nubes de puntos que representan las variables categorizadas [142]. El patrón de correspondencia (fuerza de asociación) entre las variables se interpreta en términos de la posición relativa (distancia) de sus puntos a lo largo de las dos dimensiones (factores de varianza) definido por el análisis; por lo tanto, cuanto más cerca de los puntos de las variables, mayor será su asociación con determinada condición

El análisis se realizó utilizando el software estadístico Análisis (SAS 9.0, SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.), y los gráficos se construyeron con Prisma 6.0 (GraphPad, Inc.).

5.8.2 REGISTROS DE SUEÑO

Una vez analizado y estadificado cada uno de los registros se obtuvo el porcentaje de para cada estado: vigilia, sueño de ondas lentas y sueño MOR. Los datos se analizaron utilizando el programa Prisma 6.0 (GraphPad, Inc.) con una n total de 6 individuos. Se aplicó un análisis de ANOVA de una vía con Bonferroni como una prueba post hoc, las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

5.9 DECLARACIÓN DE ÉTICA

Las prácticas de cuidado de los animales y la experimentación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) son constantemente evaluados por sus respectivos Comité de Ética y uso de Animales y con apego a las normas oficiales mexicanas (NOM-062-ZOO-1999). Las regulaciones mexicanas están en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH) de EE.UU. para asegurar el cumplimiento de las normativas y directrices internacionales establecidas. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la UAM-Iztapalapa. Se hicieron los mayores esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales utilizados.

6. RESULTADOS

6.1 ENSAYOS DE PRIVACIÓN DE SUEÑO

6.1.1 CARGA PARASITARIA

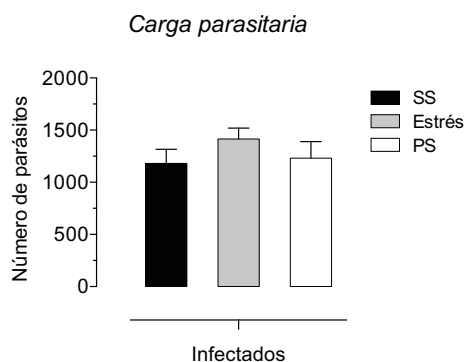


Figura 6.1.1 Carga parasitaria. Se muestra el número de parásitos recuperados para cada condición, Sueño Suficiente (SS)(barras sólidas), Estrés (barras sombreadas) y privación de sueño (PS) (barras transparentes).

No se encontraron diferencias significativas en el número de parásitos adultos recuperados del el intestino delgado de los grupos infectados para cada condición. El grupo de sueño suficiente (SS) infectado mostró un promedio de $1,180 \pm 137,12$ parásitos adultos, la media para el grupo estresado infectado fue de $1,301 \pm 145,89$ parásitos adultas y para el grupo privado de sueño (PS) infectado fue de $1,175 \pm 148,13$ parásitos adultos. Cuando analizamos el intestino de los grupos no infectados, no se encontraron parásitos.

6.1.2 DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA.

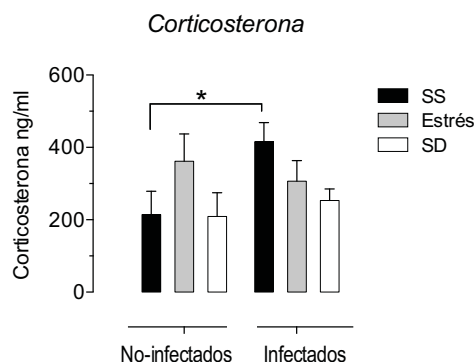


Figura 6.1.2 Determinación de Corticosterona. Se muestra la concentración de corticosterona sérica para los grupos no-infectados y los grupos infectados en la condición de Sueño Suficiente (SS)(barras sólidas), Estrés (barras sombreadas) y privación del sueño (PS) (barras transparentes). N=7, t Student multiple. Diferencias significativas con * $p < 0,05$

De acuerdo con la figura 6.1.2, en los grupos no-infectados, la condición de estrés y PS no mostraron diferencias significativas, en los grupos infectados se encontró un comportamiento similar. Sin embargo, encontramos un aumento significativo en el grupo infectado, que no fue sometido a estrés o privación de sueño, el cual desaparece en los animales infectados que además fueron sometidos a privación de sueño o estrés.

6.1.3 PORCENTAJES CELULARES EN BAZO Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS.

Linfocitos T (CD3⁺)

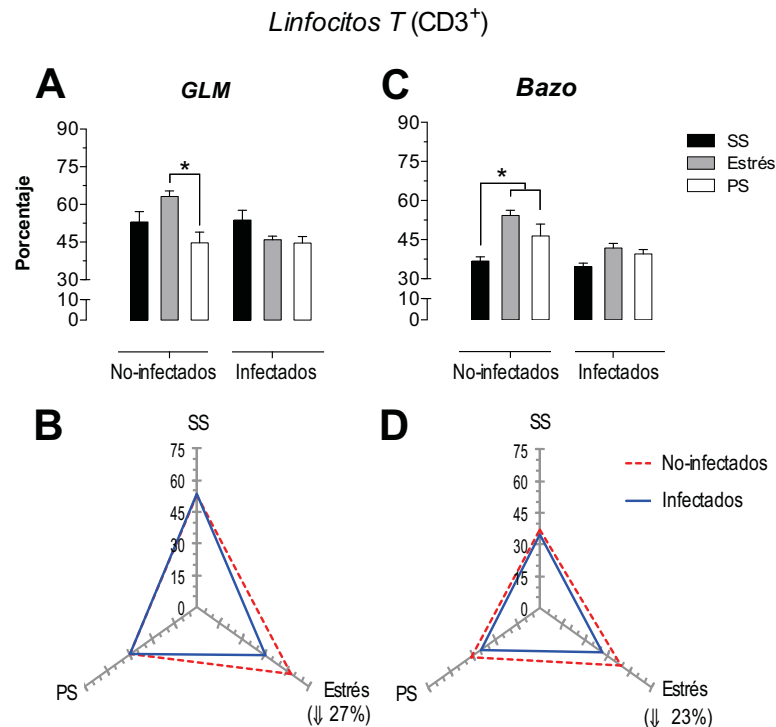


Figura 6.1.3-1 Porcentaje de Linfocitos T (CD3⁺). Se muestra la condición de Sueño Suficiente (SS)(barras sólidas), Estrés (barras sombreadas) y la privación del sueño (PS) (barras transparentes) en Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM) (A) y en bazo (C); para los grupos no-infectados (a la izquierda) y los grupos infectados (derecha). Los paneles B y D muestran el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, estrés y PS en GLM (B) y en bazo (D). La línea discontinua roja representa el porcentaje en los grupos no infectados; la línea continua azul representa el porcentaje de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y Bonferroni como post-test. Diferencias significativas con *p<0.05. En las figuras B y D las diferencias significativas (*p<0.05) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

Nuestros resultados muestran que para los grupos no-infectados la privación del sueño causó una disminución en el porcentaje de linfocitos T (CD3⁺) en comparación con el grupo de estrés (p<0,05) en ganglios linfáticos mesentéricos, mientras que en el bazo, las condiciones de estrés y la privación causaron un aumento significativo. (p <0.05) (Fig. 6.1.3-1A y C).

No se observaron diferencias entre las condiciones de SS, estrés y PS para los grupos infectados, tanto de GLM como de bazo. Sin embargo, al comparar el grupo infectado *versus* el no-infectado para cada

condición encontramos una disminución significativa ($p < 0,05$) en los grupos infectados para la condición de estrés del 27% en ganglios y de 23% en bazo (Fig. 6.1.3.1B y 2D). Así mismo, para el bazo se observó una disminución de los grupos infectados para la condición de PS y SS, del 15% y 6% respectivamente, aunque estos valores no fueron estadísticamente significativos (Fig. 6.1.3.1B y 2D).

Los porcentajes de las subpoblaciones de células T fueron analizados a partir de la población total de células T ($CD3^+$). Las proporciones de linfocitos T cooperadores ($CD3^+, CD4^+$) y de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$) se muestran en los siguientes paneles.

Linfocitos T cooperadores ($CD3^+ CD4^+$):

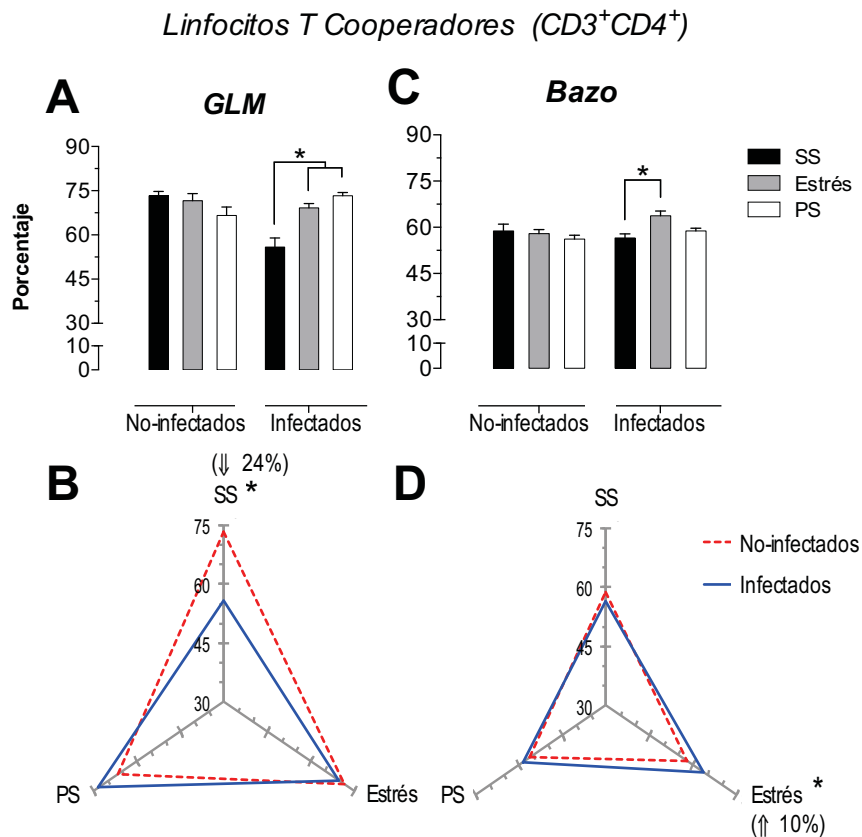


Figura 6.1.3-2 Porcentaje de Linfocitos T cooperadores ($CD3^+ CD4^+$). Se muestra la condición de Sueño Suficiente (SS)(barras sólidas), Estrés (barras sombreadas) y la privación del sueño (PS) (barras transparentes) en Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM) (A) y en bazo (C); para los grupos no-infectados (a la izquierda) y los grupos infectados (derecha). Los paneles B y D muestran el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, estrés y PS en GLM (B) y en bazo (D). La línea discontinua roja representa el porcentaje en los grupos no infectados; la línea continua azul representa el porcentaje de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y Bonferroni como post-test. Diferencias significativas con * $p < 0.05$. En las figuras B y D las diferencias significativas (* $p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

Para esta población, se observó que en los grupos infectados, las condiciones de estrés y PS causaron un aumento significativo ($p < 0,05$) en GLM, mientras que en el bazo el aumento se observó solo(p

<0,05) para la condición de estrés, comparados con el grupo que únicamente fue infectado en ambos tejidos (Fig. 6.1.3-2 A y B).

En GLM, el grupo infectado para la condición de SS mostró una disminución significativa del 24% ($p < 0,05$) en comparación con el grupo no infectados de la misma condición (Fig. 6.1.3-2B). En bazo, los animales sometidos a la PS que fueron infectados posteriormente presentaron un aumento del 10% (Fig. 6.1.3-2D).

Linfocitos T Citotóxicos ($CD3^+CD8^+$):

Linfocitos T Citotóxicos ($CD3^+CD8^+$)

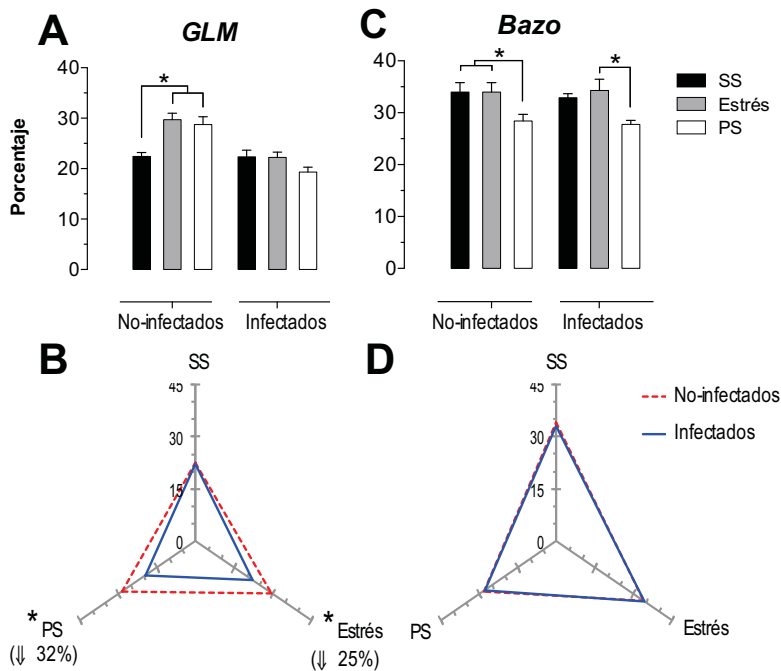


Figura 6.1.3-3 Porcentaje de Linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$). Se muestra la condición de Sueño Suficiente (SS)(barras sólidas), Estrés (barras sombreadas) y la privación del sueño (PS) (barras transparentes) en Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM) (A) y en bazo (C); para los grupos no-infectados (a la izquierda) y los grupos infectados (derecha). Los paneles B y D muestran el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, estrés y PS en GLM (B) y en bazo (D). La línea discontinua roja representa el porcentaje en los grupos no infectados; la línea continua azul representa el porcentaje de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y Bonferroni como post-test. Diferencias significativas con $*p < 0.05$. En las figuras B y D las diferencias significativas ($*p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

En la subpoblación de linfocitos T citotóxicos de los grupos no-infectados, el estrés y la PS causaron un efecto similar, produciendo un aumento significativo ($p < 0,05$) en GLM (Fig. 6.1.3-3A); mientras que en el bazo se observó una disminución significativa en la condición de PS en el bazo ($p < 0,05$) (Fig. 6.1.3-C). Cuando comparamos a los grupos infectados con los no-infectados en la misma condición, solo las

poblaciones de GLM mostraron diferencias, en las condiciones de PS y estrés, los grupos infectados mostraron una disminución significativa del 32% y 25% respectivamente (Fig. 6.1.3-C 4B).

Linfocitos B (CD45+)

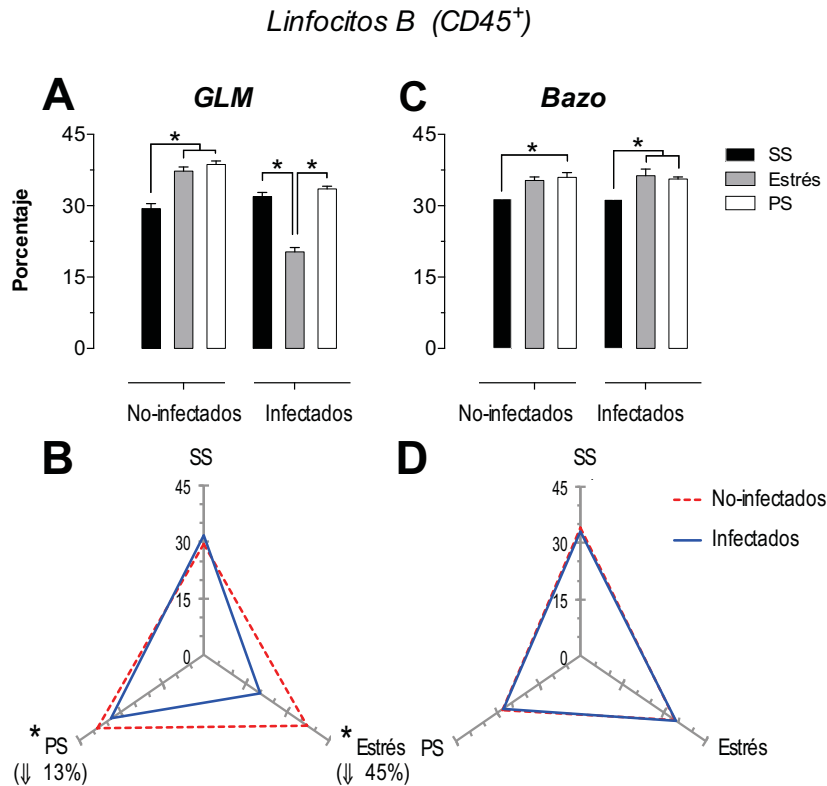


Figura 6.1.3-4 Porcentaje de Linfocitos B (CD45⁺). Se muestra la condición de Sueño Suficiente (SS)(barras sólidas), Estrés (barras sombreadas) y de privación del sueño (PS) (barras transparentes) en Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM) (A) y el Bazo (C); presentando primero a los grupos no-infectados (a la izquierda) y posteriormente a los infectados (derecha). Los paneles B y D muestran el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS en GLM (B) y el bazo (D). La línea discontinua roja representa el porcentaje de linfocitos B (CD45⁺) en los grupos no infectados; la línea continua azul representa el porcentaje de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con *p<0.05. En las figuras B y D las diferencias significativas (*p <0.05) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

En los grupos no infectados las condiciones de estrés y PS de GLM presentaron un aumento significativo ($p < 0,05$) (Fig. 6.1.3-4 A); en comparación con el bazo, en el cual solo la condición PS mostró un aumento similar ($p < 0,05$) (Fig. 6.1.3-4 C). Para los grupos infectados, la condición de estrés presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) en comparación con las condiciones de SS y PS (Fig. 6.1.3-4 A). Para bazo, los grupos infectados mostraron un aumento tanto en los animales estresados, como en los privados de sueño (Fig. 6.1.3-4 C), demostrando que la infección no parece alterar la modulación ejercida por el estrés o la privación del sueño.

Adicionalmente, en GLM la infección causó una disminución significativa ($p < 0,05$) del 45% en comparación al grupo no infectado para la condición de estrés, mientras que para la condición PS, la disminución del grupo infectado *versus* el no-infectado fue del 13% (Fig. 6.1.3-4 B).

Células NK (NK1.1+)

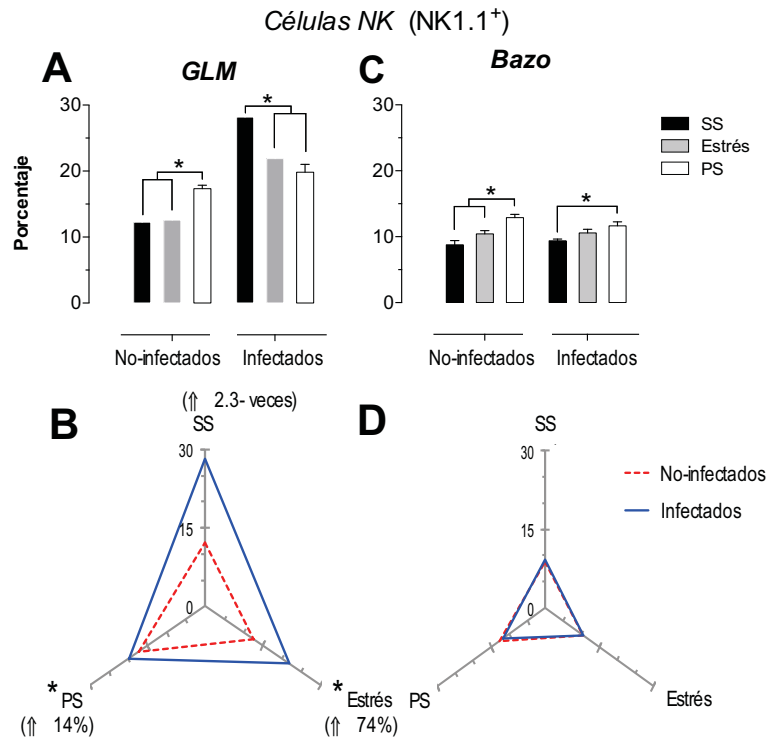


Figura 6.1.3-5 Porcentaje de células NK (NK1.1⁺). Se muestra la condición de Sueño Suficiente (SS)(barras sólidas), Estrés (barras sombreadas) y de privación del sueño (PS) (barras transparentes) en Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM) (A) y en Bazo (C); presentando primero a los grupos no-infectados (a la izquierda) y posteriormente a los infectados (derecha). Los paneles B y D muestran el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS en GLM (B) y el bazo (D). La línea discontinua roja representa el porcentaje de células NK (NK1.1⁺) en los grupos no infectados; la línea continua azul representa el porcentaje de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con * $p < 0.05$. En las figuras B y D las diferencias significativas (* $p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

Las células NK de bazo y GLM mostraron un aumento significativo en la condición de PS en los animales no infectados (Fig. 6.1.3-5 A y C). En la población de GLM de los grupos infectados la condición de PS y de estrés produjo un una disminución significativa ($p < 0.05$), de forma contraria, la condición de PS en animales infectados mostró un aumento significativo ($p < 0.05$).

En GLM la infección modificó el comportamiento de esta población celular para las tres condiciones: SS, Estrés y PS, observándose un aumento significativo en el grupo SS de 2.3 veces el porcentaje del grupo no-infectado, mientras que los grupos infectados en la condición de estrés y PS mostraron un aumento

del 74% y del 14% respectivamente (Fig. 6.1.3-4 B). Para el caso del bazo, la infección no tuvo efecto sobre alguna de las tres condiciones (Fig. 6.1.3-4 D).

Análisis de correspondencia múltiple (MCA)

Con el fin de analizar la respuesta de cada tipo de población celular en función de la condición (estrés o PS) y del tratamiento (infectadas o no-infectadas) se diseñó un análisis de correspondencia múltiple para cada tejido: bazo y GLM. El análisis de correspondencia múltiple (MCA), se utiliza para determinar el patrón complejo de asociación entre una condición y el tratamiento. En este trabajo aplicamos el MCA para determinar el efecto diferencial de la privación del sueño o el estrés (condiciones) en los grupos infectados y no-infectados (tratamiento). Este análisis muestra los cambios (aumento, disminución o sin cambio) mayormente asociados una condición y un tratamiento. Esta asociación está representada por la distancia entre los grupos, la fuerza de asociación se interpreta en términos de las posiciones relativas (distancia) que toman los cambios para cada parámetro medido, es decir la distancia entre los puntos que forman un grupo en función de las dos dimensiones (Dim1 y Dim2). Cada dimensión puede explicar el comportamiento de los grupos y su asociación, y es representada como porcentaje (Fig. 6.1.3-6).

El análisis reveló un patrón distintivo de asociación dependiente del tejido entre las variables descritas (Fig. 6.1.3-7). Tanto para GLM como para el bazo, el análisis de correspondencia múltiple (MCA) mostró la formación de tres grupos discretos definidos por el cambio (aumento, disminución o ningún cambio) en el porcentaje de cada población celular. Sin embargo, estos grupos presentaron variación en su composición, lo que sugiere un efecto diferencial provocada por las condiciones (PS o estrés).

El análisis para GLM mostró que tanto el tratamiento, es decir, la infección con *Trichinella spiralis* en conjunto con la condición, PS o estrés, contribuyeron a la formación de los tres grupos presentados en el panel A; cuyas respuestas muestran diferencias en el comportamiento para cada tipo de población (Fig. 6.1.3-7). Así mismo, los grupos difieren en las poblaciones celulares que incluyen. Podemos observar que existen dos grupos relacionados a la infección, el primero comprende a las poblaciones que no presentaron cambios e incluyen a los linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+) tanto en las condición de estrés como de PS, el segundo grupo comprende a las poblaciones que presentaron una disminución, y solo comprende la condición de PS e incluye a la población de linfocitos T totales (CD3+). El tercer grupo está relacionado a la no-infección y muestra a las poblaciones que presentaron un aumento, en el cual se puede distinguir un efecto diferencial de la condición, así la condición de estrés incluye el aumento de las poblaciones de células NK, mientras la condición de PS además de incluir el aumento de esta misma población, también incluye el aumento de los linfocitos B (CD45+).

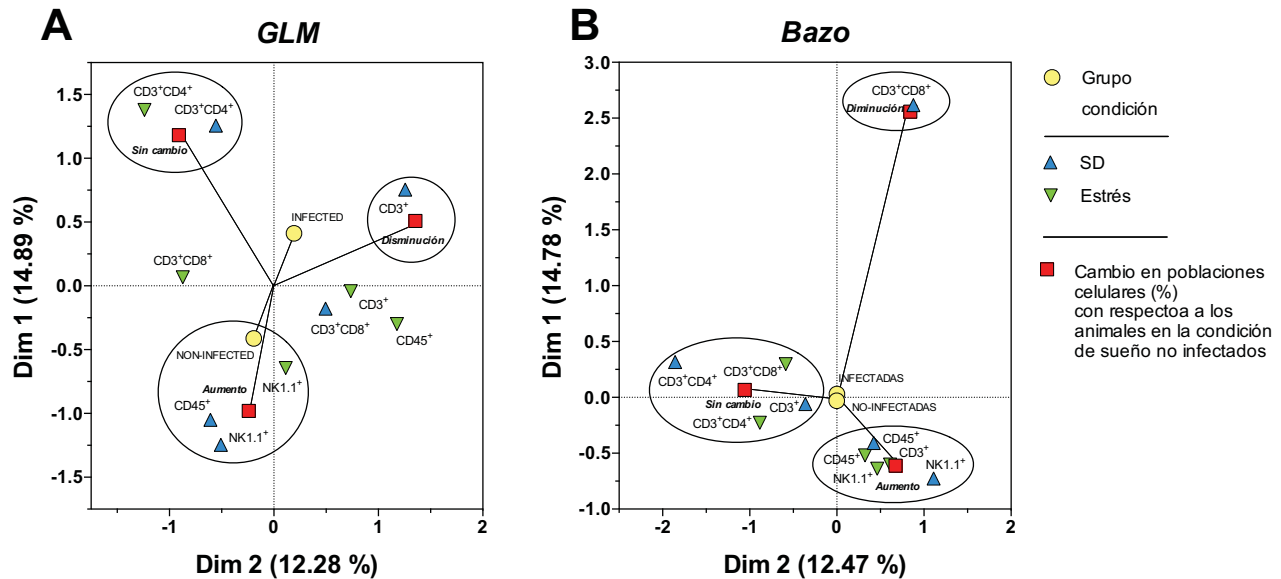


Figura 6.1.3-7 Análisis de correspondencia múltiple (MCA). Se muestra el patrón de asociación entre los cambios en los porcentajes de las poblaciones celulares en función de la condición: PS o estrés; y el tratamiento: infectados y no-infectados, para ganglios linfáticos mesentéricos (GLM)(A) y bazo (B). La fuerza de la asociación entre variables se interpreta como la distancia que separa dos puntos adyacentes: cuanto menor sea la distancia, mayor es la asociación entre las categorías (cambio, tipo celular, condición y tratamiento). La fuerza de asociación entre las variables se interpreta en términos de las posiciones relativas (distancia) de los puntos en función de dos dimensiones (Dim1 y Dim2). Cada dimensión explica el comportamiento para cada población de células analizadas, y asocia la respuesta al tratamiento y a la condición.

En el patrón de asociación de bazo, podemos observar la formación de tres grupos, al igual que en GLM, sin embargo la formación de estos grupos fue poco determinada por la infección. En el grupo conformado por las poblaciones que mostraron un aumento, se muestra que al igual que en GLM, la condición de PS se asocia al aumento de las células NK (NK1.1⁺) y de linfocitos B (CD45⁺), pero de forma adicional, esta condición también se encuentra asociada al tercer grupo, distinguido por la disminución de los linfocitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺). Nótese que el aumento de células NK (NK1.1⁺) y de linfocitos B (CD45⁺), al igual que la condición de PS, también están asociados a la condición de estrés, sin embargo, esta última condición se asocia de forma adicional con el aumento de los linfocitos T (CD3⁺). El tercer grupo está conformado por las poblaciones que no mostraron cambios en una determinada condición, e incluye a los linfocitos T cooperadores (CD3⁺CD4⁺) en ambas condiciones, a los linfocitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) en la condición de estrés y los linfocitos T (CD3⁺) en la condición de PS. Mostrando que el comportamiento de estas últimas dos poblaciones es determinado por la condición de estrés o de PS. De forma general para bazo, el efecto observado en el porcentaje de las poblaciones celulares (comportamiento) depende únicamente de la privación de sueño o del estrés condiciones REM para el bazo (Fig. 7A).

6.1.4 ANÁLISIS DEL RECLUTAMIENTO CELULAR EN LA MUCOSA INTESTINAL

El conteo celular para cada población analizada se realizó de forma diferencial en las vellosidad y en la zona de criptas o zona glandular, se muestran las imágenes representativas para cada condición y el tratamiento.

Eosinófilos.

Eosinófilos en vellocidad

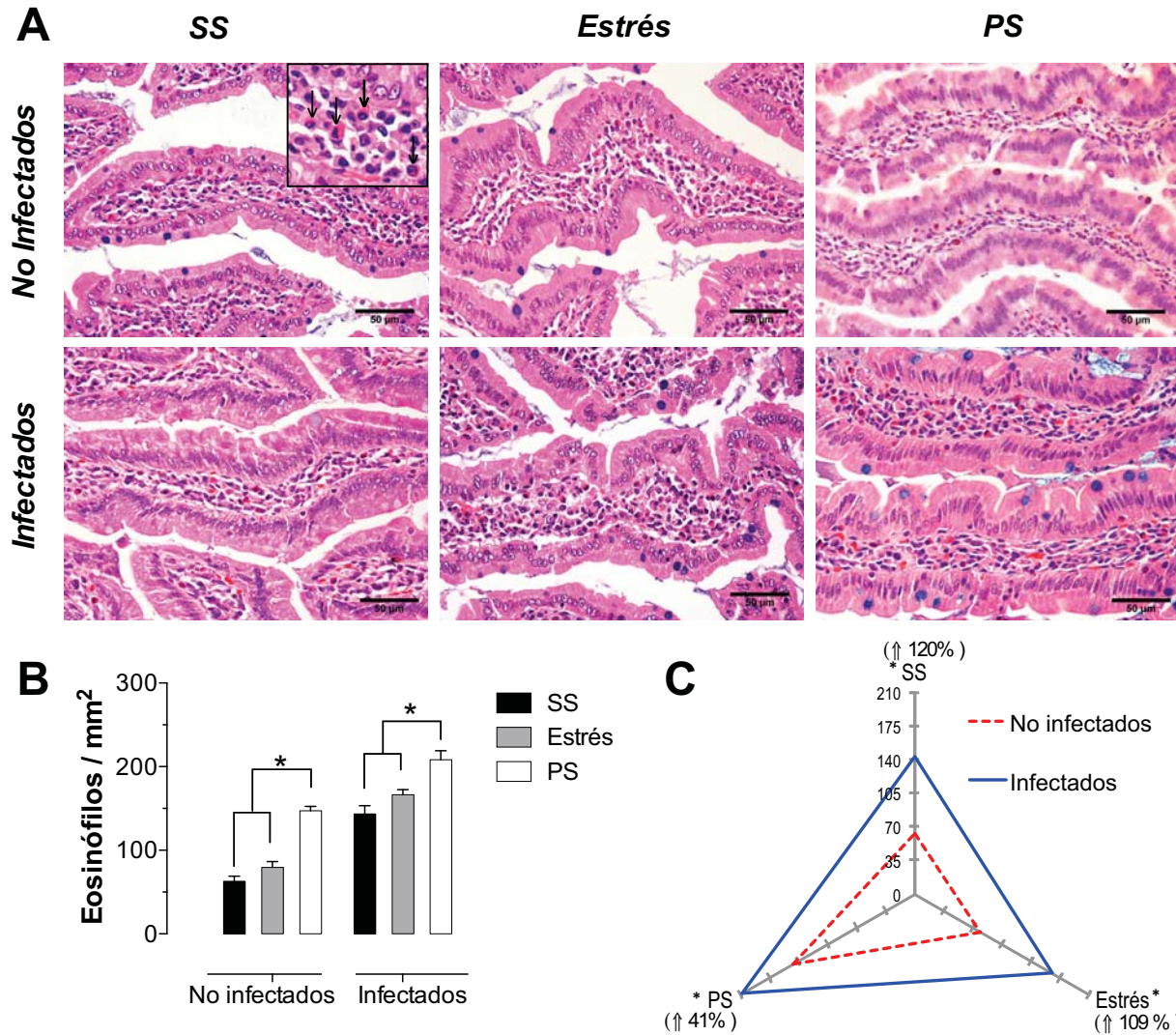


Figura 6.1.4-1 Morfología e identificación de Eosinófilos en vellosidad. (A) Se muestra micrografías representativas de vellosidades en el primer segmento de duodeno con tinción H-E 40X, para la condición de Sueño Suficiente (SS), Estrés y Privación de sueño (PS) para grupo infectados (en la fila superior) y para los grupos infectados (fila inferior). (B) Se muestra la cuantificación de eosinófilos para las tres condiciones. (C) Se muestra el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS. La línea discontinua roja representa el número de eosinófilos para los grupos no infectados; la línea continua azul representa la cantidad de eosinófilos de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con * $p < 0.05$. En la figura C las diferencias significativas (* $p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

Eosinófilos periglandulares

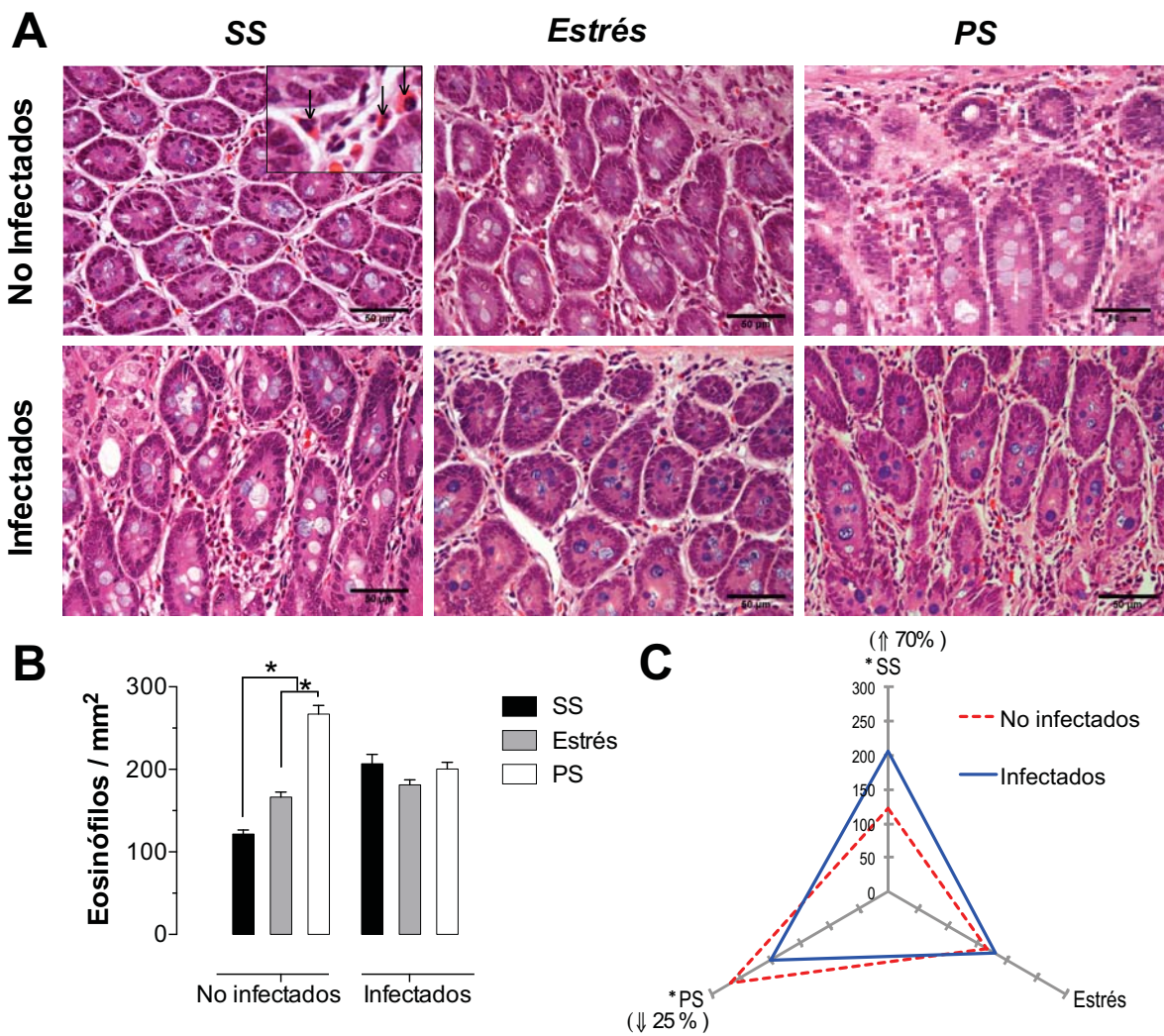


Figura 6.1.4-2 Morfología e identificación de Eosinófilos periglandulares. (A) Se muestra micrografías representativas de vellosidades en el primer segmento de duodeno con tinción H-E 40X, para la condición de Sueño Suficiente (SS), Estrés y Privación de sueño (PS) para grupo infectados (en la fila superior) y para los grupos infectados (fila inferior). (B) Se muestra la cuantificación de eosinófilos para las tres condiciones. (C) Se muestra el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS. La línea discontinua roja representa el número de eosinófilos para los grupos no infectados; la línea continua azul representa la cantidad de eosinófilos de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con * $p < 0.05$. En la figura C las diferencias significativas (* $p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

Eosinófilos a nivel de vellosidad: Las imágenes muestran la morfología de las vellosidades observadas con tinción H-E, las cuales son constituidas por un epitelio cilíndrico simple, que incluye a la lamina propia en la parte central. Los eosinófilos fueron identificados por sus características morfológicas, células nucleadas con un citoplasma de tono naranja-rosa característico para esta tinción (ver inserto Fig. 6.1.4-1A). La figura 6.1.4-1A muestra una microfotografía representativa para cada grupo experimental y control. En la primer fila observamos a las tres condiciones: SS, estrés y PS sin infección.

En las tres microfotografías observamos la morfología típica de las vellosidades, sin embargo en la lamina propia podemos observar un discreto aumento en la cantidad de eosinófilos. Para los grupos infectados, mostrados en la fila inferior de la figura 6.1.4-1A se distingue un aumento evidente de este tipo celular.

En los animales no infectados, los grupos PS y estrés mostraron un aumento significativo en el número de eosinófilos del 26% para el grupo de estrés y del 133% para el grupo PS, con respecto al grupo SS. En los grupos infectados se observó una sinergia debida a la infección, se presentó el mismo patrón de comportamiento que en los grupos no infectados, sin embargo la magnitud del cambio en la cantidad de eosinófilos para ambas condiciones fue mayor, cercano al 163% para los animales estresados infectados y del 230% para los animales privados de sueño infectados, comparados con el grupo SS no infectado.

Cuando ambas condiciones, PS y estrés se comparan con el grupo SS infectado, los porcentajes de cambio disminuyen, siendo del 16% para la condición de estrés y del 61% para PS (Fig. 6.1.4-1B). En el panel C de la figura 6.1.4-1, la condición de PS mostró una mayor cantidad de eosinófilos tanto en los grupos no-infectados, como en los infectados; así mismo la infección produjo un aumento en las tres condiciones, que para el grupo de SS fue del 120%, para el de estrés fue del 109% y para el de PS fue de 42%.

Eosinófilos periglandulares: La figura 6.1.4-2A muestra la morfología de la mucosa intestinal a nivel de las glándulas, donde observamos el mismo tipo de epitelio que el de las vellosidades, y una lamina propia periglándular continua con la de la vellosidad, menos abundante. Las microfotografías de los grupos infectados demuestran un aumento de la celularidad en la lamina propia periglandular, a expensas de un mayor número de eosinófilos.

Cuantitativamente demostramos que para los grupos no infectados, en las condiciones de PS y estrés tuvieron un aumento significativo de eosinófilos, sin embargo la mayor diferencia fue observada para el grupo de PS con un aumento del 145%, mientras que en el grupo de estrés el aumento fue del 45% comparado con el grupo SS no-infectado. Para los grupos infectados no se observaron cambios en el número de eosinófilos de las condiciones estrés infectado y PS infectado versus SS infectado, como se muestra en la fig. 6.1.4-2B.

Cuando se analizó el efecto de la infección sobre las tres condiciones, nuestro estudio mostro que la infección por si sola (en el grupo SS infectado) provoca un aumento significativo del 70% de eosinófilos, mientras que para la condición de estrés no se observaron cambios (Figura 6.1.4-2). De forma interesante para el grupo PS, la infección causó una disminución significativa del 25% de eosinófilos de

forma contraria a lo observado en el grupo control SS. Lo anterior sugiere que la infección modula el aumento de eosinófilos producidos por la privación de sueño.

Células cebadas:

Células Cebadas en vellocidad

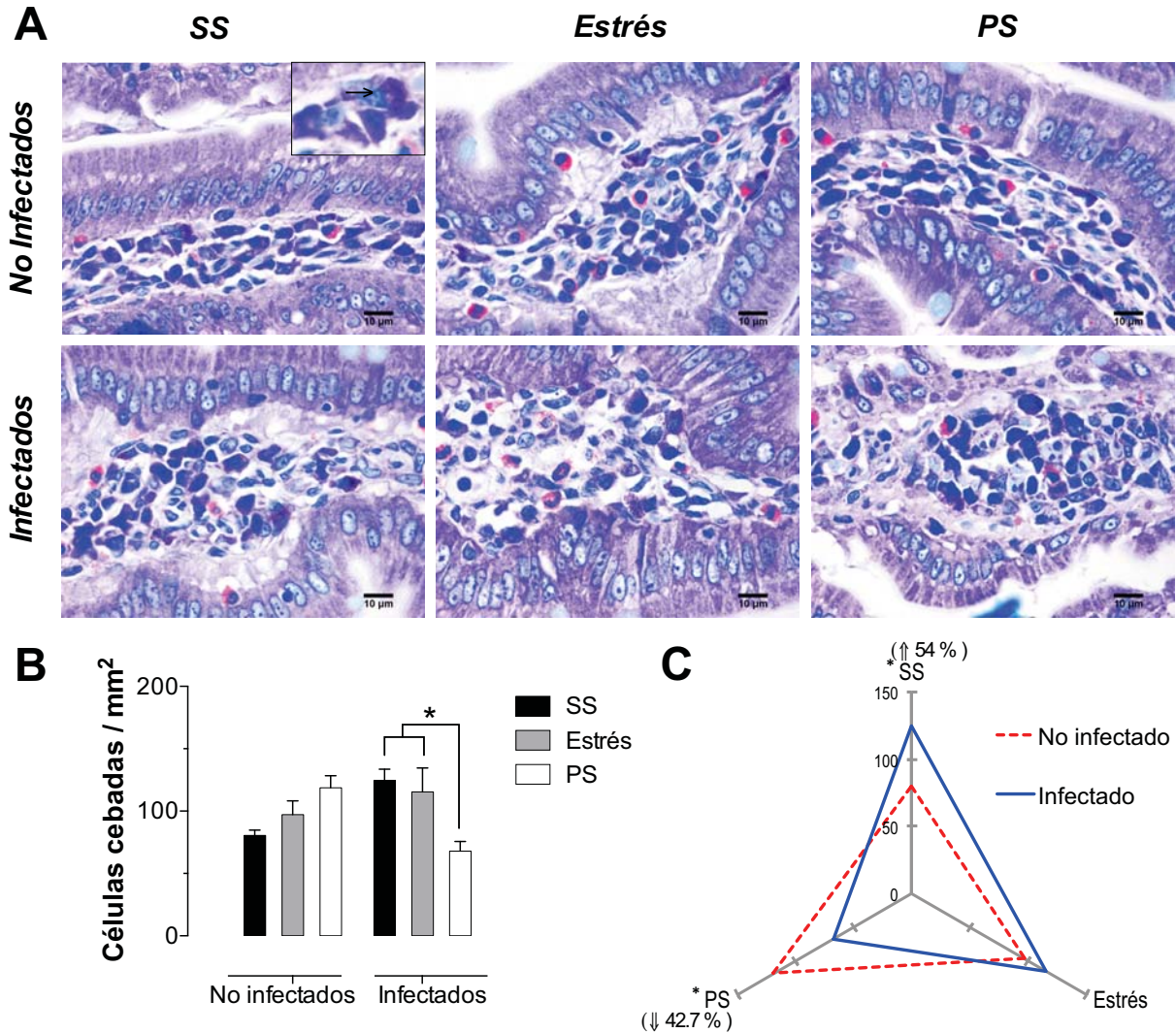


Figura 6.1.4-3 Morfología e identificación de Células Cebadas en vellosidad. (A) Se muestra microfotografías representativas de vellosidades en el primer segmento de duodeno con tinción de Giemsa 40X, para la condición de Sueño Suficiente (SS), Estrés y Privación de sueño (PS) para los grupos infectados (en la fila superior) y para los grupos infectados (fila inferior). (B) Cuantificación de células cebadas para las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS, la línea discontinua roja representa el número de células cebadas para los grupos no infectados; la línea continua azul representa la cantidad de células cebadas de los grupos infectados. (C) Efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS, la línea discontinua roja representa el número de células cebadas para los grupos no infectados; la línea continua azul representa la cantidad de células cebadas de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con * $p < 0.05$. En la figura C las diferencias significativas (* $p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados

Células Cebadas periglandulares

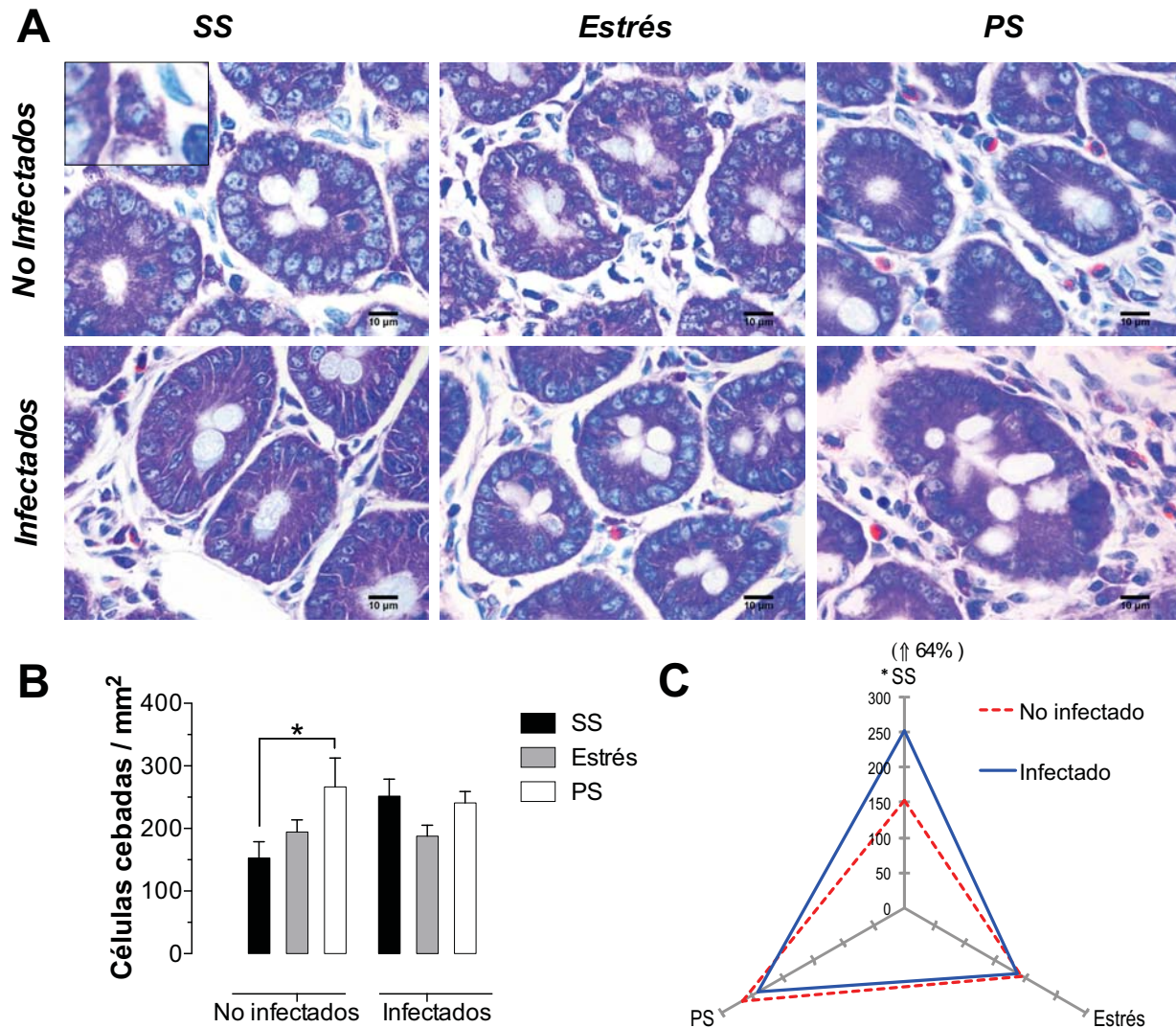


Figura 6.1.4-4 Morfología e identificación de Células Cebadas periglandulares. (A) Se muestra microfotografías representativas de vellosidades en el primer segmento de duodeno con tinción de Giemsa a 40X, para la condición de Sueño Suficiente (SS), Estrés y Privación de sueño (PS) para grupo infectados (en la fila superior) y para los grupos infectados (fila inferior). (B) Cuantificación de células cebadas para las tres condiciones. (C) Se muestra el efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS. La línea discontinua roja representa el número de células cebadas para los grupos no infectados; la línea continua azul representa la cantidad de células cebadas de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con $*p < 0.05$. En la figura C las diferencias significativas ($*p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados.

Células cebadas a nivel de vellosidad: La identificación y cuantificación de las células cebadas se realizó utilizando la tinción de Giemsa (Fig. 6.1.4-3A), la cual evidencio su presencia por la propiedad de sus gránulos de producir metacromacia como se muestra en el inserto de la figura 6.1.4-3A. Al igual que las imágenes mostradas en el caso de los eosinófilos, no se observaron daños en la mucosa o en la capa de

células epiteliales que cubre a la vellosidad, aunque para los grupos infectados en las condiciones SS y estrés se puede observar un aumento en el grosor de la lamina propia.

La posterior cuantificación de las células cebadas nos reveló que para los animales no-infectados, tanto el estrés como la privación de sueño no presentaron cambios significativos, aunque se observó un ligero aumento del 20 y 47% para la condición de estrés y de PS respectivamente (Fig. 6.1.4-3B). Por otro lado en los grupos infectados observamos un aumento de el número de células cebadas para las condiciones de SS-infectado y estrés-infectados, mientras que por el contrario el grupo de PS-infectado mostró una disminución significativa de alrededor del 40% versus el grupo SS y estrés infectados (Fig. 6.1.4-3B). En el panel C de la figura 6.1.4-3, se muestra el efecto que tiene la infección sobre cada una de las condiciones, de forma interesante se puede notar que para la condición de SS, la infección causa un aumento significativo del 54%, mientras que para la condición de PS, la infección causó una disminución significativa del 43%, y para la condición de estrés encontramos que la infección no provocó cambios significativos.

Células cebadas periglandulares: En las imágenes correspondientes a los grupos no infectados se puede notar que la morfología de las glándulas se encuentra conservada (Fig. 6.1.4-3). En el inserto de la figura 6.1.4-3A se muestra la morfología característica de las células cebadas en la zona periglandular, las cuales se distinguen como células amorfas y granulosas; en la mayor parte de las preparaciones se les observó relacionadas a los eosinófilos, los cuales muestran una tinción naranja-rosa. En los grupos no-infectados se observaron cambios evidentes e el grupo PS no-infectado en el se nota un aumento en la presencia de estas células, resaltando además la formación de grupos de dos a cuatro células cebadas, como se muestra en la microfotografía correspondiente a este grupo en el panel A. Las microfotografías correspondientes a los grupos infectados muestran una distribución homogénea de este tipo celular interaccionando con los eosinófilos.

La cuantificación en los grupos no-infectados mostró que la condición de PS produce un aumento significativo del 74%, mientras que un aumento discreto fue observado para el grupo de estrés, el cual no se encontró significativo, comparados contra el grupo SS no-infectado. Los grupos de ratas infectadas para la condición de estrés o PS no mostraron cambios significativos versus su grupo SS infectado, en consecuencia se puede observar que el aumento producido por la condición PS en los animales no infectados fue atenuado por la infección.

De forma contrastante, en el panel C de la figura 6.1.4-4 observamos que la infección tuvo efecto evidente solo para la condición de SS, ya que este grupo mostró un aumento significativo del 64%, mientras que para la condición de PS solo se observó una discreta disminución del 10% que no llegó a ser significativa.

Células Enteroendocrinas glandulares

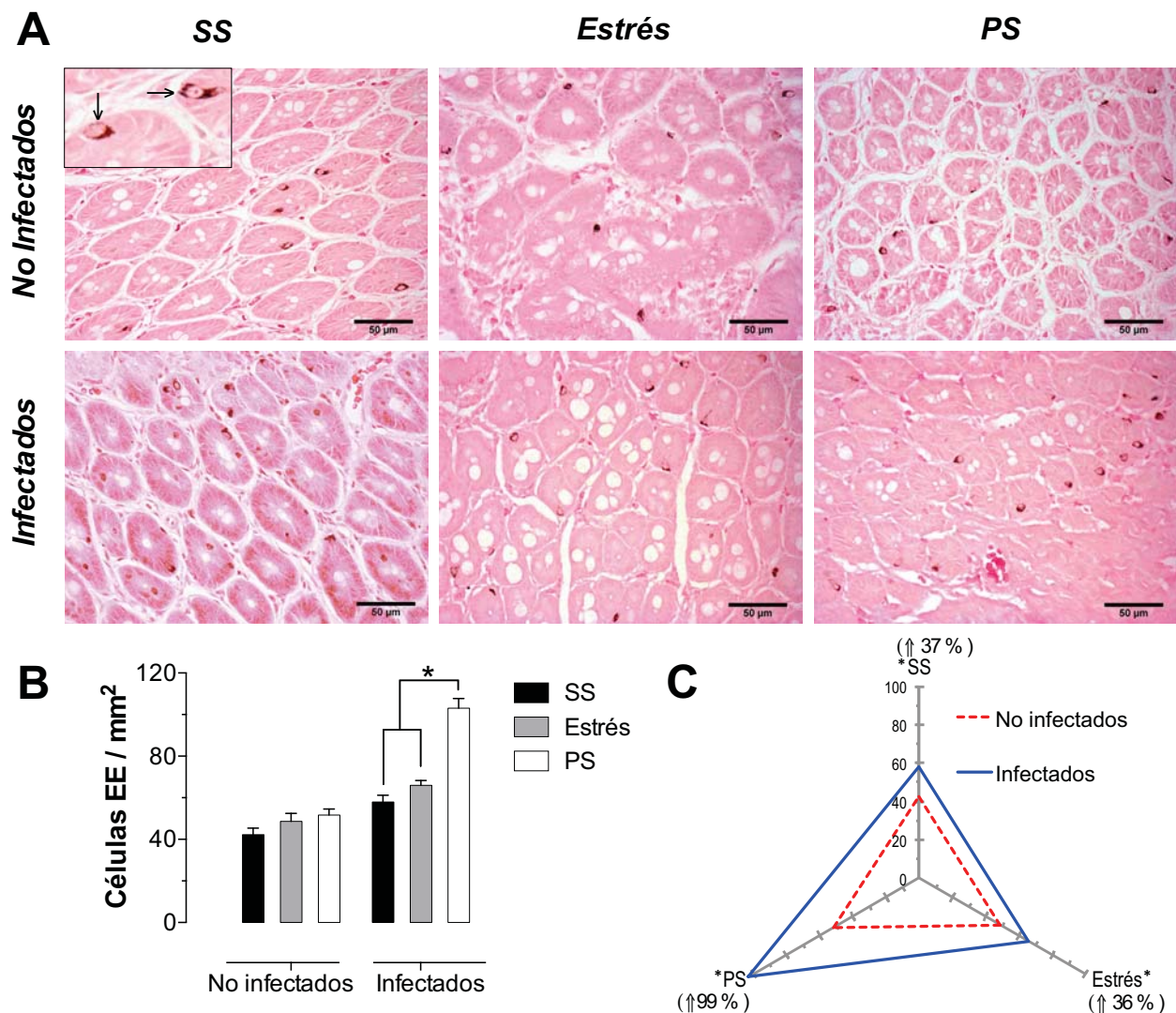


Figura 6.1.4-6 Morfología e identificación de Células Enteroendocrinas periglandulares. (A) Se muestra microfotografías representativas de vellosidades en el primer segmento de duodeno con tinción de Fontana Masson a 40X, para la condición de Sueño Suficiente (SS), Estrés y Privación de sueño (PS) para grupo infectados (en la fila superior) y para los grupos infectados (fila inferior). (B) Cuantificación de células enteroendocrinas para las tres condiciones. (C) Efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS. La línea discontinua roja representa el número de células enteroendocrinas para los grupos no infectados; la línea continua azul representa la cantidad de células cebadas de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con $*p < 0.05$. En la figura C las diferencias significativas ($*p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no infectados

Células enteroendocrinas a nivel de vellosidad: En las microfotografías presentadas se puede identificar con facilidad a este tipo celular, ya que como lo muestra el inserto de la figura 6.1.4-5A su morfología y tinción característica hace que la base del citoplasma, en donde se encuentran las vesículas, resalte con

un color café oscuro con una textura granulosa. Como se puede observar, se les encuentra asociadas a la capa de células epiteliales que recubre a las vellosidades.

En las imágenes correspondientes a los grupos no infectados se puede observar una distribución homogénea entre las vellosidades. En las microfotografías correspondientes a los grupo SS y en el PS infectados se puede observar un aumento discreto. En el panel B, la cuantificación en los animales no infectados muestra que la condición de PS y de estrés producen aumento significativo del 43 y 27% respectivamente. En este mismo panel, para los grupos infectados, la condición de estrés presenta una disminución significativa de aproximadamente el 15% comparado con el grupo SS y PS infectados (Fig. 6.1.4-5B).

Por otro lado cuando analizamos el efecto del sueño sobre cada una de las tres condiciones podemos notar que la infección causo un aumento significativo en las condiciones de SS y de PS, aunque dicho efecto se mostró con una magnitud diferente, ya que para la condición de SS el aumento fue del 62%, mientras que para la condición de PS el aumento fue del 18% como se muestra en la figura 6.1.4-5C.

Células enteroendocrinas glandulares: En el inserto de la figura 6.1.4-6A podemos identificar a las células enteroendocrinas como un componente dentro de la glándula, se observa el citoplasma orientado hacia la parte exterior de la glándula, el color y textura presenta las mismas características que las observadas en las vellosidades.

En las microfotografías de los grupos no-infectados se observa una distribución homogénea entre las condiciones, mientras que para los grupos infectados, en la condición de privación de sueño puede observarse un claro aumento en la cantidad de este tipo celular. En la posterior cuantificación mostrada en la figura 6.1.4-6B se observa que en los animales no-infectados ninguna de las condiciones produce cambios, mientras que para los animales infectados se observó un aumento significativo del 78% para la condición de PS con respecto al grupo SS infectado.

Por otro lado, en el panel C podemos observar que la infección produjo cambios para cada condición, en donde SS y estrés presentan aumentos discretos pero significativos del 58 y 66% respectivamente, mientras que para la condición de PS, la infección produjo un claro aumento del 103%.

Células caliciformes:

Células caliciformes en vellocidad

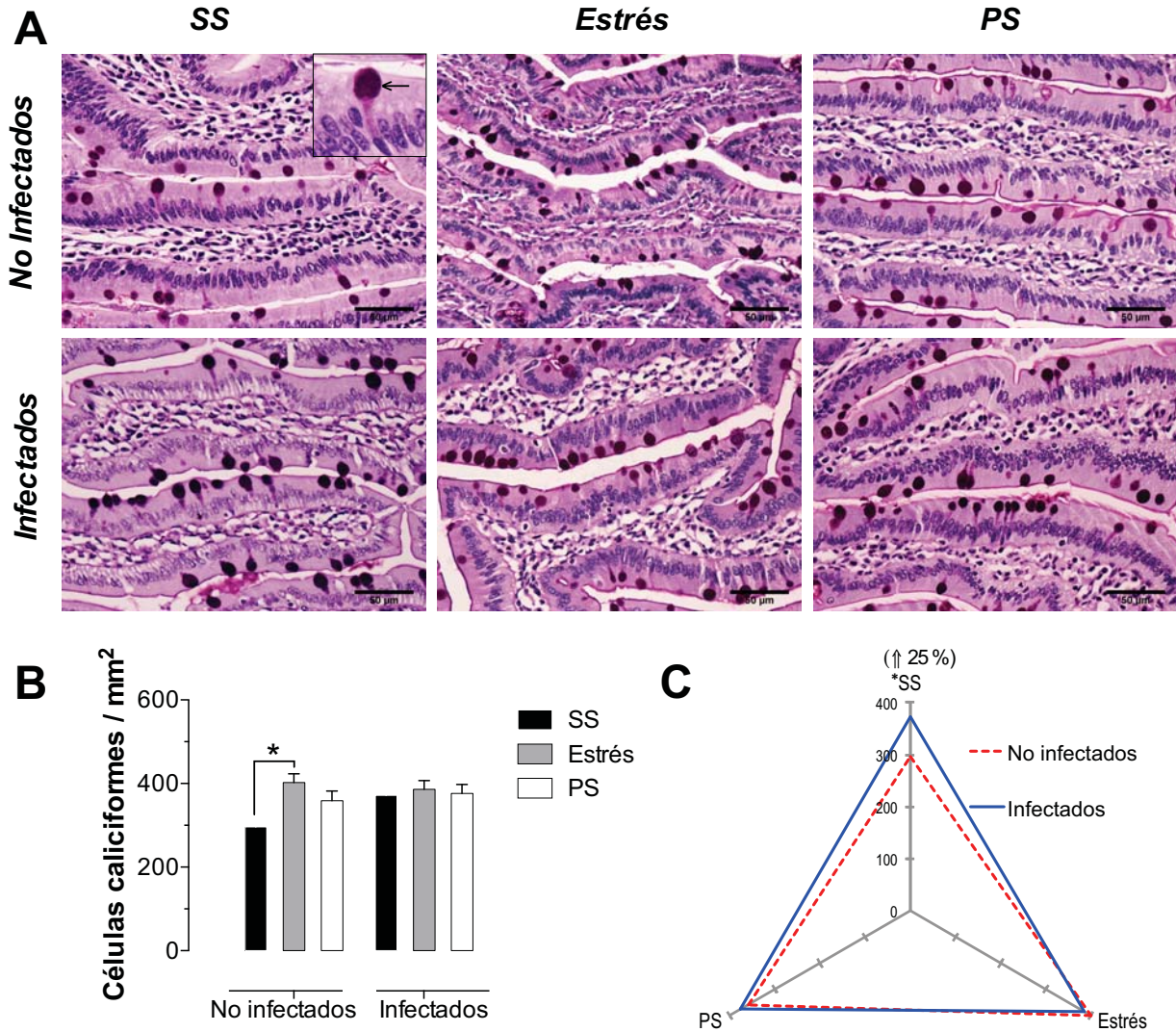


Figura 6.1.4-7 Morfología e identificación de Células Caliciformes en vellosidad. (A) Se muestra microfotografías representativas de vellosidades en el primer segmento de duodeno con tinción de PAS 40X, para la condición de Sueño Suficiente (SS), Estrés y Privación de sueño (PS) para grupo infectados (en la fila superior) y para los grupos infectados (fila inferior). (B) Cuantificación de células caliciformes para las tres condiciones. (C) Efecto diferencial de la infección en las tres condiciones de estudio: SS, el estrés y PS. La línea discontinua roja representa el número de células caliciformes para los grupos no infectados; la línea continua azul representa la cantidad de células caliciformes de los grupos infectados. ANOVA dos-vías y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con * $p < 0.05$. En la figura C las diferencias significativas (* $p < 0.05$) mostradas surgen de la comparación de los grupos infectados *versus* los no-infectados

Células caliciformes a nivel de vellosidad: En la figura 6.1.4-5A se distinguen claramente a las células caliciformes, se le encuentra incorporadas entre células epiteliales de las vellosidades, con el extremo que contiene las vacuolas de moco hacia el lumen como se puede observar en el inserto del panel A. En las microfotografías podemos distinguir que se distribuyen de forma homogénea a lo largo de la vellosidad para todas las condiciones, además de que no se observa un claro aumento en alguna condición o tratamiento. La cuantificación en la figura 6.1.4-5B muestra que para los grupos no-infectados solo la condición de estrés presentó un aumento significativo del 35%, mientras que en los grupos infectados las condiciones de estrés y PS no mostraron cambios significativos cuando son comparados con el grupo SS infectado.

Cuando en el panel C analizamos en el efecto de la infección en cada una de las condiciones se observa que solo para la condición de SS, la infección causa un ligero cambio del 25% que llega a ser significativo, mientras que para las otras condiciones la infección no tuvo efectos.

Células caliciformes periglandulares: En el inserto de la figura 6.1.4-6A se muestran las células caliciformes localizadas en las glándulas, podemos observarlas con un tono rosa intenso cuando sus gránulos se encuentran llenas de moco, o solo el contorno pintado del mismo color con el centro claro cuando estas células han secretado el moco, estado conocido como hipersecretor.

En las micrografía correspondientes a los grupos infectados podemos observar un aumento en el número de células para las condiciones de estrés y PS, adicionalmente podemos observar que la composición de estas células también es diferente ya que en la condición de SS las células que predominan son células que tienen sus gránulos llenos de moco (cargadas), mientras que en las microfotografías correspondientes a estrés y PS observamos que la mayoría de las células se encuentran en un estado secretor, el cual se evidencia por que una parte de las vacuolas se observan vacías.

En la cuantificación presentada en la figura 6.1.4-6B, se puede notar que en los animales no-infectados para las condiciones de estrés y PS presentan un aumento significativo del 29 y 36% respectivamente, para los grupos infectados ninguna condición presentó diferencias con respecto al grupo SS infectado.

Cuando analizamos el efecto de la infección para cada una de las condiciones, la figura 6.1.4-6C muestra que la infección ocasionó un aumento significativo solo en el grupo SS, mostrando que la infección no es relevante para las condiciones de estrés y PS.

6.2 EFECTO DE LA INFECCIÓN POR *Trichinella spiralis* SOBRE EL PATRÓN DE SUEÑO

Cambios en la estructura de sueño

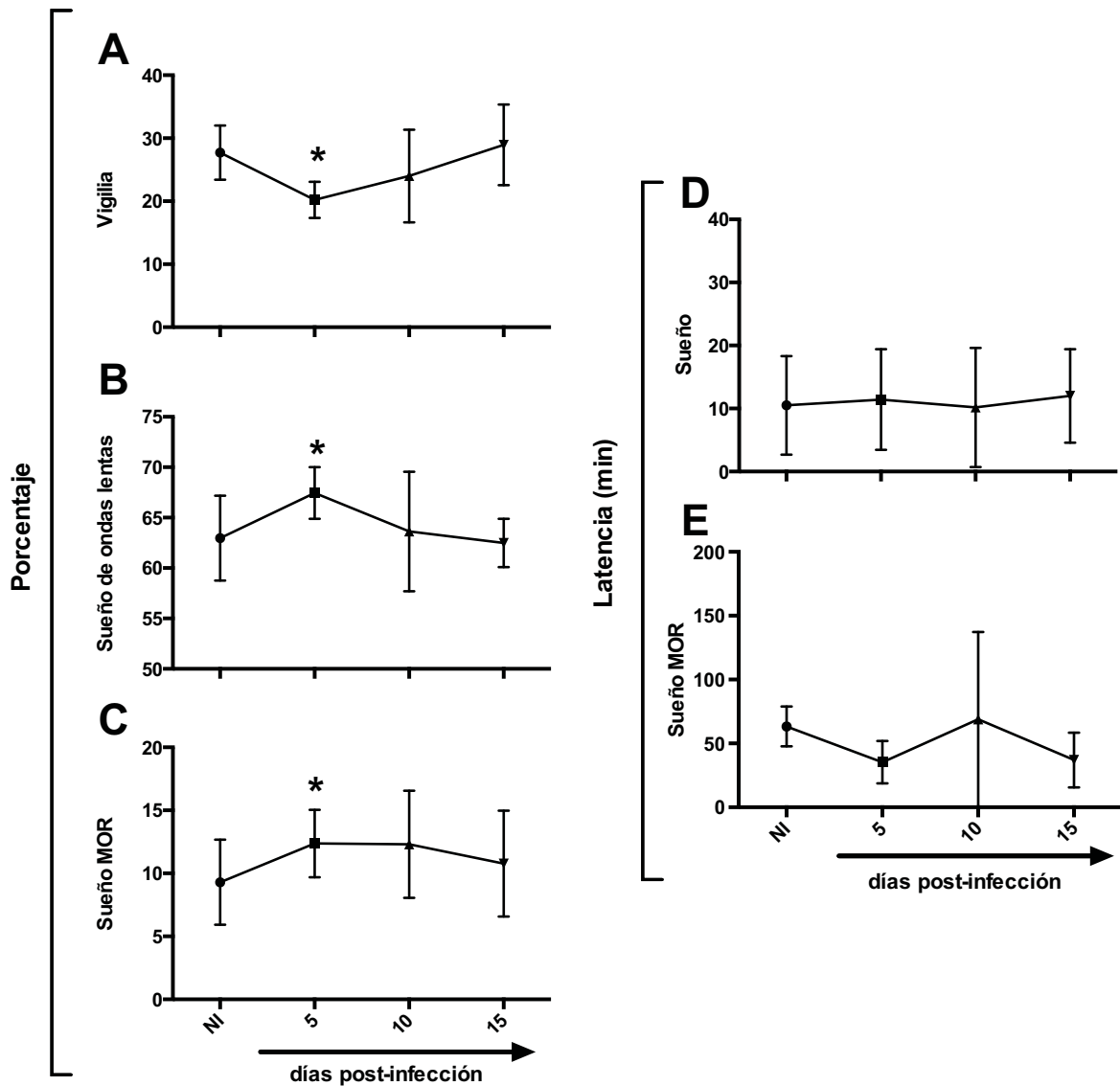


Figura 6.2-1 Análisis de los registros de sueño. En los paneles (A), (B) y (C) se muestra el porcentaje de cada uno de las etapas de sueño y la vigilia para los registros de sueño desde el registro basal (no-infectado) hasta los 5, 10 y 15 días post-infección. Los paneles (D) y (E) muestran la latencias a sueño (D) y a sueño MOR (E) en minutos en las mismas condiciones. ANOVA de una-vía y como post-test la prueba de Bonferroni. Diferencias significativas con $*p < 0.05$.

En el protocolo para evaluar el efecto de la infección sobre el patrón de sueño se incluyó un registro inicial de las ratas no infectadas, el cual se tomó como referencia para evaluar los cambios en el porcentaje de cada una de las etapas de sueño a los 5, 10 y 15 días post-infección.

En la figura 6.2-1A se muestran los cambios en el porcentaje de vigilia para cada periodo de infección. Para el periodo de 5 días post-infección se observó una disminución significativa ($p < 0.10$) comparado con los registros basales de los animales no infectados (NI); para los 10 y 15 días post-infección no se encontraron diferencias. En los paneles B y C, correspondientes al porcentaje de sueño de ondas lentas y sueño MOR se observó un aumento significativo a los 5 días post-infección solo para el sueño de ondas lentas, y al igual que en el caso de la vigilia no se observaron diferencias significativas para los 10 y 15 días post-infección.

Los paneles D y E muestran el efecto de la infección sobre las latencias a sueño y sueño MOR, como se muestra en las gráficas, no se encontraron diferencias significativas, por lo que la infección no causa efecto en el tiempo en el que las ratas lograron conciliar tanto el sueño como el sueño MOR.

Estos datos muestran que el efecto de la infección sobre el patrón de sueño ocurre a los 5 días. En este periodo la infección aún se encuentra en fase intestinal y se le ha caracterizado por la presencia de una respuesta pro-inflamatoria, en la cual se ha reportado hiperplasia de células como eosinófilos, mastocitos y enteroendocrinas, sin embargo en estos periodos tempranos no existen reportes de cuáles son las citocinas que participan de forma predominante, las cuales probablemente correspondan con un perfil pro-inflamatorio, en el cual la participación de IL-1, TNF e IFN han sido caracterizadas y que además se ha mostrado tiene un efecto modulador del sueño, aumento de forma particular el sueño de ondas lentas cuando son administradas de forma sistémica y local en diferentes estructuras cerebrales.

7. DISCUSIÓN

El estilo de vida contemporáneo, los factores relacionados con el trabajo y los trastornos clínicos, particularmente el insomnio son las causas más comunes de la privación del sueño [143]. En Estados Unidos entre los años 80's y 90's se estimó que la prevalencia de la falta de sueño en adultos era del 20% de la población total [144] En este aspecto se sabe que el trastorno de sueño más común, el insomnio, afecta gravemente al 10% de los adultos en todo el mundo [145].

La privación consiste de forma general en la pérdida de sueño, ya sea en una completa falta de sueño durante un cierto período de tiempo o en la reducción del tiempo óptimo de sueño, como lo es el caso de la privación total de sueño, la restricción crónica del sueño o los trastornos del sueño [143].

En los últimos años se ha demostrado que incluso la reducción crónica en el tiempo de sueño o la fragmentación del sueño, conduce a alteraciones comparables a los de la privación aguda de sueño; en referencia particularmente a las funciones cognitivas, de atención y de memoria de procedimiento [146-148].

Aunque la mayor parte de la investigación ha abordado los efectos de la privación del sueño y su restricción sobre funciones cognitivas y fisiológicas como el metabolismo y la función endocrina, actualmente ha tomado interés los efectos que dicha privación puede tener sobre las funciones inmunes [42, 148, 149], desde que se sabe que ciertas poblaciones celulares y moduladores son regulados por la presencia o ausencia de sueño, en este aspecto se ha reportado que diversos efectores de la respuesta inmune, entre los que destacan las células dendríticas y moduladores como IFN e IL-12 entre otros, son regulados por el sueño, presentando un patrón cíclico que parece ser de tipo circádico; por lo tanto su comportamiento puede ser susceptible a los efectos de la privación del sueño [41].

Los efectos de la privación del sueño sobre el desarrollo de la respuesta inmune, y en particular en la adquisición de la inmunidad han sido poco explorados. En esta línea de investigación, el presente estudio es el primero en explorar el efecto de la privación de sueño sobre la respuesta inmune a un tiempo corto de infección cuando es producida por un parásito helminto gastrointestinal. En este marco, el objetivo principal de nuestro trabajo fue estudiar la influencia de la privación del sueño y el estrés relacionado a la técnica de privación sobre el comportamiento de diferentes poblaciones celulares a diferentes niveles de organización o compartimentos, al mismo tiempo que de forma independiente evaluamos si la infección puede producir cambios en el patrón de sueño, estableciendo con ello una relación de tipo bidireccional entre el Sistema inmune (respuesta inmunológica contra parásitos) y el Sueño como un proceso fisiológico orquestado por el Sistema Nervioso Central. En un abordaje inicial, evaluamos el cambio del porcentaje de diferentes poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa, tanto a nivel local, en ganglios linfáticos mesentéricos,

como a nivel sistémico, en el bazo. El segundo enfoque de nuestro trabajo se centra en los efectos sobre la respuesta inmune local, centrándonos en poblaciones celulares que ejercen esta función en la mucosa intestinal. Finalmente en experimentos independientes evaluamos como es que la infección de tipo parasitario podría modular el patrón de sueño.

En nuestros primeros resultados encontramos que las condiciones de estrés o PS en los grupos no infectados no presentaron cambios respecto a la concentración de corticosterona en suero. De forma interesante el grupo que fue infectado pero no sometido a estrés o a PS presentó un aumento de esta hormona, por lo que podemos inferir que la infección causada por *Trichinella spiralis* puede ser un estímulo más estresante que las condiciones de estrés y/o PS, o que la respuesta relacionada a estos dos estímulos parece diferir a la respuesta provocada por este parásito.

En cuanto a la modulación de las subpoblaciones celulares involucradas con la respuesta inmune, se ha demostrado que la privación del sueño tiene un efecto diferencial sobre diferentes poblaciones celulares. Investigaciones en esta área han demostrado que la PS provoca un aumento en la concentración de las células NK y células T citotóxicas a nivel sistémico, así como de mediadores pro-inflamatorios, tales como IL-1 β , TNF e IFN γ [48] y específicamente sobre la respuesta inmune adaptativa, se ha demostrado que la privación del sueño disminuye la generación de anticuerpos contra las vacunas de hepatitis A e influenza [36], lo cual parece indicar la importancia de la participación de sueño cuando se desarrolla una respuesta inmune innata y posteriormente una respuesta inmune adaptativa.

En este aspecto la primera parte de este trabajo está dirigida a estudiar el efecto de la privación del sueño y el estrés sobre la proporción de células de tipo inmune en el bazo y en GLM de forma basal (no-infección) y durante la infección parasitaria producida por *Trichinella spiralis*.

Los cambios observados en GLM nos dan la primera evidencia de la importancia del sueño en el reclutamiento de células en los ganglios periféricos durante la respuesta inmune innata, mientras que, el análisis realizado en las poblaciones de células de bazo, presenta una visión general que sugiere que la privación de sueño modifica el comportamiento de las células a nivel sistémico en condiciones basales y durante la infección.

Las condiciones utilizadas mostraron que el estrés y la PS podrían afectar diferencialmente el comportamiento de las poblaciones celulares. A pesar de que la PS puede ser clasificada como una forma de estrés, el procedimiento utilizado se caracteriza principalmente por la ausencia de sueño MOR así como una disminución del sueño NMOR, mientras que el grupo "estrés" fue sometido a los estímulos que se han reportado ocasionan estrés derivados al procedimiento de privación de sueño, tales como inmovilidad y aislamiento [150]. En este sentido, nuestros resultados mostraron que existen

poblaciones que responden de forma similar a ambos estímulos, sin embargo también observamos que otras poblaciones son más susceptibles a una determinada condición dependiendo del tejido analizado, de forma interesante observamos que en el bazo (el cual refleja los efectos sistémicos) la infección es irrelevante, ya que la infección no causa un efecto diferencial o adicional sobre los cambios causados por la PS o el estrés.

En nuestros resultados encontramos que tanto el estrés como la privación de sueño pueden causar un efecto similar, para el caso del bazo de los grupos no-infectados encontramos que ambas condiciones produjeron un aumento significativo en los linfocitos T totales ($CD3^+$), mientras que en GLM ambas condiciones produjeron un incremento en la subpoblación de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), así como en los linfocitos B ($CD45^+$).

En estos mismo grupos (no-infectados) observamos que de forma individual la condición de PS en bazo produce una disminución de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), al mismo tiempo que las células NK ($NK1.1^+$) y los linfocitos B ($CD45^+$) presentaron un aumento. Por otro lado en GLM la privación de sueño solo causó el aumento en la población de células NK ($NK1.1^+$).

De forma interesante no se observaron efectos que fueran producto solo de la condición de estrés tanto en los análisis realizados en GLM como en el bazo de los grupos no infectados.

Para los grupos infectados se observó un efecto diferencial de la infección sobre ambas condiciones que también dependió del tejido, ya que la modulación que ejerce tanto el estrés como la privación se vio modificada cuando las poblaciones analizadas provenían de ganglios, mientras que en las provenientes de bazo la infección tuvo efectos limitados. En estos grupos infectados observamos que al igual que los grupos no-infectados algunas poblaciones responden de forma similar a ambas condiciones, en bazo se encontró un aumento en el porcentaje de linfocitos B ($CD45^+$) en ambas condiciones, mientras que en GLM, ambas condiciones produjeron un aumento en los linfocitos T cooperadores ($CD3^+CD4^+$), así como una disminución de las células NK ($NK1.1^+$).

Para la condición de PS en los grupos infectados, únicamente se observó un aumento en el porcentaje en las células NK ($NK1.1^+$) de bazo, mientras que en la condición de estrés se observó una disminución en la población de linfocitos B ($CD45^+$) de GLM.

Nuestro análisis de correspondencias reveló que tanto el estrés como la PS se asocian con un aumento en las poblaciones de células B ($CD45^+$) y células NK ($NK1.1^+$) en el bazo, de forma individual la condición de estrés también fue asociada con un aumento de los linfocitos T totales ($CD3^+$), en contraste a la condición de PS fue asociada a una disminución en la subpoblación de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Velázquez-Moctezuma, 2004

[141] los cuales describen que resultados similares a los presentes, con la diferencia de que el grupo de Velázquez-Moctezuma compara la PS versus el estrés producido por inmovilización. De ambos estudios se puede asumir que la respuesta global de las subpoblaciones del sistema inmune depende de la naturaleza del estímulo.

Cuando se analizaron los efectos de la infección sobre los tejidos (bazo y GLM), se observó que la infección no es capaz de producir cambios adicionales a los generados por las condiciones de estrés o de PS en el bazo, ya que la infección no determinó la conformación de los grupos en el análisis de MCA (Fig. 7A). El aumento de linfocitos B (CD45⁺) y de células NK (NK1.1⁺) se asociaron de forma más estrecha con la privación de sueño y el estrés, en ausencia de infección, mientras que la disminución de linfocitos T citotóxicos se encontró claramente relacionado a la PS.

De forma contrastante, en MLN la infección contribuye de forma notoria a la formación de los grupos en el análisis de MCA, los cuales fueron caracterizados por el tipo de respuesta (aumento, disminución o ningún cambio). En los grupos no infectados la condición de estrés y de PS están relacionados con aumento de las células NK (NK1.1⁺), sin embargo el grupo PS también se asoció con el aumento de células B (CD45⁺), mientras que para los grupos infectados, la PS está fuertemente relacionada con la disminución de células T totales (CD3⁺).

Nuestro grupo infectado mostró que la respuesta en GLM asociada a la infección en ausencia de los dos estímulos se caracteriza por el aumento de células NK (NK1.1⁺) y la disminución de células T cooperadoras (CD3⁺CD4⁺); cuando comparamos este grupo con los grupos sometidos a estrés y a PS, observamos que el aumento de las células NK (NK1.1⁺) y la disminución de los linfocitos T cooperadores (CD3⁺CD4⁺) observados durante la infección se encuentran abolidos en ambas condiciones. En estudios pasados se ha demostrado que la respuesta temprana a *Trichinella spiralis* incluye un aumento de IL-5 y de IFN μ a las 30 hrs y 48 hrs de infección [151], respectivamente, lo cual puede sugerir que las células NK, también participan en el desarrollo de una respuesta inmune temprana, además de los clásicos productores de IL-5 como mastocitos. Es por ello que aunque no se ha reportado, dado el aumento de IFN μ a las 30 hrs, las células NK pueden participar en el desarrollo de la respuesta inmune innata contra *Trichinella spiralis*, por lo cual el desarrollo de la misma puede verse afectado tanto por la condición de PS como de estrés, ya que ambos estímulos abaten la respuesta de la infección sobre células NK (NK1.1⁺) y linfocitos T cooperadores (CD3⁺CD4⁺).

En cuanto al análisis realizado en la mucosa intestinal, se demuestra que de la misma forma que para el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos, las condiciones de privación de sueño y estrés tienen un efecto modulador diferencial el cual depende del tipo celular y de su localización.

En los grupos no infectados, se observó que la condición de PS presentó cambios significativos en el número de eosinófilos y de células cebadas. En ambos tipos celulares se observó un aumento significativo en la zona periglandular con respecto al grupo SS no-infectado, mientras que a nivel de vellosidades, la PS produjo un aumento significativo solo en el número de eosinófilos. Nuestros resultados demuestran que estos tipos celulares son más susceptibles a la privación de sueño (PS), y que esta condición provoca un proceso inflamatorio tanto en vellosidades como en la zona periglandular.

Para estos mismos grupos (no-infectados) la condición de estrés solo provocó un aumento significativo en el número de células caliciformes a nivel de vellosidades, mientras que tanto la condición de PS como de estrés producen un aumento en los eosinófilos del área periglandular y de células caliciformes glandulares, además de un aumento en el número de células enteroendocrinas en vellosidades. De forma interesante el aumento en el número de eosinófilos observado en la condición de PS fue significativamente mayor al observado en la condición estrés.

Para los animales infectados observamos que la condición de PS tuvo efecto sobre diferentes poblaciones a nivel de vellosidades. La infección en la condición de PS provocó un aumento significativo en el número de eosinófilos en las vellosidades, mientras que las células cebadas presentaron una disminución significativa, con respecto a los grupos SS infectados, este hallazgo se vuelve interesante ya que estos dos tipos celulares se encuentran estrechamente relacionados, e inducen el reclutamiento recíproco, sin embargo, en el presente trabajo observamos que mientras los eosinófilos aumentaron, las células cebadas disminuyeron lo cual puede ser debido a que las células se encuentran degranuladas y están en proceso de recarga de gránulos, como se ha descrito para algunos casos de alergias en vías respiratorias. A nivel glandular, la condición de PS en los grupos infectados presentó un aumento significativo en el número de células enteroendocrinas con respecto al grupo SS infectado. La condición de estrés para los grupos infectados únicamente produjo una disminución significativa de las células enteroendocrinas a nivel de vellosidades con respecto al grupo SS infectado. Cabe recordar que las células enteroendocrinas juegan un papel fundamental entre la conexión del Sistema inmune y El sistema Nervioso Entérico durante procesos infecciosos, por lo que modificaciones sobre esta población pueden ser fundamental en el desarrollo de respuesta inmune, toda vez que se pueden modificar los mecanismos que promueven funciones mecánicas como el peristaltismo en la mucosa del intestino hasta la coordinación de la comunicación entre las poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune.

De esta forma la modulación ejercida por el estrés y la PS sobre las células epiteliales, enteroendocrinas y caliciformes podrían alterar la integridad de la barrera dinámica que protege al huésped de la infección y de la exposición continua a estímulos potencialmente inflamatorios. Este fenómeno puede estar asociado a los efectos de la PS descritos anteriormente por Everson en el año

2000 [152], trabajo en el cual se observó una translocación bacteriana hacia diversos tejidos, los cuales en condiciones normales estarían libres de estas bacterias, mientras que la inflamación caracterizada por eosinofilia puede explicar la relación encontrada entre la privación de sueño y lesiones en la mucosa gástrica [153].

Nuestros datos muestran que la privación de sueño afecta de forma diferencial a las poblaciones celulares que participan en el desarrollo de la respuesta inmune o en el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal; y que tanto la PS como el estrés ejercen influencia sobre células epiteliales, las cuales detectan y responden a estímulos microbianos para reforzar la función de barrera y coordinar las respuestas inmunes apropiadas, incluyendo la tolerancia de la inmunidad; y por otro lado ambas condiciones también modulan el reclutamiento de poblaciones inmunológicas, encargadas de eliminar cualquier agente infeccioso, pero que también participan en el mantenimiento de la integridad de la barrera en la mucosa intestinal.

Este trabajo demuestra que la privación aguda de sueño modifica algunos componentes celulares de la respuesta inmune, y por el contrario, es probable que los retos inmunológicos modifiquen el patrón de sueño normal. En el tercer abordaje, nuestros resultados demuestran que la infección aumenta el porcentaje de sueño de ondas lentas a los 5 días posteriores a la inoculación. Estos hallazgos coinciden con las relaciones encontradas con los moduladores de procesos inflamatorios como las citocinas y la regulación de sueño, por lo cual es probable que la inflamación producida en respuesta a la infección por *Trichinella spiralis* y en consecuencia el aumento de la secreción de citocinas sea el mecanismo por el cual se induce un aumento en la cantidad de sueño de ondas lentas en las ratas infectadas.

Finalmente, nuestro estudio apoya la teoría de que el sueño desempeña un papel crítico en el mantenimiento del sistema inmune y en el desarrollo de la respuesta inmune, en este caso sobre la respuesta inmune temprana. Con base en nuestros resultados parece ser que la Privación del sueño podría mejorar la respuesta sistémica inmune contra *Trichinella spiralis*, ya que al aumentar el reclutamiento de células NK puede ser mejorada la respuesta de tipo celular contra parásitos intracelulares. Por otro lado, la PS reduce la respuesta inmune local causando una disminución en las células NK en MLN, además de que produce un proceso inflamatorio en la lámina propia y zona periglandular de la mucosa intestinal, caracterizado por el aumento de eosinófilos. Mientras que el estrés parece afectar la respuesta inmunitaria local, causando una perturbación en el reclutamiento de células NK y células B así como de células enteroendocrinas a nivel de vellosidades, las cuales pueden participar en el desarrollo de la adquisición de inmunidad contra los parásitos.

Nuestro estudio proporciona evidencia de cómo la falta de sueño modifica el comportamiento de las diferentes poblaciones de células a diferentes niveles de organización, lo que nos podrá evidenciar

posibles alteraciones en la homeostasis del sistema inmune y por lo saber si la privación de sueño condiciona a un incorrecto o insuficiente desarrollo de la respuesta inmune.

El estudio de los efectos de la privación del sueño no sólo nos ayuda a comprender el papel que el sueño puede tener en diferentes sistemas del organismo, sino que también nos da las herramientas para entender la relación entre estos sistemas, en particular, el sistema nervioso central y el sistema inmunológico, y las comunicación que mantiene el equilibrio. Es por ello que la comprensión de la interacción de estos sistemas requiere que en su estudio se incluya a todos los miembros de los sistemas participantes. Por lo tanto, no podemos estudiar el efecto de la privación del sueño en un sistema inmunológico que permanece estático, si no que, por el contrario el estudio necesita simular condiciones fisiológicamente relevantes, es decir, frente a un reto antigénico sin dejar de lado la interacción de otros sistemas que pueden responder al mismo estímulo.

Dada la complejidad del estudio de la interacciones entre el sistema inmunológico, con el sistema nervioso y endocrino, y a que los tres sistemas responden frente al mismo estímulo de forma diferente, el presente estudio es un esfuerzo por relacionar diferentes condiciones y tratamientos que modifican estas interacciones.

8. CONCLUSIONES

- La Privación de Sueño o la condición de estrés no causaron cambios en la concentración de corticosterona a nivel sistémico, mientras que de forma individual la infección si produjo un incremento significativo de esta hormona.
- El estrés y la PS afectan diferencialmente el comportamiento de las poblaciones celulares ya que existen poblaciones celulares que son mas susceptibles a una determinada condición dependiendo del tejido analizado. Cuando analizamos la interacción de ambas condiciones con la infección observamos que en el bazo (el cual refleja los efectos sistémicos) la infección es irrelevante, ya que la infección no causa un efecto diferencial o adicional sobre los cambios causados por la PS o el estrés.
- La Privación de sueño en bazo produjo una disminución de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), sí como un aumento en la proporción de células NK ($NK1.1^+$) y los linfocitos B ($CD45^+$). En GLM la privación de sueño solo causó el aumento en la población de células NK ($NK1.1^+$). En la mucosa intestinal se observó un aumento significativo en número de eosinófilos y de células cebadas en la zona periglandular, mientras que a nivel de vellosidades la PS solo produjo un aumento en el número de eosinófilos.
- La condición de estrés no produjo cambios en los porcentajes de las subpoblaciones para grupos no-infectados a nivel de bazo y GLM, mientras que en la mucosa intestinal en solo provoco un aumento significativo en el número de células caliciformes a nivel de vellosidades.
- Tanto la PS como el estrés causaron un aumento significativo en los linfocitos T totales ($CD3^+$) en bazo, mientras que en GLM ambas condiciones produjeron un incremento en la subpoblación de linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) y de linfocitos B ($CD45^+$). En la mucosa intestinal se observó un aumento en el número de eosinófilos del área periglandular y de células caliciformes glandulares, además de una aumento en el número de células enteroendocrinas en vellosidades. El aumento en el número de eosinófilos observado en la condición de PS fue significativamente mayor al observado en la condición estrés
- Para la condición de PS en los grupos infectados, únicamente se observó un aumento en el porcentaje en las células NK ($NK1.1^+$) de bazo. En la mucosa intestinal la infección en la condición de PS provocó un aumento significativo en el número de eosinófilos, y una disminución las células cebadas en las vellosidades, a nivel glandular se observó un aumento en el número de células enteroendocrinas

- En la condición de estrés de los grupos infectados se observó una disminución en la población de linfocitos B (CD45⁺) de GLM. La condición de estrés para los grupos infectados únicamente produjo una disminución significativa de las células enteroendocrinas a nivel de vellosidades.
- En los grupos sometidos a estrés o a PS que después fueron infectados se observó que ambas condiciones producen un aumento en el porcentaje de linfocitos B (CD45⁺) de bazo, mientras que en GLM produjeron un aumento en los linfocitos T cooperadores (CD3⁺CD4⁺) y una disminución de las células NK (NK1.1⁺). En este caso no se observaron efectos en las poblaciones de la mucosa intestinal que fueran provocados por ambas condiciones.
- Cuando abordamos la cuestión de cómo los retos inmunológicos modifican el patrón de sueño, nuestros resultados demuestran que la infección por *Trichinella spiralis* aumenta el porcentaje de sueño de ondas lentas a los 5 días posteriores a la inoculación.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Krueger, M.H., Roth, T., Demet,W.C., *Principles and Practice of Sleep Medicine*. 4ta ed. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. 1552.
2. Siegel, J.M., *Clues to the functions of mammalian sleep*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1264-71.
3. Tudor, M., L. Tudor, and K.I. Tudor, [*Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography*]. Acta Med Croatica, 2005. **59**(4): p. 307-13.
4. Emmanuel, M., *Why we sleep: The temporal organization of recovery*. Plos Biology, 2008. **6**(4): p. 661-669.
5. Ayala Guerrero Fructuoso, M.G., *Filogenia del sueño: de invertebrados a vertebrados*. Revista Médica de la Universidad Veracruzana, 2008. **8**(1): p. 37-45.
6. Berry, R., *Fundamentals of Sleep Medicine*. 2012, Philadelphia, PA. 670.
7. Moctezuma, J.M.M.y.J.V., *Interacción Neuroinmunoendocrina*. 1ra ed. 2010, México, D.F.: UNAM-PUIS.
8. Pace-Schott, E.F. and J.A. Hobson, *The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(8): p. 591-605.
9. Timo-laria, C., et al., *Phases and states of sleep in the rat*. Physiol Behav, 1970. **5**(9): p. 1057-62.
10. Mistlberger, R.E., *Circadian regulation of sleep in mammals: role of the suprachiasmatic nucleus*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **49**(3): p. 429-54.
11. Colavito, V., et al., *Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents*. Front Syst Neurosci, 2013. **7**: p. 106.
12. Bergmann, B.M., et al., *NREM sleep with low-voltage EEG in the rat*. Sleep, 1987. **10**(1): p. 1-11.
13. Rich, R.R., *Clinical immunology : principles and practice*. 4th ed. 2013, St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier. XXVII, 1295 p.
14. Jouvett, M. and F. Michel, [*Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat*]. C R Seances Soc Biol Fil, 1959. **153**(3): p. 422-5.
15. Mignot, E., *Why we sleep: the temporal organization of recovery*. PLoS Biol, 2008. **6**(4): p. e106.
16. Siegel, J., *Principles and pactice of sleep medicine*. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. 120-136.
17. Saper, C.B., T.E. Scammell, and J. Lu, *Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1257-63.
18. Lu, J., et al., *A putative flip-flop switch for control of REM sleep*. Nature, 2006. **441**(7093): p. 589-94.
19. Rechtschaffen, A., *Current perspectives on the function of sleep*. Perspect Biol Med, 1998. **41**(3): p. 359-90.
20. Benington, J.H. and H.C. Heller, *Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep*. Prog Neurobiol, 1995. **45**(4): p. 347-60.
21. Parmeggiani, P.L., *Thermoregulation and sleep*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s557-67.
22. Karni, A., et al., *Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill*. Science, 1994. **265**(5172): p. 679-82.
23. Stickgold, R. and M.P. Walker, *Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep?* Trends Neurosci, 2005. **28**(8): p. 408-15.
24. Born, J., B. Rasch, and S. Gais, *Sleep to remember*. Neuroscientist, 2006. **12**(5): p. 410-24.
25. Orzel-Gryglewska, J., *Consequences of sleep deprivation*. Int J Occup Med Environ Health, 2010. **23**(1): p. 95-114.
26. Rechtschaffen, A. and B.M. Bergmann, *Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper*. Sleep, 2002. **25**(1): p. 18-24.
27. Drummond, S.P. and G.G. Brown, *The effects of total sleep deprivation on cerebral responses to cognitive performance*. Neuropsychopharmacology, 2001. **25**(5 Suppl): p. S68-73.

28. Colten, H.R. and B.M. Altevogt, in *Sleep Disorders and Sleep Deprivation: An Unmet Public Health Problem*, H.R. Colten and B.M. Altevogt, Editors. 2006: Washington (DC).
29. Berczi, I., *The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **851**: p. 3-12.
30. Velazquez-Moctezuma, J., J.A. Rojas Zamorano, and E. Esqueda León, *Influencia de la respuesta de estrés sobre el patrón de sueño*. Revista Medica de la Universidad Veracruzana, 2008. **8**(1): p. 19-23.
31. Machado, R.B., S. Tufik, and D. Suchecki, *Role of corticosterone on sleep homeostasis induced by REM sleep deprivation in rats*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63520.
32. Vazquez-Palacios, G. and J. Velazquez-Moctezuma, *Effect of electric foot shocks, immobilization, and corticosterone administration on the sleep-wake pattern in the rat*. Physiol Behav, 2000. **71**(1-2): p. 23-8.
33. Rampin, C., et al., *Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat*. Neurosci Lett, 1991. **126**(2): p. 113-8.
34. Dinges, D.F., et al., *Sleep deprivation and human immune function*. Adv Neuroimmunol, 1995. **5**(2): p. 97-110.
35. Moldofsky, H., *Sleep and the immune system*. Int J Immunopharmacol, 1995. **17**(8): p. 649-54.
36. Lange, T., et al., *Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination*. Psychosom Med, 2003. **65**(5): p. 831-5.
37. Mackiewicz, M., et al., *Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep*. Physiol Genomics, 2007. **31**(3): p. 441-57.
38. Dustin, M.L. and D.R. Colman, *Neural and immunological synaptic relations*. Science, 2002. **298**(5594): p. 785-9.
39. Besedovsky, L., T. Lange, and J. Born, *Sleep and immune function*. Pflugers Arch, 2012. **463**(1): p. 121-37.
40. Born, J., et al., *Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4454-64.
41. Dimitrov, S., et al., *Number and function of circulating human antigen presenting cells regulated by sleep*. Sleep, 2007. **30**(4): p. 401-11.
42. Lange, T., S. Dimitrov, and J. Born, *Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1193**: p. 48-59.
43. Preston, B.T., et al., *Parasite resistance and the adaptive significance of sleep*. BMC Evol Biol, 2009. **9**: p. 7.
44. Palmblad, J., et al., *Stressor exposure and immunological response in man: interferon-producing capacity and phagocytosis*. J Psychosom Res, 1976. **20**(3): p. 193-9.
45. Palmblad, J., et al., *Lymphocyte and granulocyte reactions during sleep deprivation*. Psychosom Med, 1979. **41**(4): p. 273-8.
46. Moldofsky, H., et al., *Effects of sleep deprivation on human immune functions*. FASEB J, 1989. **3**(8): p. 1972-7.
47. Dinges, D.F., et al., *Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 1930-9.
48. Zager, A., et al., *Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(1): p. R504-9.
49. Yehuda, S., et al., *REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(7): p. 393-8.
50. Krueger, J.M., et al., *The role of cytokines in physiological sleep regulation*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **933**: p. 211-21.
51. Opp, M.R., *Cytokines and sleep*. Sleep Med Rev, 2005. **9**(5): p. 355-64.
52. Krueger, J.M., et al., *Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1)*. Am J Physiol, 1984. **246**(6 Pt 2): p. R994-9.

53. Imeri, L., M. Mancina, and M.R. Opp, *Blockade of 5-hydroxytryptamine (serotonin)-2 receptors alters interleukin-1-induced changes in rat sleep*. Neuroscience, 1999. **92**(2): p. 745-9.
54. Farrar, W.L., et al., *Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain*. J Immunol, 1987. **139**(2): p. 459-63.
55. Breder, C.D., C.A. Dinarello, and C.B. Saper, *Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus*. Science, 1988. **240**(4850): p. 321-4.
56. Marz, P., et al., *Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3251-6.
57. Ignatowski, T.A., et al., *Neuronal-associated tumor necrosis factor (TNF alpha): its role in noradrenergic functioning and modification of its expression following antidepressant drug administration*. J Neuroimmunol, 1997. **79**(1): p. 84-90.
58. Ban, E.M., *Interleukin-1 receptors in the brain: characterization by quantitative in situ autoradiography*. Immunomethods, 1994. **5**(1): p. 31-40.
59. Bette, M., et al., *Constitutive expression of p55TNFR mRNA and mitogen-specific up-regulation of TNF alpha and p75TNFR mRNA in mouse brain*. J Comp Neurol, 2003. **465**(3): p. 417-30.
60. Olivadoti, M.D. and M.R. Opp, *Effects of i.c.v. administration of interleukin-1 on sleep and body temperature of interleukin-6-deficient mice*. Neuroscience, 2008. **153**(1): p. 338-48.
61. Opp, M.R., F. Obal, Jr., and J.M. Krueger, *Interleukin 1 alters rat sleep: temporal and dose-related effects*. Am J Physiol, 1991. **260**(1 Pt 2): p. R52-8.
62. Lancel, M., et al., *Effect of interleukin-1 beta on EEG power density during sleep depends on circadian phase*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 2): p. R830-7.
63. Takahashi, S. and J.M. Krueger, *Inhibition of tumor necrosis factor prevents warming-induced sleep responses in rabbits*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. R1325-9.
64. Baracchi, F. and M.R. Opp, *Sleep-wake behavior and responses to sleep deprivation of mice lacking both interleukin-1 beta receptor 1 and tumor necrosis factor-alpha receptor 1*. Brain Behav Immun, 2008. **22**(6): p. 982-93.
65. Imeri, L. and M.R. Opp, *How (and why) the immune system makes us sleep*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(3): p. 199-210.
66. Dale, R.C., et al., *Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity*. Brain, 2004. **127**(Pt 1): p. 21-33.
67. Ravenholt, R.T. and W.H. Foegen, *1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism*. Lancet, 1982. **2**(8303): p. 860-4.
68. Darko, D.F., et al., *Fatigue, sleep disturbance, disability, and indices of progression of HIV infection*. Am J Psychiatry, 1992. **149**(4): p. 514-20.
69. Franck, L.S., et al., *Sleep disturbances in children with human immunodeficiency virus infection*. Pediatrics, 1999. **104**(5): p. e62.
70. Kubicki, S., et al., *[Polygraphic sleep data in AIDS patients]*. EEG EMG Z Elektroenzephalogr Elektromyogr Verwandte Geb, 1989. **20**(4): p. 288-94.
71. Darko, D.F., M.M. Mitler, and J.L. White, *Sleep disturbance in early HIV infection*. Focus, 1995. **10**(11): p. 5-6.
72. Prospero-Garcia, O., et al., *Sleep patterns are disturbed in cats infected with feline immunodeficiency virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12947-51.
73. Shapiro, J.S., *Does varicella-zoster virus infection of the peripheral ganglia cause Chronic Fatigue Syndrome?* Med Hypotheses, 2009. **73**(5): p. 728-34.
74. Raison, C.L., et al., *Chronic interferon-alpha administration disrupts sleep continuity and depth in patients with hepatitis C: association with fatigue, motor slowing, and increased evening cortisol*. Biol Psychiatry, 2010. **68**(10): p. 942-9.

75. Krueger, J.M., J.R. Pappenheimer, and M.L. Karnovsky, *Sleep-promoting effects of muramyl peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(19): p. 6102-6.
76. Krueger, J.M., et al., *Enhancement of slow-wave sleep by endotoxin and lipid A*. Am J Physiol, 1986. **251**(3 Pt 2): p. R591-7.
77. Van Cauter, E., R. Leproult, and L. Plat, *Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men*. JAMA, 2000. **284**(7): p. 861-8.
78. Ramm, P. and C.T. Smith, *Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat*. Physiol Behav, 1990. **48**(5): p. 749-53.
79. Kristensson, K., et al., *African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions*. Prog Neurobiol, 2010. **91**(2): p. 152-71.
80. Lange, T., et al., *Shift of monocyte function toward cellular immunity during sleep*. Arch Intern Med, 2006. **166**(16): p. 1695-700.
81. Dupouy-Camet, J., *Trichinellosis: a worldwide zoonosis*. Vet Parasitol, 2000. **93**(3-4): p. 191-200.
82. Bruschi, F. and K.D. Murrell, *New aspects of human trichinellosis: the impact of new Trichinella species*. Postgrad Med J, 2002. **78**(915): p. 15-22.
83. Dickson Despommier, a.V.R.R. <http://www.trichinella.org/>. 2015 [cited 2015].
84. Chávez Guajardo Elsa G, S.E.S., Muñoz Escobedo José J, and M.G.M. Al, *Trichinellosis una zoonosis vigente*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET, 2006. **VII**(5).
85. Katz, M., D.D. Despommier, and R.W. Gwadz, *Parasitic diseases*. 2nd ed. 1989, New York: Springer-Verlag. xii, 301 p.
86. Mitreva, M. and D.P. Jasmer, *Biology and genome of Trichinella spiralis*. WormBook, 2006: p. 1-21.
87. Elsa Gabriela Chávez Guajardo, S.S.E., José Jesús Muñoz Escobedo, María Alejandra Moreno García REDVET Revista electrónica de veterinaria, in *Trichinellosis una zoonosis vigente 1995*, Veterinaria Organización (Veterinaria.org): Málaga.
88. Khan, W.I., *Physiological changes in the gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse-Trichinella spiralis model*. Parasitology, 2008. **135**(6): p. 671-82.
89. Knight, P.A., J.K. Brown, and A.D. Pemberton, *Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult Trichinella spiralis*. Parasitology, 2008. **135**(6): p. 655-70.
90. Schmitt, N., et al., *Sylvatic trichinosis in British Columbia: potential threat to human health from an independent cycle*. Public Health Rep, 1978. **93**(2): p. 189-93.
91. Kefenie, H. and G. Bero, *Trichinosis from wild boar meat in Gojjam, north-west Ethiopia*. Trop Geogr Med, 1992. **44**(3): p. 278-80.
92. Pennock, J.L. and R.K. Grencis, *The mast cell and gut nematodes: damage and defence*. Chem Immunol Allergy, 2006. **90**: p. 128-40.
93. Finkelman, F.D., et al., *Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites*. Immunol Rev, 2004. **201**: p. 139-55.
94. Wang, M.L., et al., *Regulation of RELM/FIZZ isoform expression by Cdx2 in response to innate and adaptive immune stimulation in the intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(5): p. G1074-83.
95. Knight, P.A., et al., *Expression profiling reveals novel innate and inflammatory responses in the jejunal epithelial compartment during infection with Trichinella spiralis*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 6076-86.
96. Murray, M., W.F. Jarrett, and F.W. Jennings, *Mast cells and macromolecular leak in intestinal immunological reactions. The influence of sex of rats infected with Nippostrongylus brasiliensis*. Immunology, 1971. **21**(1): p. 17-31.
97. Madden, K.B., et al., *Enteric nematodes induce stereotypic STAT6-dependent alterations in intestinal epithelial cell function*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5616-21.

98. Beiting, D.P., et al., *Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage Trichinella spiralis*. Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3129-37.
99. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular : 6a edición*. 6a ed. 2012, Buenos Aires: Médica Panamericana. XVIII, 974 p.
100. Komuro, T. and Y. Hashimoto, *Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa)*. Arch Histol Cytol, 1990. **53**(1): p. 1-21.
101. Tortora, G.J. and M.T. Nielsen, *Principles of human anatomy*. 12th ed. 2012, Hoboken, N.J.: John Wiley. xxvi, 957, 66 p.
102. Specian, R.D. and M.G. Oliver, *Functional biology of intestinal goblet cells*. Am J Physiol, 1991. **260**(2 Pt 1): p. C183-93.
103. Fawcett, D.W. and W. Bloom, *Tratado de histología*. 2ª ed. 1995, Madrid: Interamericana/McGraw-Hill. XXII, 1044 p.
104. Ross, M.H., G.I. Kaye, and W. Pawlina, *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular*. 4ª ed. 2005, México, D.F. etc.: Médica Panamericana. XVI, 864 p.
105. Ferrufino Juan C, T.L., and Angeles Gladis, *Histología normal del intestino delgado*. Revista Medica Herediana, 1996. **7**(1): p. 46-57.
106. Antoni, L., et al., *Intestinal barrier in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(5): p. 1165-79.
107. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141-53.
108. Gallo, R.L. and L.V. Hooper, *Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 503-16.
109. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(5): p. 319-30.
110. Hurrell, J.M., R.M. Genta, and S.D. Melton, *Histopathologic diagnosis of eosinophilic conditions in the gastrointestinal tract*. Adv Anat Pathol, 2011. **18**(5): p. 335-48.
111. Rothenberg, M.E., et al., *Gastrointestinal eosinophils in health and disease*. Adv Immunol, 2001. **78**: p. 291-328.
112. Wernersson, S. and G. Pejler, *Mast cell secretory granules: armed for battle*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(7): p. 478-94.
113. Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai, *Mast cells in the development of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 135-42.
114. Foger, N., et al., *Differential regulation of mast cell degranulation versus cytokine secretion by the actin regulatory proteins Coronin1a and Coronin1b*. J Exp Med, 2011. **208**(9): p. 1777-87.
115. He, S. and A.F. Walls, *Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(7): p. 1491-500.
116. Ohtsu, H., *Pathophysiologic role of histamine: evidence clarified by histidine decarboxylase gene knockout mice*. Int Arch Allergy Immunol, 2012. **158 Suppl 1**: p. 2-6.
117. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1237-44.
118. Reizis, B., *Intracellular pathogens and CD8(+) dendritic cells: dangerous liaisons*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 153-5.
119. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
120. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
121. Schraml, B.U. and C. Reis e Sousa, *Defining dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 13-20.

122. Bieber, K. and S.E. Autenrieth, *Insights how monocytes and dendritic cells contribute and regulate immune defense against microbial pathogens*. Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 215-26.
123. Kushwah, R. and J. Hu, *Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells*. Cell Biosci, 2011. **1**(1): p. 20.
124. Liu, Y.J., *Uncover the mystery of plasmacytoid dendritic cell precursors or type 1 interferon producing cells by serendipity*. Hum Immunol, 2002. **63**(12): p. 1067-71.
125. Hammer, G.E. and A. Ma, *Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 743-91.
126. Merzel, J. and C.P. Leblond, *Origin and renewal of goblet cells in the epithelium of the mouse small intestine*. Am J Anat, 1969. **124**(3): p. 281-305.
127. Fenzl, T., et al., *Fully automated sleep deprivation in mice as a tool in sleep research*. J Neurosci Methods, 2007. **166**(2): p. 229-35.
128. Kim, J.J. and W.I. Khan, *Goblet cells and mucins: role in innate defense in enteric infections*. Pathogens, 2013. **2**(1): p. 55-70.
129. Hasnain, S.Z., et al., *A new role for mucins in immunity: insights from gastrointestinal nematode infection*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(2): p. 364-74.
130. Bruno, L.S., et al., *Two-hybrid analysis of human salivary mucin MUC7 interactions*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1746**(1): p. 65-72.
131. Shekels, L.L., et al., *Coordinated Muc2 and Muc3 mucin gene expression in Trichinella spiralis infection in wild-type and cytokine-deficient mice*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(8): p. 1757-64.
132. Chang, S.K., et al., *Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer*. Gastroenterology, 1994. **107**(1): p. 28-36.
133. Corfield, A.P., et al., *Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease*. Gut, 2000. **47**(4): p. 589-94.
134. Snippert, H.J., et al., *Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells*. Cell, 2010. **143**(1): p. 134-44.
135. Engelstoft, M.S., et al., *Enteroendocrine cell types revisited*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(6): p. 912-21.
136. Harrison, E., S. Lal, and J.T. McLaughlin, *Enteroendocrine cells in gastrointestinal pathophysiology*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(6): p. 941-5.
137. Worthington, J.J., et al., *Adaptive immunity alters distinct host feeding pathways during nematode induced inflammation, a novel mechanism in parasite expulsion*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003122.
138. Shanahan, M.T., I.M. Carroll, and A.S. Gulati, *Critical design aspects involved in the study of Paneth cells and the intestinal microbiota*. Gut Microbes, 2014. **5**(2): p. 208-14.
139. Cohen, H.B. and W.C. Dement, *Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase*. Science, 1965. **150**(701): p. 1318-9.
140. Jouvet, D., et al., *[Study of Selective Deprivation of the Paradoxal Sleep Phase in the Cat.]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1964. **158**: p. 756-9.
141. Velazquez-Moctezuma, J., et al., *Differential effects of rapid eye movement sleep deprivation and immobilization stress on blood lymphocyte subsets in rats*. Neuroimmunomodulation, 2004. **11**(4): p. 261-7.
142. Costa, P.B., et al., *A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e116020.
143. Malik, S.W. and J. Kaplan, *Sleep deprivation*. Prim Care, 2005. **32**(2): p. 475-90.
144. Hublin, C., et al., *Insufficient sleep--a population-based study in adults*. Sleep, 2001. **24**(4): p. 392-400.
145. Leger, D. and P. Ogrizek, *Review on sleep and awakening disorders*. Rev Med Interne, 2012. **33**(9): p. 525-31.

146. Van Dongen, H.P., et al., *The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation*. Sleep, 2003. **26**(2): p. 117-26.
147. Goel, N., et al., *Neurocognitive consequences of sleep deprivation*. Semin Neurol, 2009. **29**(4): p. 320-39.
148. Banks, S. and D.F. Dinges, *Behavioral and physiological consequences of sleep restriction*. J Clin Sleep Med, 2007. **3**(5): p. 519-28.
149. Spiegel, K., J.F. Sheridan, and E. Van Cauter, *Effect of sleep deprivation on response to immunization*. JAMA, 2002. **288**(12): p. 1471-2.
150. Suchecki, D., et al., *Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation*. J Sleep Res, 1998. **7**(4): p. 276-81.
151. Ramaswamy, K., D. Negrao-Correa, and R. Bell, *Local intestinal immune responses to infections with Trichinella spiralis. Real-time, continuous assay of cytokines in the intestinal (afferent) and efferent thoracic duct lymph of rats*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4328-37.
152. Everson, C.A. and L.A. Toth, *Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(4): p. R905-16.
153. Guo, J.S., et al., *Partial sleep deprivation compromises gastric mucosal integrity in rats*. Life Sci, 2005. **77**(2): p. 220-9.

APÉNDICE 1: PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO

Research Paper

Sleep Deprivation Induces Changes in Immunity in *Trichinella spiralis*-Infected Rats

Elizabeth G. Ibarra-Coronado¹, Javier Velazquez-Moctezuma², Daniel Diaz³, Luis Enrique Becerril-Villanueva⁴, Lenin Pavón⁴ and Jorge Morales-Montor¹✉

1. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México D.F. 04510, México.
2. Area de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico, DF, México.
3. Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
4. Departamento de Psicoinmunología, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente," Mexico City, Mexico.

✉ Corresponding author: Dr. Jorge Morales Montor. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 70228, México DF 04510, México. E-mail: jmontor66@biomedicas.unam.mx, jmontor66@hotmail.com

© 2015 Ivyspring International Publisher. Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited. See <http://ivyspring.com/terms> for terms and conditions.

Received: 2015.02.16; Accepted: 2015.05.10; Published: 2015.06.06

Abstract

Sleep is considered an important predictor of immunity. A lack of sleep may reduce immunity, which increases susceptibility to any type of infection. Moreover, sleep deprivation in humans produces changes in both, the percent of circulating immune cells (T cells and NK cells) and cytokine levels (IL-1, IFN γ , TNF- α , IL-6 and IL-17). The aim of our study was to investigate whether sleep deprivation produces deregulation on immune variables during the immune response generated against the helminth parasite *Trichinella spiralis*. Because sleep deprivation is stressful *per se*, we designed another experiments to compared stress alone (consisting in movement restriction and single housing) with sleep deprivation, in both control (uninfected) and experimental (infected) rats. Our results demonstrate that the sleep deprivation and stress have a differential effect in mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen. In uninfected rats sleep deprivation alone produces an increase in natural killer cells (NK+) and B cells (CD45+), accompanied by a decrease in cytotoxic T cells (CD3+CD8+) in spleen; while, in MLN, produces only an increase in natural killer cells (NK+). Both, SD and stress, produce an increased percentage of total T cells (CD3+) in spleen. In the MLN both are also associated to an increase in cytotoxic T cells (CD3+CD8+) and B cells (CD45+). In the spleens of parasitized rats, cell populations did not change. In spleens of both, sleep-deprived and stressed infected rats, we observed an increase in B cells (CD45+). In infected rats, sleep deprivation alone produced an increase in NK cells (NK+). In mesenteric node cell populations of parasitized rats, we observed a decrease in NK cells and an increase in T helper (CD4+) cells in both SD and stressed rats. Rats that were only subjected to stress showed a decrease in B cells (CD45+). These findings suggest that the immune response generated against infection caused by *T. spiralis* is affected when the sleep pattern is disrupted. These results support the notion that sleep is a fundamental process for an adequate and strong immune response generated against this parasite.

Key words: sleep deprivation, immune response, parasite, *Trichinella spiralis*

Introduction

Despite that sleep function is still not fully understood, there are some functions that seem to be associated to sleep. One of them is the regulation of the immune system and the immune response [1-3].

There are several explanations for the greater susceptibility to infections after reduced sleep, such as impaired mitogenic proliferation of lymphocytes, decreased HLA-DR expression, low antigen uptake,

decreased phagocytosis, deficient antibody responses, upregulation of CD14⁺ cells, and variations in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, which have been observed with partial and total sleep deprivation [3-7].

Some authors propose that sleep participates in the immunological memory consolidation process, [8, 9], in which the information is transferred from a short-term to long-term storage and recall phase and participates in the recruitment of antigen-presenting cells to helper T cells [10, 11].

Moreover, there are supporting evidences that circulating immune cells and cytokine levels are subject to sleep regulation because their highest systemic levels are reached during sleep, depending on the cell population and interleukin type [12-14]. Populations of cells, such as neutrophils, monocytes and NK cells, are present at their lowest levels in the blood during sleep, but the opposite behaviour is observed in B cells, cytotoxic T cells and helper T cells, which reach their highest levels during sleep [12]. On the other hand, rapid eye movement (REM) sleep deprivation, decreases the percent of certain cell populations, such as neutrophils, monocytes and NK cells [12, 15, 16], while total sleep deprivation causes a significant increase in the levels of cytotoxic and helper T lymphocytes [14]. Sleep modulation of immune cell function is demonstrated when sleep deprivation reduces significantly those cytokines produced by specific cell populations, such as T cells, monocytes and dendritic cells (e.g., IL-2, IL-6, IL-1b, IFN γ and TNF- α) [12, 14]. Other studies conducted in rats that were selectively deprived of REM sleep for a period of 72 h, reported an increase in the plasma levels of IL-1 α , IL1- β , IL-6, IL-10, TNF- α and IL-17 [17]. These findings suggest that REM sleep deprivation involves changes in the modulation of the immune system and may increase some inflammatory processes.

Despite the fact that sleep and immunity have been extensively studied, little is known of how sleep modulates the immune response. On this respect, subjects who regularly slept the night after vaccination against hepatitis A in the morning before, increase in antigen-specific antibody titers after 4 weeks later. This effect was confirmed using repeated inoculations with both hepatitis A and B antigens, and it was shown that the effect of nocturnal sleep is on doubling of the number of circulating antigen-specific Th cells against hepatitis A and B, as well as boosting the production of specific antibodies. [3, 18].

However, nothing is known about the effect of sleep deprivation on the development of the immune response against a parasitic infection; particularly, in those parasites that induces gastrointestinal infections, that affects around 70% of the world population. Nematodes from the *Trichinella* genus, such as

Trichinella spiralis, the causal agent of porcine and human trichinellosis, are highly evolved parasites that have developed diverse mechanisms for survival within the host that facilitate colonisation. *Trichinella spiralis* is an intracellular parasitic nematode that invades mammalian striated muscles and it is responsible for trichinellosis, a zoonosis caused by the consumption of raw or undercooked meat from infected animals (e.g., pork) [19, 20]. The parasite's life cycle includes an infective local phase and a systemic phase. The infection begins with ingestion of contaminated meat muscle larvae to subsequently colonise the small intestine, where they invade the mucosa anchoring to epithelium cells layer. The larvae mature into adults, and once established, females and males copulate, and the females can produce 500-1500 neonate larvae (immature or larvae L1). Newly hatched larvae are able to cross the intestinal epithelium and enter systemic circulation, which results in systemic infection. These larvae are widely distributed in the tissues through the circulation and are eventually established in muscle fibres. Once in muscle fibres, they form the nursing cell and become infectious [20]. *Trichinella spiralis* infection, in the acute or local phases, causes an enteropathy characterised by hyperplasia of goblet cells, a significant decrease in mucin expression and inflammatory infiltrates in the intestinal lamina [21]. At this stage of infection, there is an intestinal inflammatory process, in which various types of cell populations, including lymphocytes, mast cells and eosinophils, are recruited to the intestinal lamina and lymphatic nodes [22]. The active inflammation in the intestinal mucosa is a Th2 type immune response, suggesting the importance of Th2 cells in protective immunity against this parasite [21, 22]. The acuteness of the symptoms, and the response generated during the enteric phase, can range from imperceptible, to symptoms such as diarrhoea, prostration and malaise, depending on the parasite load with which the host is infected [23, 24].

Sleep deprivation is a stressful condition, independently of the partial sleep deprivation method used. In different animal preparations, various strategies have been developed to reduce the stress component and isolate the lack of sleep (slow-wave sleep or REM sleep or both of them) [25, 26]. Although modifications have been introduced, aimed to reduce the stress component as some indicators are increased, such as corticotrophin releasing hormone (CRH), adenocorticotrophic hormone (ACTH), and corticosterone serum levels, adrenal weight of all them indicating a general increase in the activation of the hypothalamic-pituitary-suprarenal axis, There is still controversy about the subject, even more if the immune response is assessed, given the marked effect

of stress on the immune system, mainly the effects produced by cortisol (corticosterone in rats). To distinguish the effects of sleep deprivation, a set of different controls of deprivation techniques has been used, in which the environmental stimuli that can cause stress remain but without inducing sleep deprivation [25, 27].

The assessment of the influence of sleep on the development of the immune response involves not only a study of stress as an inherent component of this condition, but also involves a study of the type of response that develops as the immune system responds against infection with a bacteria, virus or parasites. To our knowledge, no data have been published indicating whether sleep is able to affect intestinal immune responses to gastrointestinal worm infection. Thus, the aim of our study was to analyse the effects of sleep deprivation on duodenal *T. spiralis* colonisation and the systemic percentage of immune cells involved in its control.

Materials and Methods

Ethics Statement

Animal care and experimentation practices at the Instituto de Investigaciones Biomédicas and the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) are constantly evaluated by their respective Animal Care and Use Committees, with adherence to official Mexican regulations (NOM-062-ZOO-1999). Mexican regulations are in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institute of Health (NIH) of the USA to ensure compliance with the established international regulations and guidelines. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the UAM-Iztapalapa. We anesthetized the animals with CO₂ and euthanized them by decapitation. Efforts were made to minimise suffering.

Animals and experimental groups

Male Wistar rats from different cohorts of our colony (200 g weight) were used. All animal groups were singly housed to avoid the risk of infection between groups. The animal room was at a controlled temperature (22-24°C) and 12-hour light-dark conditions (lights on at 0700 h). The diet consisted of Purina rat chow and sterilised water *ad libitum*.

The animals were divided into the following groups of 7 animals each: 1) uninfected non-sleep-deprived sleep sufficient (intact control), 2) uninfected non-sleep deprived in large platforms and isolated (stress control), 3) uninfected sleep-deprived (SD), 4) infected sleep-sufficient, 5) infected stressed, and 6) infected SD.

Infection

Trichinella spiralis (ISS 406) has been maintained in our laboratory by serial passage infections in BALB/c mice or Wistar rats. Infective-stage muscular larvae (ML) were recovered from experimentally infected rats at 30 days post infection. Muscles were digested using a standard pepsin-hydrochloric acid digestion method [28]. The muscles of the hind limbs and diaphragm of rats were minced into small pieces. The minced muscle tissues were digested and mixed on magnetic stir plates at 37°C for 3 h in 0.1% pepsin in 0.1% HCl solution, to retain undigested remains, the samples were sieve into conical tubes. Following another 20 min settling, the sediment containing larvae was washed repeatedly for three additional periods of 20 min in tap water, until the supernatant was clear as water as described in Kapel and Gamble, 2000 [28]

Larvae were recovered and counted under a stereoscopic microscope 40× magnification to verify for feasibility (motility and kinking) and the average concentration of the number of larvae per 100µl was obtained and adjusted for the inoculation.

Twenty-four hours after the start of sleep deprivation, the infected groups were parasitized. We inserted a gastric catheter and injected 1500 muscular larvae of *Trichinella spiralis* suspended in 500 µl of PBS1x solution directly into the upper part of the stomach. The sleep deprivation procedure continues for forty-eight hours. 72 hours after the start of sleep deprivation (forty-eight hours post-infection) rats were killed by decapitation and adult worms were recovered from the small intestine. The small intestine was dissected, cut longitudinally, and washed twice in 1X PBS. The intestine was then cut into small pieces and incubated in sterile 1X PBS for 3 hours at 37°C. Following incubation, the parasites sedimented parasite were collected, washed in PBS1X and counted under a stereoscopic microscope.

Sleep deprivation

Sleep deprivation was induced using the island technique, which consists on placing rats in rectangular cages with a small central platform (4.5 cm diameter and 5 cm high) surrounded by water at a level of 2.0 to 2.5 cm from the bottom of the cage, with the water in the cage changed daily as described in Velazquez-Moctezúma, 2004 [29]. With the occurrence of muscle atonia on REM sleep stage, the animal falls into the water and wake up [25]. In accordance with Machado, et al 2005, this method resulted in total sleep REM abolition during the hold deprivation period and slow wave sleep (SWS) loss across 4 deprivation days (-31%) [30]. In order to reduce the stress caused by movement restriction, wetness, and muscle

fatigue, the water level was decrease as necessary to cause minimum arousal, allowing the rats to move within the cage. We add a group who were in similar conditions of isolation and the stress, but in longer platforms (10 cm diameter) to allow animals to sleep.

The experimental protocol for the infected groups included an initial 24 h of sleep deprivation or stress, after which the groups were infected with 1500 muscular larvae (ML) of *Trichinella spiralis*. The stress or deprivation procedure continued for an additional 48 hrs.

Corticosterone serum levels

Trunk blood was obtained by decapitation and it was collected in sterile tubes. Two hours after vials were centrifuged at 2300 rpm at 4°C for 20 minutes, and serum was collected and frozen at -80°C for further analysis. Corticosterone concentration was determined using a radioimmunoassay kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA). The Coat-A-Count Rat Corticosterone method is a solid-phase 125I-radioimmunoassay, the detection limit of which is 5.7 ng/mL. The samples (50 µL) were assayed in duplicate following the manufacturer's instructions.

Flow Cytometry

Briefly, cells from the spleen or lymph nodes were purified and stained with the following antibodies: anti-rat-CD3-Alexa 647, anti-rat CD4-PE-Cy5, anti-rat CD8-PE, anti-rat CD45RA-PE and anti-rat NK1.1-APC (Biolegend). Cells were fixed with 500 µl of fixation buffer (4% paraformaldehyde, 1X PBS, pH 7.4). Samples were analysed by flow cytometry using a FACSCalibur (BD Biosciences), and the data were analysed with FlowJo® software.

Statistical analysis and data processing

Results were determined in 2 independent experiments. Dependent variables included the number of parasites, serum corticosterone levels, percent of CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, and NK cells in the mesenteric lymph nodes and spleen. The independent variable was sleep at three levels: deprivation or stress or sleep sufficient and infection at two levels: infected or non-infected. Data from 2 replicates (n=5 or 4) of each experimental group were expressed as an average ± standard error and analysed by means of a two way-ANOVA being a study comprising condition and treatment with Bonferroni as a post hoc test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Data were analysed using PRISM GraphPad software.

A multiple correspondence analysis (MCA) was applied to determine the complex pattern of association between the differential effect of REM sleep dep-

riation or stress induction, on the percentage of change (increase, decrease or no change) of the immune cell populations (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD45+ and NK1.1+) in the spleens or mesenteric lymph nodes (MLN) of non-infected and *Trichinella spiralis* infected rats.

MCA is a multivariate data analytic technique that provides a simple and exhaustive analysis that allows for a detailed description of the data. This analysis incorporates a bidimensional graphical output that displays clouds of points representing the categorised variables [31]. The pattern of correspondence (strength of association) between the variables is interpreted in terms of the relative position (distance) of their points along the two dimensions: dim 1 and dim 2 (factors of variance) defined by the analysis; hence, the closer of the points are represented in space. Each dimension (dim1 or dim2) can explain the pattern of association, and is represented as percentage.

Analysis was performed using Statistical Analysis Software (SAS 9.0, SAS Institute, Cary, NC, USA), and graphs were constructed with Prism 6.0 (GraphPad, Inc.).

Results

There is not significant difference in the number of adult worms that were recovered from the small intestine of infected groups. The control infected group shown an average of 1180 ± 137.12 muscular larvae, the mean for stressed-infected group was 1301 ± 145.89 muscular larvae and for the deprived-infected group was 1175 ± 148.13 muscular larvae. When we analysed the intestine of the non-infected groups, we corroborated that no parasites were found. In the sleep deprived group and the stress group do not have significant changes in serum corticosterone concentration. However we found a significant increase produced by the infection, that is not seen in animals that were sleep deprived or stressed (Fig 1).

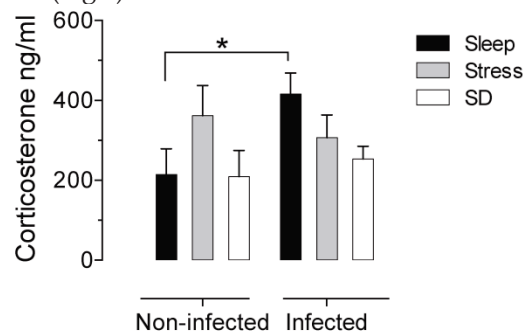


Figure 1. Serum corticosterone concentrations in uninfected (left block) and infected (right blocks) groups in the sleep-sufficient (open bars), stress (shaded bars) and sleep deprivation (SD) (solid bars) conditions. A multiple Student's t test was used to compare statistical significance between the groups. (* $p < 0.05$).

Sleep deprivation and stress modify immune cell populations differentially in non-infected rats. Two-way ANOVA analysis and Bonferroni post-test showed the differences statistically significant ($p < 0.05$). Parasitic infection can enhanced these changes.

T-cells: For the total population of T cells in the mesenteric lymph nodes (MLN), sleep deprivation caused a decrease of 29% compared to the stress group ($p < 0.05$). In spleen, both sleep deprivation and stress caused an increase of 26 and 47% ($p < 0.05$) in this population (Fig. 2A and 2C). Parasitic infection caused a significant decrease (27% in the MLN and 23% in the spleen) ($p < 0.05$) in T cell population, only in stressed animals (Fig. 2B and 2D).

A decrease in the spleen T cell population was also observed as a result of infection in SD and sleep-sufficient groups, 15% and 6% respectively, although these values were not statistically significant (Fig 2B and 2D).

The proportions of the T cell subpopulations were analysed from the total population of T cells (CD3+). The proportions of T helper cells (CD3+, CD4+) and cytotoxic T cells (CD3+, CD8+) are shown in panels (Fig 3 and 4). For the T helper cell population (CD4+), in infected rats we observed in the MLN an increase of 23 and 31% ($p < 0.05$) for the SD and stress conditions, respectively (Fig. 3A and 3B). In spleens of infected animals, stress condition caused

also an increase of 19% in CD4+ lymphocytes ($p < 0.05$).

Furthermore, the CD4+ T cell subpopulation in the MLN showed a decrease 24% ($p < 0.05$) in the control infected group, and there was a 10% increase in T helper cells in the animals subjected to SD that were subsequently infected, but this result was not statistically significant (Fig. 3B).

In the spleen, the infection caused a 10% increase in T helper cells ($p < 0.05$) in the stressed animals. However, in this tissue no changes were observed in the control infected group and SD parasitized animals, (Fig 3D).

SD and stress caused the same increase in the cytotoxic T cell subpopulation (CD8+): a significant increase 28 and 32.5% ($p < 0.05$) in the MLN of SD and stress groups (Fig. 4A); and only a significant decrease of 16% in the spleen of the SD group ($p < 0.05$) (Fig. 4C).

In the infected SD animals, there was a significant decrease of 19% in cytotoxic T cells in spleen compared to the stressed animals ($p < 0.05$) (Fig. 4C). In MLN both groups, SD and stressed animals, the infection resulted in a significant decrease in cytotoxic T cells (32% for SD and 25% for stressed animals) (Fig. 4B), but in the spleen, the infection did not affect the cytotoxic T cell subpopulation (Fig. 4D).

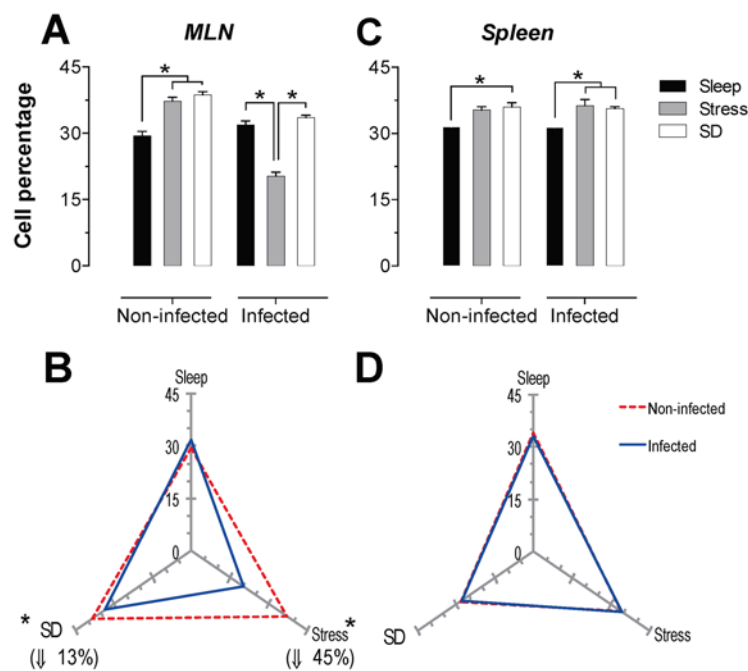


Figure 2. Total T cell (CD3+) percentages in the mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen. Sleep-sufficient (open bars), stress (shaded bars) and sleep deprivation (SD) (solid bars) conditions in the MLN (A) and spleen (C) are classified in infected and uninfected groups. Panels B and D show the differential effect of infection in the three study conditions: sleep-sufficient, stress and SD in the MLN (B) and spleen (D). The dashed red line represents the percentage of T cells (CD3+) in uninfected groups; the solid blue line represents the percentage of T cells in the infected groups. * $p < 0.05$ indicates significant differences between the infected vs. uninfected groups. In the uninfected groups, the percentage of T cells decreased in the SD condition compared to the condition of stress in the MLN, whereas in the spleen, SD and stress induced an increase compared to the sleep-sufficient condition. The infection induced a significant decrease only in the stress condition in the MLN, whereas in the spleen, a significant decrease was observed in both the stress condition and the SD and sleep-sufficient conditions. Experimental group were shown as an average \pm standard error and analysed by means of a two way-ANOVA and Bonferroni as a post hoc test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

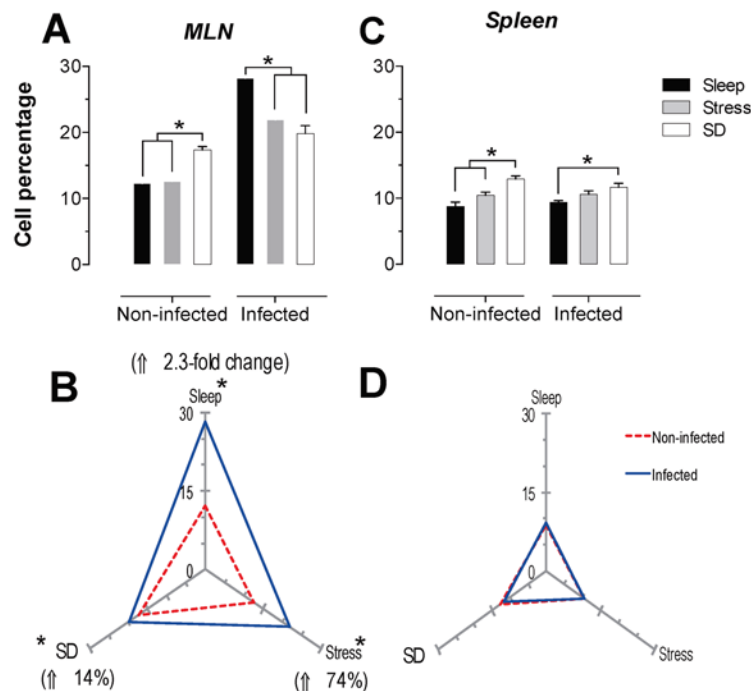


Figure 3. Helper T cells (CD3+CD4+) in the mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen. Sleep-sufficient (open bars), stress (shaded bars) and sleep deprivation (SD) (solid bars) conditions in the MLN (A) and spleen (C) were measured in infected and uninfected groups. Panels B and D show the differential effect of infection in the three study conditions: sleep sufficiency, stress and SD in the MLN (B) and spleen (D). The dashed red line represents the percentage of T cells (CD3+) in the uninfected groups; the solid blue line represents the percentage of T cells in the infected groups. *p<0.05%; the percentage of change with respect to the uninfected group is shown. In infected groups, the SD and stress conditions increased the percentage of helper T cells compared to the condition of sleep sufficiency in the MLN, whereas in the spleen, only stress induced an increase compared to the sleep-sufficient condition. The infection induced a significant decrease in the sleep-sufficient condition and an increase in the SD condition in the MLN, whereas in the spleen, a significant increase was only observed in the stress condition. Experimental group were shown as an average ± standard error and analysed by means of a two way-ANOVA and Bonferroni as a post hoc test. Differences were considered significant when p< 0.05.

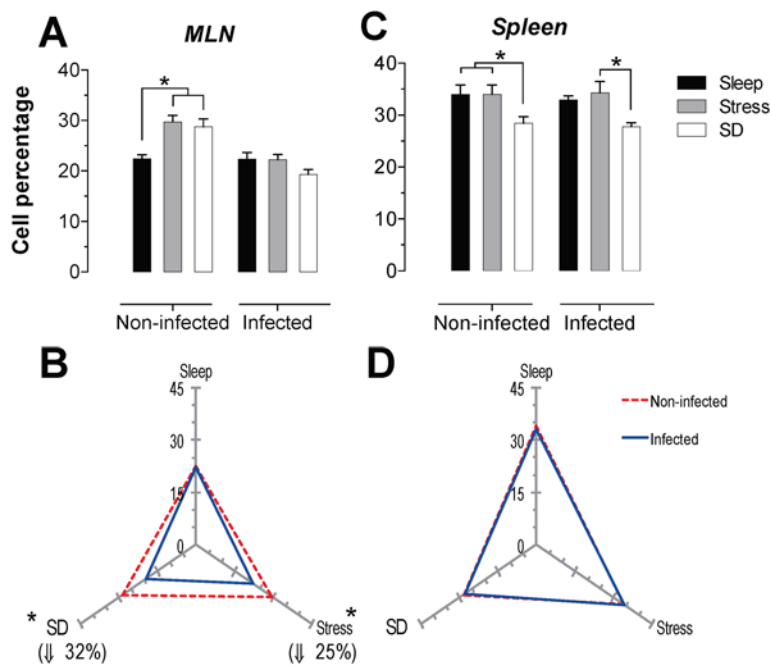


Figure 4. Percentage of cytotoxic T cells (CD3+CD8+) in mesenteric lymph nodes (MLN) (A) and spleen (C) for the sleep-sufficient (open bars), stress (shaded bars) and REM sleep deprivation (SD) (solid bars) conditions in infected groups and uninfected groups *p<0.05%. The differential effect of infection in the three study conditions, sleep-sufficient, stress and SD, is shown in MLN (B) and spleen (D). The dashed red line represents the percentage of T cells (CD3+) in uninfected groups; the solid blue line represents the percentage of T cells in the infected groups. *p<0.05%; the percent change with respect to uninfected is shown. In uninfected groups, the SD and stress conditions increased the percentage of cytotoxic T cells compared to the sleep-sufficiency condition in MLN, whereas in the spleen, SD induced a decrease compared to the sleep-sufficiency and stress conditions; however, in the infected group, the SD decreasing condition was only different during stress. The infection induced a significant decrease in SD and stress conditions and in MLN, whereas in the spleen, the infection appeared to be irrelevant. Experimental group were shown as an average ± standard error and analysed by means of a two way-ANOVA and Bonferroni as a post hoc test. Differences were considered significant when p< 0.05.

B-cells

The B cells percentage in MLN presented a significant increase ($p < 0.05$) in the stress and SD conditions of 26 and 31%, in uninfected animals. In the infected rats, only the stressed animals had a significant decrease in CD45+ cells about 36% ($p < 0.05$) compared to the sleep-sufficient and SD conditions of infected groups (Fig. 5A). In the spleen of uninfected rats, the SD condition resulted in an increase of 14% that was significant. The infection in the MLN caused a significant decrease, 13% ($p < 0.05$) for the SD condition, while for the stress condition there was a 45% decrease (Fig. 5B). In the case of spleen, the infection did not cause changes (Fig. 5C), showing that the infection does not appear to alter the modulation exerted by stress and sleep deprivation (Fig. 5D).

NK-cells

The spleen NK cells showed a significant increase in the SD condition in the infected and uninfected animals about 24 and 46% respectively (Fig. 6C). In the MLN, in the uninfected groups the SD condition produced a significant increase of 41% ($p < 0.05$), while in the infected groups, the stress and SD condition caused a significant decrease 24 and 31% ($p < 0.05$), compared to the sleep sufficient group. The control infected group experienced a significant in-

crease ($p < 0.05$) of 2.3-fold, while the stress and SD conditions caused an increase ($p < 0.05$) of 74% and 14%, respectively (Fig. 6B).

In order to analyse the response of each type of cell population as a function SD and stress conditions in infected and uninfected animals, a correspondence analysis of each tissue, the spleen and MLN, were designed. Multiple correspondence analyses is used to determine the complex pattern of association between a condition and treatment. We applied MCA to determine the differential effect of sleep deprivation or stress (conditions), upon infected or no-infected groups (treatment). This analysis shows the changes associated strongly to a condition detriment. This association is represented by the distance between groups, the strength association between variables is interpreted in terms of the relative positions (distance), of the points of the two dimensions (Dim1 and Dim2). Each dimension can explain the association and is represented as percentage (Fig. 7). For the spleen and MLN, multiple correspondence analysis (MCA) showed the formation of three discrete groups defined by the change (increase, decrease or no change) in the percentage of each cell sub population. However, these groups varied in their composition, suggesting a differential effect provoked by the treatments (SD or stress induction).

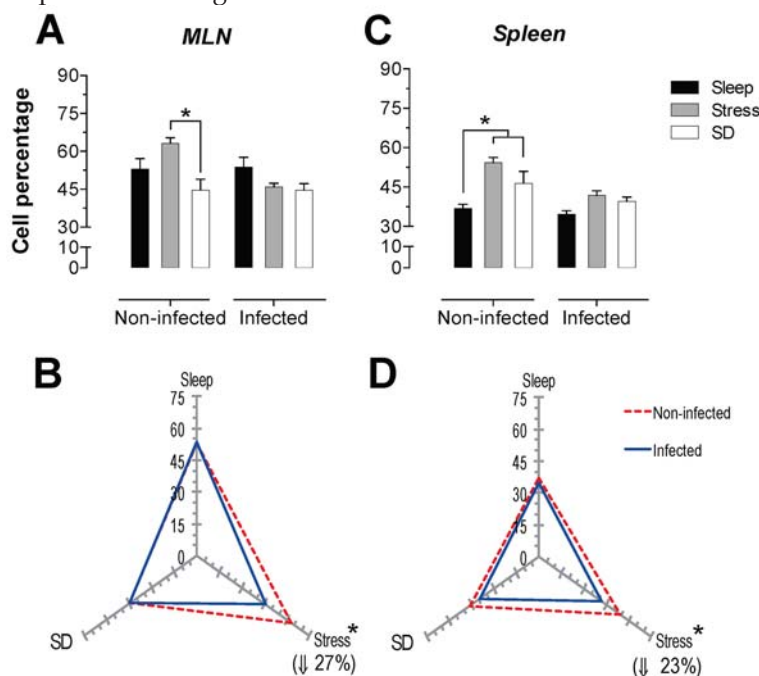


Figure 5. Percentage of B cells (CD19+) in the mesenteric lymph nodes (MLN) (A) and spleen (C) for the sleep-sufficient (open bars), stress (shaded bars) and sleep deprivation (SD) (solid bars) conditions in infected groups and uninfected groups * $p < 0.05$ %. In panels B and D, the differential effect of infection in the three study conditions, sleep-sufficient, stress and SD, in MLN (B) and spleen (D) is shown. The dashed red line represents the percentage of T cells (CD3+) in the uninfected groups; the solid blue line represents the percentage of T cells in the infected groups. * $p < 0.05$ %, the percentage of change with respect to the uninfected group is shown. In the uninfected groups, the SD and stress conditions increased the percentage of B cells compared to the sleep-sufficient condition in the MLN, whereas in the spleen, REMSD induced a decrease compared only to the sleep-sufficient condition. When the animals were infected, in the MLN, only the stress condition produced a significant decrease, but in the spleen, REMSD and stress, induced a significant increase. The infection induced a significant decrease in the SD and stress conditions and in the MLN, whereas in the spleen the infection appeared to be irrelevant. Experimental group were shown as an average \pm standard error and analysed by means of a two way-ANOVA and Bonferroni as a post hoc test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

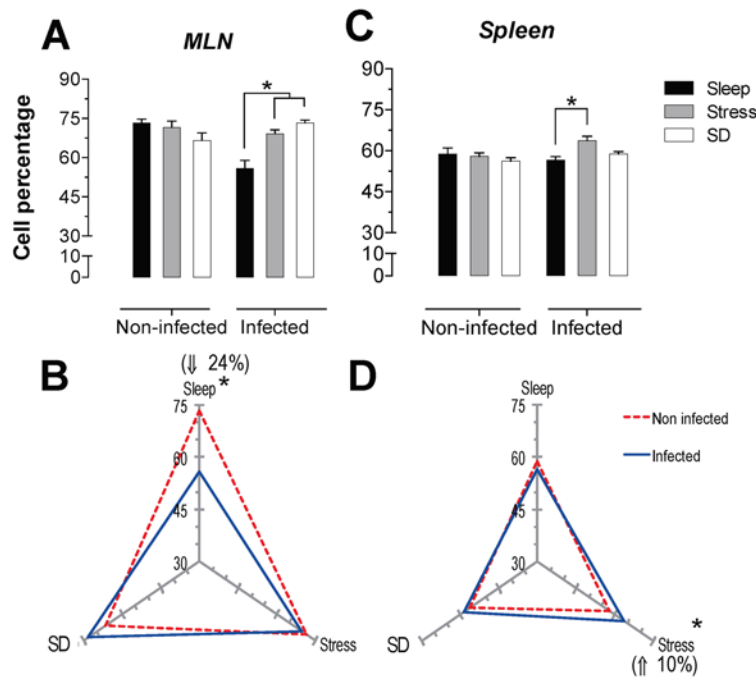


Figure 6. Percentage of natural killer cells (NK1.1+) in the mesenteric lymph nodes (MLN) (A) and spleen (C) for the sleep-sufficient (open bars), stress (shaded bars) and REM sleep deprivation (SD) (solid bars) conditions in the infected groups and uninfected groups *p<0.05. Panels B and D show the differential effect of infection in the three study conditions, sleep sufficiency, stress and SD, in the MLN (B) and spleen (D). The dashed red line represents the percentage of T cells (CD3+) in the uninfected groups; the solid blue line represents the percentage of T cells in the infected groups. *p<0.05; the per cent change with respect to the uninfected group is shown. In uninfected groups, the SD and stress conditions increased the percentage of NK cells compared to the condition of sleep-sufficiency and stress in the MLN, whereas in the spleen, SD induced an increase compared to both the sleep-sufficient and stress conditions. When the animals were infected, the SD and stress conditions produced a significant decrease in the MLN, but in the spleen, the SD condition induced a significant increase compared to the sleep-sufficient condition. The infection induced a significant increase in the three conditions, and when the animal had sufficient sleep, the infection produced the greatest difference in the MLN, whereas in the spleen, the infection appeared to be irrelevant.

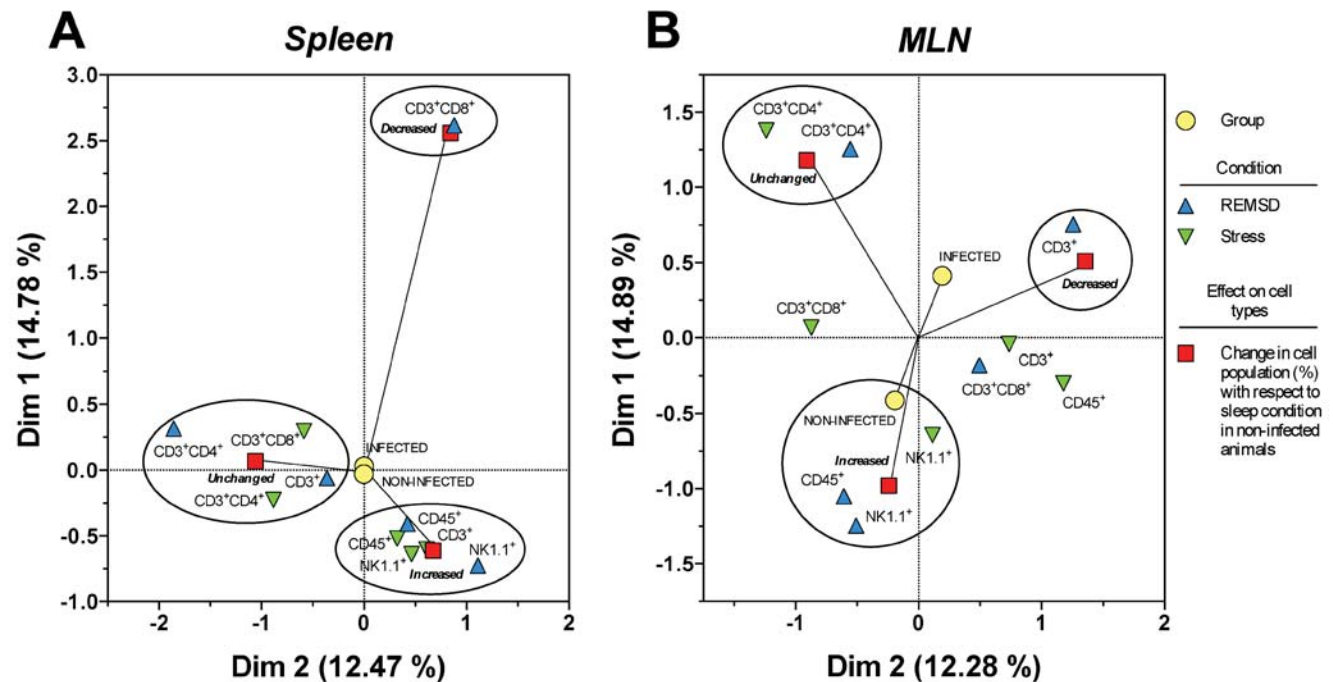


Figure 7. Multiple correspondence analysis of the association pattern between the differential changes in the percentages of circulating immune cell populations and REM sleep (REMSD) deprivation or stress induction in the (A) mesenteric lymph nodes (MLN) and (B) spleen from uninfected rats or rats infected with *Trichinella spiralis*. The strength of the association between variables can easily be interpreted in relation to the distance separating two adjacent points: the lesser the distance, the greater the association between categories (differential change, cell type, condition and group). The strength association between variables is interpreted in terms of the relative positions (distance), of the points of the two dimensions (Dim1 and Dim2). Each dimension explain the behavior for each cell population analysed, and associates the response to treatment and condition type, this explain is represented as percentage.

Particularly for the spleen (Fig. 7B), NK1.1⁺ and CD45⁺ cells were associated to an increase in both conditions, whereas CD3⁺CD4⁺ cells were associated with an unchanged response in the SD or stress conditions. Notably, only the CD3⁺CD8⁺ cells corresponded with a decreased response in the sleep deprivation condition. Therefore, the most notable response imposed by sleep deprivation or differentially maintaining or increasing specific circulating immune cell types represented stress induction on the cell populations. Neither the infected nor the uninfected conditions had an association with a particular response; as a consequence, the observed effect on the percentage of the cell populations depended solely on the sleep deprivation or stress conditions for the spleen (Fig. 7B).

MCA for the mesenteric lymphatic nodes showed that unlike the spleen (Fig. 7A), the infection with *Trichinella spiralis* in conjunction with the differential change in the cell populations contributed to the formation of the three groups of responses depicted in Figure 7A. Although the groups were dissimilar in the cells they included, as with the spleen, in the MLN from the SD group, there was an increase in NK1.1⁺ and CD45⁺ cells. This increase was associated with the uninfected condition. Consistently, the CD3⁺CD4⁺ cells remained unchanged. There was a group of cells consisting of CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ and CD45⁺ cells that showed an undefined clear pattern of association between an increase or a decrease in their population percentage, suggesting that the sleep-sufficient condition or the infection produced a varied response in these cells types (Fig. 7A).

Discussion

Deprivation consists in sleep loss either in a complete lack of sleep during a certain period of time or a optimal sleep time shorter, like to total sleep deprivation, chronic sleep restriction or sleep disruption [32]. Contemporary lifestyle, work-related factors and clinical disorders, insomnia particularly is the most common causes of sleep deprivation; thus the condition affects a considerable number of people [32]. The overall prevalence of insufficient sleep in adults has been estimated at 20% [33] and furthermore insomnia is the most prevalent sleep disorders and affects severely 10% of adults worldwide [34]. A chronic reduction in the sleep time or the fragmentation of sleep, leading to the comparable to those of severe acute sleep deprivation; this referring particularly to the cognitive functions, attention and operant memory [35-37].

Although recent research on the effects of sleep deprivation, restriction and disruption on physiological functions in healthy adults, on metabolism, en-

docrine function and interesting on immune functions [6, 13, 37], has been carried out, so far this is the first study exploring the effect of sleep deprivation on the immune response against a gastrointestinal parasite.

In this study, we addressed the influence of sleep deprivation on the behaviour of different cell populations at different levels of organisation, which result in an alteration in the homeostasis of the immune system and therefore lead to an incorrect or poorly mounted immune response. Previous findings have shown that the effectors of the immune response, such as dendritic cells and modulators such as IFN- γ and IL-12, which are essential for strengthening the immune response, are under circadian and sleep regulation, and therefore their behaviour can be susceptible to the effects of sleep deprivation [12]. The effects of sleep deprivation on the development of the immune response, and particularly on the acquisition of immunity have been poorly explored. Our study provides evidence of how sleep deprivation modifies the behaviour of different cell populations at different levels of organisation. Our results provide insight into the mechanisms by which sleep deprivation alters the acquisition of immunity, as is the case for the decrease in the generation of antibodies against Hepatitis A vaccine and influenza [18].

A study of the effects of sleep deprivation not only gives us knowledge of the role that sleep may have on different systems in the organism, but it also gives us tools to understand the relationship between different systems, in particular the CNS and immune system, which maintains balance. Understanding the interaction of these systems requires that we include all members of the participating systems. Thus, we cannot study the effect of sleep deprivation on an immune system that remains static, so we demonstrated the effect on physiologically relevant conditions, that is, reacting against an antigenic challenge and interacting with other systems. Despite our extensive work studying sleep deprivation and the immune response, in the context of an antigenic challenge, we must also take into account the influence of infection on other systems. We found that conditions of stress or SD not presented changes, but infection caused an increase in the concentration of corticosterone, we can infer that the infection caused by *Trichinella spiralis* is more stressful than the other conditions.

It has been proposed that it is during sleep that different cell subpopulations are recruited into the lymphoid organs, and at the same time sleep is a pro-inflammatory physiological state [11], when we considerate that during night sleep there is an increased production of inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha

(TNF- α), interleukin-12 (IL-12) [13]. Additionally occurs an increased hormone secretion such as growth hormone (GH), prolactin, melatonin and leptin that acts on the immune system by immune cell activation signals support, proliferation, differentiation and the production of the same pro-inflammatory cytokines [11]. Furthermore, it has been shown that sleep deprivation has a differential effect on the different components of the immune system; in particular, it can increase the concentration of NK cells and cytotoxic T cells, as well as pro-inflammatory mediators, such as IL-1 β , TNF- α and IFN γ [16]. However, little is known about how sleep deprivation can alter the immune response generated in earlier periods of infection. In this respect, it has been shown that sleep deprivation decreases the generation of antibodies to vaccines against hepatitis A [3], so sleep deprivation indicates the importance of the participation of sleep when an innate immune response and then an adaptive immune response are mounted.

Our findings show that acute sleep deprivation modifies immune cell percentage, and thus, it is logical to propose that immune challenges may alter the normal sleep pattern. The cerebral mechanisms that regulate sleep have reciprocal influences on the endocrine and immune systems. Acute and chronic sleep deprivation modifies the immune response, and conversely, immunological challenges modify the normal sleep pattern. They may be able to modify certain behaviours to facilitate infection and complete their life cycles [38]. However, this field still remains poorly studied, and consequently the function of sleep in the immune response to pathogens beginning to be understood.

A wide variety of research has addressed the importance of sleep for the functioning of the immune system. In 2009, Preston and colleagues analysed the possibility that sleep has evolved across species to allow the organism special protection against parasitic infections. These authors also analysed the correlation between sleep duration and parasitic infection levels as an indicator of the number and type of parasites that are able to infect twelve mammalian species. In this case, a negative correlation was found, with a longer duration of sleep significantly correlating with a lower level of parasitic infection. Thus, the authors conclude that sleep evolved to protect animals from parasitic infections [39].

In this aspect our work addressed the effect of sleep deprivation on the proportion of immune cells in the spleen and MLN at baseline (non-infection) and during a parasitic infection. To this end, the parasite *Trichinella spiralis* provided a suitable model of infection to evaluate the immune response that is generated in a short period of infection. Our study evalu-

ated the effect of sleep deprivation on the behaviour of cells in different compartments, analysing changes in the spleen and MLN, which represent different levels of organisation (or participation) when an immune response is mounted. The changes observed in the MLN give us the first evidence of the importance of sleep on cell recruitment into the peripheral lymph during the innate immune response. Furthermore, the analysis conducted in the spleen cell populations, presents an overview that suggests that sleep deprivation modifies the behaviour of cells at the systemic level in basal conditions as well as during infection.

The controls used showed that stress and SD might differentially affect the behaviour of immune cells. Although SD can be classified as a form of stress, it is mainly characterised by the absence of this essential physiological process, so these stimuli differ in the effects they cause. In this respect, our results showed that in the spleen (reflects systemic effects), the infection status is irrelevant because the infection does not cause a differential effect on the changes observed, that are caused by sleep deprivation or stress, so that the two stimuli produce different responses. Our correspondence analysis revealed that some cell populations respond similarly, but others do not share the same behaviour. Overall, both stress and SD are associated with an increase in the populations of B cells (CD45+) and NK cells (NK1.1+) in the spleen, and stress is also associated with increased total T cells (CD3+), but in contrast, the SD condition is associated with a decrease in the cytotoxic T cell subpopulation (CD8+CD3+). These results are in agreement with those from Velazquez-Moctezuma, 2003, which reported similar changes with different stressors, and therefore, we can postulate that the overall response of the cell subpopulations depends on the immune system nature of the stressor.

When the effects of the infection were analysed, we observed that infection is not able to produce additional changes to those generated by stress or SD in spleen because the infection does not determine the conformation of the groups in MCA analysis (Fig 7A). The increase in B (CD45+) cells and NK (NK1.1+) cells relate more to sleep deprivation and stress whilst decrease in cytotoxic T cell is clearly related to SD.

In MLN the infection contributes to the formation of groups characterized by the type of response (increase, decrease or no change). In non-infected groups the stress and SD condition are related to increase of NK cells, but the SD also is related to increase of B (CD45+) cells. In infected groups, the SD is strongly related to decreased of total T (CD3+) cells. So deprivation or stress differential effects on cell populations analyzed in presence and absence of infection.

The response that is mounted against this parasite in the MLN is characterised by increased NK cells (NK1.1+) and decreased T helper cells; we observed that the stress condition and SD both affected the response of both subpopulations, because the increase in NK cells (NK1.1+) and decrease in T helper (CD4+CD3+) cells observed during infection was abolished in both conditions. In the case of the spleen, infection don't caused changes in addition to those generated by the SD and stress conditions in the subpopulations studied.

Our work also evidenced that the behavior of cell subpopulations depend on the location of the cells and the type of stimulus; in our case we observed that sleep deprivation modify the behavior of cytotoxic T cells (CD3+CD8+), B cells (CD3+CD8+) and NK cells (NK+) in the spleen, while in MLN only population NK cells responded to sleep deprivation, whereas the observed changes in the cytotoxic T cells (CD3+CD8+) and B cells (CD45+) were caused by deprivation as stress.

Conclusion

There is no difference in parasite loads when rats were sleep deprived or stressed compared to the control group. However, regarding different immune cell subpopulations in spleen or mesenteric lymphatic nodes, there were several changes. The sleep deprivation (SD) in the spleen of non-infected rats produces an increase in natural killer cells (NK+) and B cells (CD45+), and a decrease in cytotoxic T cells (CD3+CD8+), while in the spleens of infected rats, the sleep deprivation alone produced an increase in NK cells (NK+), when is compared to the infected control. On the other hand, the sleep deprivation in the MLNs of non-infected rats produces only an increase in natural killer cells (NK+), while in infected rats there is no change when compared to infected control. Only the MLNs of rats infected that were subjected to stress showed a increase in T helper cells (CD3+CD4+) compared with infected control, Furthermore, both SD and stress, in spleen of non-infected rats, produce an increased percentage of total T cells (CD3+). In infected rats, we observed an increase in B cells (CD45+) versus infected group SD and stress, in MLN both presented an increase in cytotoxic T cells (CD8+) and B cells (CD45+). In infected rats, we observed a decrease in NK (NK+) cells and an increase in T helper (CD4+) cells. As for the correlation of all factors interacting together in the spleen, we observed that in infected or non-infected groups, a decrease in cytotoxic T cells (CD3+CD8+), was strongly associated with sleep deprivation. Both conditions, SD and stress, were associated to increase in NK cells (NK1.1+) and B cells (CD45+), but an additional increase in total T cells

(CD3+) associated to stress alone. On the other hand, the correlation of all factors in the MLNs, showed that the SD and stress in non-infected groups affect the same cells populations, producing different effects. The response associated to SD was an increase of B cells (CD45+) and NK cells (NK1.1+), while the response to stress is associated to a decrease in NK cells (NK1.1+). In infected groups, both condition had different effects. The SD was associated to increase in total T cells (CD3+), but stress has not association to changes in this parameter.

Our study support the theory that sleep plays a critical role in the immune system maintenance and in the development of the immune response, on this case on the early immune response. Sleep deprivation can improves the immune systemic response against *T. spiralis*, since increasing the recruitment of NK cells can be enhanced cell type response against intracellular parasites. However the SD reduces the local immune response causing a decrease in NK cells in MLN. Stress, on another hand does not improves the systemic immune response, and reduces the local immune response causing a disturbance in the recruitment of NK cells and B cells, involved in the development of the acquisition of immunity against parasites.

Acknowledgements

Financial support: Grant #176803 was obtained from Programa de Fondos Sectoriales CB-SEP, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Grant IN208715 from Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México both to J. Morales-Montor. Elizabeth G Ibarra-Coronado is a Ph.D. student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, account number 99158819, and had a doctoral scholarship from CONACyT, CVU 288056.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Moldofsky H. Sleep and the immune system. *Int J Immunopharmacol.* 1995; 17: 649-54.
2. Dinges DF, Douglas SD, Hamarman S, et al. Sleep deprivation and human immune function. *Adv Neuroimmunol.* 1995; 5: 97-110.
3. Lange T, Perras B, Fehm HL, et al. Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosom Med.* 2003; 65: 831-5.
4. Casey FB, Eisenberg J, Peterson D, et al. Altered antigen uptake and distribution due to exposure to extreme environmental temperatures or sleep deprivation. *J Reticuloendothel Soc.* 1974; 15: 87-95.
5. Palmblad J, Cantell K, Strander H, et al. Stressor exposure and immunological response in man: interferon-producing capacity and phagocytosis. *J Psychosom Res.* 1976; 20: 193-9.
6. Spiegel K, Sheridan JF and Van Cauter E. Effect of sleep deprivation on response to immunization. *JAMA.* 2002; 288: 1471-2.

7. Dinges DF, Douglas SD, Zaugg L, et al. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1930-9.
8. Benington JH and Heller HC. Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol.* 1995; 45: 347-60.
9. Mackiewicz M, Shockley KR, Romer MA, et al. Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiol Genomics.* 2007; 31: 441-57.
10. Dustin ML and Colman DR. Neural and immunological synaptic relations. *Science.* 2002; 298: 785-9.
11. Besedovsky L, Lange T and Born J. Sleep and immune function. *Pflugers Arch.* 2012; 463: 121-37.
12. Dimitrov S, Lange T, Nohroudi K, et al. Number and function of circulating human antigen presenting cells regulated by sleep. *Sleep.* 2007; 30: 401-11.
13. Lange T, Dimitrov S and Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1193: 48-59.
14. Born J, Lange T, Hansen K, et al. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol.* 1997; 158: 4454-64.
15. Irwin M, Mascovich A, Gillin JC, et al. Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosom Med.* 1994; 56: 493-8.
16. Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, et al. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293: R504-9.
17. Yehuda S, Sredni B, Carasso RL, et al. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29: 393-8.
18. Lange T, Dimitrov S, Bollinger T, et al. Sleep after vaccination boosts immunological memory. *J Immunol.* 2011; 187: 283-90.
19. Bruschi F and Murrell KD. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad Med J.* 2002; 78: 15-22.
20. Dupouy-Camet J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 191-200.
21. Khan WI. Physiological changes in the gastrointestinal tract and host protective immunity: learning from the mouse-*Trichinella spiralis* model. *Parasitology.* 2008; 135: 671-82.
22. Knight PA, Brown JK and Pemberton AD. Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 2008; 135: 655-70.
23. Kefenie H and Bero G. Trichinosis from wild boar meat in Gojjam, north-west Ethiopia. *Trop Geogr Med.* 1992; 44: 278-80.
24. Schmitt N, Saville JM, Greenway JA, et al. Sylvatic trichinosis in British Columbia: potential threat to human health from an independent cycle. *Public Health Rep.* 1978; 93: 189-93.
25. Suchecki D and Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav.* 2000; 68: 309-16.
26. Palma BD, Tiba PA, Machado RB, et al. [Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor]. *Rev Bras Psiquiatr.* 2007; 29 Suppl 1: S33-8.
27. Fenzl T, Romanowski CP, Flachskamm C, et al. Fully automated sleep deprivation in mice as a tool in sleep research. *J Neurosci Methods.* 2007; 166: 229-35.
28. Kapel CM and Gamble HR. Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int J Parasitol.* 2000; 30: 215-21.
29. Velazquez-Moctezuma J, Dominguez-Salazar E, Cortes-Barberena E, et al. Differential effects of rapid eye movement sleep deprivation and immobilization stress on blood lymphocyte subsets in rats. *Neuroimmunomodulation.* 2004; 11: 261-7.
30. Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res.* 2004; 1004: 45-51.
31. Costa PB, Granada CE, Ambrosini A, et al. A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. *PLoS One.* 2014; 9: e116020.
32. Malik SW and Kaplan J. Sleep deprivation. *Prim Care.* 2005; 32: 475-90.
33. Hublin C, Kaprio J, Partinen M, et al. Insufficient sleep--a population-based study in adults. *Sleep.* 2001; 24: 392-400.
34. Leger D and Ogrizek P. Review on sleep and awakening disorders. *Rev Med Interne.* 2012; 33: 525-31.
35. Van Dongen HP, Maislin G, Mullington JM, et al. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep.* 2003; 26: 117-26.
36. Goel N, Rao H, Durmer JS, et al. Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Semin Neurol.* 2009; 29: 320-39.
37. Banks S and Dinges DF. Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *J Clin Sleep Med.* 2007; 3: 519-28.
38. Donovick PJ and Burreight RG. The consequences of parasitic infection for the behavior of the mammalian host. *Environmental Health Perspectives.* 1987; 73: 247-50.
39. Preston BT, Capellini I, McNamara P, et al. Parasite resistance and the adaptive significance of sleep. *BMC Evolutionary Biology.* 2009; 9: 7.

Review Article

The Bidirectional Relationship between Sleep and Immunity against Infections

**Elizabeth G. Ibarra-Coronado,¹ Ana Ma. Pantaleón-Martínez,¹
Javier Velazquez-Moctezuma,² Oscar Prospéro-García,³ Mónica Méndez-Díaz,³
Mayra Pérez-Tapia,^{4,5} Lenin Pavón,⁶ and Jorge Morales-Montor¹**

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, 04510M México, DF, Mexico

²Area de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco No. 186, Col Vicentina, Iztapalapa, 09340 Mexico City, DF, Mexico

³Grupo de Neurociencias, Laboratorio de Canabinoides, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico

⁴Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, 11340M México, DF, Mexico

⁵Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, 11340M México, DF, Mexico

⁶Laboratorio de Psicoinmunología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, 14370M México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Jorge Morales-Montor; jmontor66@biomedicas.unam.mx

Received 3 October 2014; Accepted 24 December 2014

Academic Editor: Muhammad Atif Zahoor

Copyright © 2015 Elizabeth G. Ibarra-Coronado et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sleep is considered an important modulator of the immune response. Thus, a lack of sleep can weaken immunity, increasing organism susceptibility to infection. For instance, shorter sleep durations are associated with a rise in suffering from the common cold. The function of sleep in altering immune responses must be determined to understand how sleep deprivation increases the susceptibility to viral, bacterial, and parasitic infections. There are several explanations for greater susceptibility to infections after reduced sleep, such as impaired mitogenic proliferation of lymphocytes, decreased HLA-DR expression, the upregulation of CD14+, and variations in CD4+ and CD8+ T lymphocytes, which have been observed during partial sleep deprivation. Also, steroid hormones, in addition to regulating sexual behavior, influence sleep. Thus, we hypothesize that sleep and the immune-endocrine system have a bidirectional relationship in governing various physiological processes, including immunity to infections. This review discusses the evidence on the bidirectional effects of the immune response against viral, bacterial, and parasitic infections on sleep patterns and how the lack of sleep affects the immune response against such agents. Because sleep is essential in the maintenance of homeostasis, these situations must be adapted to elicit changes in sleep patterns and other physiological parameters during the immune response to infections to which the organism is continuously exposed.

1. Introduction

Sleep is a physiological process that has been proposed to have restorative and regulatory properties [1, 2]. Although it remains unknown what its exact function is, sleep has garnered particular interest in recent years due to its potential

influence on the immune system. Many studies have demonstrated that total sleep deprivation and rapid eye movement (REM) sleep deprivation modify various components of the immune system, such as the percentage of cell subpopulations (e.g., CD4+, CD8+, and NK) and cytokine levels (e.g., IFN- γ , TNF- α , and IL-1) [3–5]. Also, conversely, sleep patterns are

altered during the immune response, suggesting that sleep and the immune response are linked through bidirectional communication.

Sleep can be defined as a state of immobility, resulting from the decreased ability to respond to external stimuli, and is distinguished from coma and analgesia, because it is rapidly reversible. Further, when deprived of sleep, the organism tends to recover, depending of the extent and duration of sleep loss. The existence of this “rebound” after sleep deprivation suggests that sleep is not simply a period in which activity and alertness decline [6, 7]—it is a vital process that modulates various physiological functions.

In mammals and birds, sleep has specific electroencephalographic (EEG) patterns, which divide the sleep process into several stages. In addition, electromyograms (EMGs) and electrooculograms (EOGs) are used to differentiate the phases of sleep. Based on these parameters, several stages of sleep have been proposed: wakefulness, light sleep (2 stages), slow-wave sleep, and rapid eye movement (REM) sleep, each of which has specific electrical patterns [8]. Based on the classification of sleep stages, a hypnogram can be constructed, describing the number of episodes, duration, rhythmicity, and latency of overnight sleep. Sleep patterns differ between species and during ontogeny and are altered in sleeping disorders (dyssomnia) or when a medical, psychiatric, or neurological disease develops [9].

During sleep, important processes occur with regard to endocrine function in mammals, such as rises in the levels of hormones, such as prolactin and growth hormone [10]. On the contrary, cortisol levels decline, peaking before one wakes up [10, 11] which demonstrates the existence of a connection between sleep and other physiological events.

Studies on total sleep deprivation and REM sleep deprivation suggest that sleep has an important function in memory consolidation, learning, and neuronal plasticity [12–14], although it has also been proposed to be a mechanism to conserve and recover energy [1, 15]. Another theory claims that sleep is a process in which functions and cellular components [2, 16] are restored, but some of these studies are controversial; thus, the exact function of sleep remains unknown.

The primary function of the immune system is to defend the body from infections due to pathogens or self-transformed cells through early innate immunity and subsequent adaptive responses.

Innate immunity is the first line of defense. Its two primary functions are to isolate and destroy invading pathogens through inflammatory processes and to recognize and process antigens to affect acquired immunity. Both types of immunity include cellular and biochemical mechanisms that are designed to respond quickly to infections and accurately distinguish between native and foreign materials.

In innate immunity, for example, foreign pathogens are recognized by pattern recognition receptors (PRRs), which are encoded in the germline, have broad specificity for detecting molecular structures that are unique to such organisms, and are evolutionarily conserved. These unique molecular patterns in pathogens are known as pathogen-associated

molecular patterns (PAMPs) [17]. PAMPs are generally components of the bacterial cell wall, such as lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan. Other important PAMPs include β -glucan (a cell wall component of fungi) and viral nucleic acids (DNA and RNA), all of which have specific structural characteristics [18].

There are various receptors that recognize PAMPs, the most extensively studied of which are Toll-like receptors (TLRs), comprising 13 types that recognize a wide range of PAMPs. TLRs bind to molecules, such as large lipopeptides in bacteria and mycoplasma [19]. NLRs form another group of TLRs that act as intracellular sensors that detect viral DNA and RNA [20].

The activation of TLRs by their bacterial ligands induces an inflammatory response that stimulates macrophages, which produce proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interferon-gamma (IFN- γ), and interleukin-6 (IL-6), which coordinate local and systemic inflammatory immune responses. TNF- α and IL-1 β trigger the local endothelium to induce vasodilation and increase permeability of blood vessels, promoting the recruitment of serum proteins and leukocytes to the site of infection. IL-1 β and IL-6 together, interacting to hepatocytes, activate them to produce acute phase proteins which activate complement and opsonize pathogens, to be phagocytosed by neutrophils and macrophages.

TLRs are expressed in other effector cells of the innate immune system, such as neutrophils, monocytes, NK cells, and $\gamma\delta$ T cells [18], which can coexpress more than 1 type of TLR. Phagocytic leukocytes, such as eosinophils, basophils, and mast cells, are the principal effectors of innate immunity, the main function of which is to ingest and kill pathogens. Other types of phagocytes participate in these processes, acting as antigen-presenting cells (APCs) and generating antigenic peptides that activate specific immune responses—particularly foreign antigens that are partially degraded by T lymphocytes [21].

Recognition of antigens by the adaptive immune system is mediated by specific receptors. These receptors are also encoded in the germline, and through somatic recombination, random combinations of segments of these genes can generate a large and diverse repertoire of receptors with high specificity [22]. The resulting products are clonally distributed in antigen-specific T and B lymphocytes, which express receptors that are specific for 1 antigen, and specific populations are selected to expand in response to the pathogen [23].

T cells recognize peptides through the T-cell receptor (TCR), which affects disparate mechanisms, depending on the type of T lymphocyte response. There are 2 chief groups of conventional T cells: T helper (Th) cells that express the CD4 coreceptor and cytotoxic T lymphocytes that bear CD8. Both cell types recognize an antigenic peptide that has to be complexed to the major histocompatibility complex class II (MHC II) molecules, whereas B cells recognize the antigen by binding to a 3-dimensional molecular determinant (epitope).

In turn, certain Th cells interact with B cells, through which the latter produces large amounts of immunoglobulin

or antibody. Every B cell produces antibodies with a unique specificity that neutralize and destroy the antigen [23].

Innate and acquired immune responses require a network of molecules that signal and orchestrate them. These molecules (cytokines) are synthesized by all classes of immune cells and many other cell types. Generally, cytokines act as proinflammatory, regulatory, or anti-inflammatory molecules and can be classified depending on the subtype of lymphocytes that produced them, as Th0, Th1, Th2, Th3, or Th17, although the actual classification is broader and more complex.

Cytokines participate in innate and adaptive immune responses [24]. Th1 cells and activated macrophages primarily secrete IFN- γ and other cytokines that mediate the response against intracellular pathogens and induce B cells to synthesize IgG2 antibodies. Th2 cells preferentially respond to multicellular parasites and produce IL-4, IL-5, and IL-13 [25] which modulate the function of eosinophils, basophils, and mucosal epithelial lymphocytes. IL-5 specifically instructs lymphocytes to produce IgE antibodies. Th17 cells induce cell types, such as epithelial cells, to produce IL-17 and chemokines that recruit neutrophils to the site of infection and are involved in the response against extracellular bacteria and fungi cells [25].

The differentiation of Th cells into various lineages is controlled by master transcription factors, the expression of which is regulated by cytokines that are produced and governed by APCs in response to activation by PAMPs. Thus, the adaptive immune response results in antigen-specific activation that is orchestrated by the innate immune response.

2. Effect of Infection on Sleep

The brain is linked to the immune system, and similar interactions occur during sleep, wherein brain activity changes, resulting in the putative “awake brain” and “sleeping brain.” There is evidence that the expression of molecules, such as neurotransmitters, hormones, and cytokines, is modulated while the subject sleeps, and human studies have described changes in the serum levels of some of these components during sleep. Specifically, secretion of IL-1 β , IL-10, IL-12, and TNF- α by monocytes and dendritic cells peaks during sleep, independently of circadian rhythms.

This behavior may be directly related to sleep, because when the animal is deprived of the rhythmicity of these cytokines [26, 27], the changes in expression wane. Also, blood levels of monocytes, T cells, and NK cells follow a clear circadian rhythm regarding the sleep-wake cycle [3]. Notably, other neuroendocrine mediators, such as prolactin, cortisol, and norepinephrine, also exhibit circadian rhythms, but their secretion pattern is more related to the sleep-wake cycle, and all of these compounds modulate the immune response [28].

Conversely, certain cytokines affect sleep, such as IL-1 β , which, when administered intracerebroventricularly into rabbits and rats, increases the duration of non-REM sleep. This effect is abolished when IL-1 β antagonists are given [29–31]. Administration of the cytokines TNF- α and IFN- α has the same effect as IL-1 β [32–34].

The hypothalamus, hippocampus, and brainstem harbor immunoreactive neurons for IL-1 β and TNF- α and their receptors. These neurons are differentially distributed throughout various regions of the brain, such as the choroid plexus, hippocampus, hypothalamus, and cortex. Notably, these regions might be involved in the regulation of sleep. Further, IL-1 β has effects on the serotonergic system and governs sleep at several levels [35–37].

This evidence implicates an interaction between components of the immune system and the mechanisms that generate sleep. Thus, the changes that occur during sleep when an immune response is mounted against a pathogen should be described.

Several infectious diseases are associated with sleep disorders. Particularly, infectious agents, such as viruses, bacteria, and parasites, infect the CNS and cause sleep disorders, due to the immune response that is generated against the infection or through direct effects by the pathogen. Moreover, other invasive agents that cause sleep disturbances affect other systems, such as the respiratory and endocrine systems—not those that regulate sleep.

However, most infectious processes, particularly during the acute phase of the immune response, alter sleep patterns, usually protracting the duration of the slow sleep wave (SWS) and consequently decreasing wakefulness and REM sleep. This disruption is commonly observed during an infection and might be a mechanism that is used by an organism to adapt to such circumstances and devote more of its energy to the immune system to clear the infection.

3. Viral Infections and Sleep

Viruses are entities that infect cells, replicating and shedding particles that are called virions. Typically, viruses are composed of DNA or RNA that is covered by a layer of proteins, called the capsid. They differ from other life forms in the cell in that, during replication, they are not covered by the capsid and use the host cell machinery to replicate [38].

Viruses cause many diseases, including pandemics, such as influenza and immunodeficiency virus (HIV). These diseases present with a variety of symptoms, depending on the organ and system that is infected, but many of these conditions are accompanied by sleep disturbances, fatigue, and fever. For example, intranasal inoculation with influenza virus in mice enhances non-rapid eye movement sleep (NREM) and decreases rapid eye movement sleep (REM), despite body temperature declining [39–42].

Genetics also influences the susceptibility and resistance to infectious agents [43–47]. For instance, the increases in NREM sleep during influenza appear to be strain-dependent—C57BL/6 (B6) mice experience greater NREM sleep during infection, whereas BALB/c mice do not [41]. The effects of influenza virus on sleep patterns and specific alterations in sleep have been studied extensively. The well-characterized path and timeline of influenza virus as it travels through the brain suggest that it is a good model for examining the relationship between viral infection and sleep. In 1995, Toth reported that, in addition to the differences in alterations in sleep patterns between strains due to influenza

infection, slow wave sleep increases in C57BL/6 mice—a typical alteration in the circadian rhythm of sleep in rodents, depending on the strain [41].

Lethargic encephalitis (LE) has been described for over 1 century, but little is known about its relationship with depression. Instead, LE has been attributed to the immune response against the central nervous system. Despite being characterized by Hippocrates and Sydenham in the 19th century, its etiological agent has not been identified. LE is a central nervous system (CNS) disorder, in which pharyngitis and, subsequently, sleep disorders, including primary hypersomnolence, and various forms of ophthalmoplegia develop in the early phase [48].

LE was named in 1916 by Constantine von Economo, who observed that, in addition to the remarkable sleep disorders, lethargy, and extrapyramidal movements, surviving patients developed neuropsychiatric disorders, such as catatonia, obsessive-compulsive disorder, and mutism [49]. A hallmark of LE is atrophy of the encephalitis basal ganglia and midbrain structures. Since the 1916–1927 epidemic, few cases of LE have been reported. The LE epidemic occurred during the influenza pandemic of 1918, linking the 2 outbreaks [50]. A recent examination of brain samples with LE demonstrated a lack of viral RNA [51], and other studies in patients with the same clinical features indicate that LE correlates more to an autoimmune disease—95% of subjects had antibodies against antigens of their basal ganglia.

Poliovirus is another viral infection that affects the CNS and causes sleep disorders. Patients who are infected with this virus and experience an acute infection develop a syndrome several years later, including neuromuscular and respiratory symptoms, and comorbid sleep disorders, characterized primarily by obstructive apnea and hypopnea, which affects oxygen desaturation during sleep [52, 53]. Other studies have shown that, in addition to difficulties of swallowing and breathing, periodic limb movements occur during sleep, which might be attributed to dysfunction of motor neurons in the brainstem, probably due to abnormal production of dopamine, which is involved in respiratory disorders that are associated with sleep [54].

Similarly, infection by human immunodeficiency virus (HIV) affects the CNS. Considered the most significant pandemic of our time, patients who are infected with this lentivirus experience fatigue and sleep disorders in the asymptomatic stage [55]. Also, HIV impairs reasoning and memory [56]. As HIV infection progresses, patients can present with psychiatric and cognitive dysfunction, which might be part of the well-known neuropathology.

Early polysomnographic studies of HIV-infected patients have reported altered sleep organization that occurs in the early stage of and throughout infection in adults and children who have more wake time after sleep onset [57]. In these patients, REM sleep declines, SWS is present, and sleep spindle- and K-complex densities are reduced. These symptoms progress, depending on the disease, and ultimately, total sleep time and SWS decrease and wakefulness increases [58].

Other studies in HIV-positive, but asymptomatic, patients have described conflicting data. Whereas Norman

et al. reported an increase in the percentage of SWS, the number of periods of stage 1 sleep and REM and the number of awakenings [59], normal periods in SWS, and REM sleep have been observed by others [60]. Nevertheless, both studies noted greater sleep latency and lower percentage of stage 2 sleep [59, 60]. Norman et al. ruled out the possibility that the alterations were due to the medication, anxiety disorders, or depression, suggesting instead that they were attributed to mobilization of the immune response against the central nervous system [59]. Subsequently, it was reported that, in asymptomatic patients, periods of wakefulness, SWS, and REM sleep were dispersed uniformly throughout the night [59]. Further, other changes occurred in the microstructure of sleep in asymptomatic patients, in whom the cyclic alternating pattern occurred at a significantly higher rate, unrelated to psychiatric or neurological disorders [61].

Because sleep disturbances appear at an early stage of infection, before the disease has developed significantly, it has been proposed that these alterations are caused by direct infection of the CNS and involve certain viral peptides [62], such as components of the capsid. Four hours after intraventricular administration of the gp120 glycoprotein (part of the capsid protein), in rats, alterations in sleep patterns that are similar to those that occur during HIV infection in humans are seen [63]. Furthermore, injection of gp120 decreases glucose utilization in the suprachiasmatic nucleus and lateral habenula [64]. Further, prolonged administration in rats of other glycoproteins, such as gp160 and gp41—also components of the envelope—increases REM sleep and alters sleep fragmentation and the low-frequency components in the EEG. However, if they are administered continuously, they induce mild febrile responses [65].

Other studies have reported that feline immunodeficiency virus- (FIV-) infected cats presented with injury and infiltration of mononuclear cells into various areas of the CNS, (such as the glial nodules during hippocampal rotation and the cortical and subcortical regions). Other structures in which the virus was detected are cortex, midbrain, and cerebellum. The virus location is accompanied by slowdown of the predominant frequency in the electroencephalogram (EEG) and alterations in sleep architecture, including fragmentation and displacement of the SWS [66]. Infected cats spend 50% more time awake, and experience more transition periods between wakefulness and sleep, and a 30% reduction in REM sleep and less frequencies of sleep spindles are observed during the SWS.

Many of these changes in infected cats approximate to those in persons infected with HIV or that develop AIDS [67]. Thus, this model is a good experimental approach to examine the mechanisms by which HIV infection induces changes in sleep patterns, possibly through direct action of viral components in the CNS or by the immune response to the virus or its proteins during infection. Other viruses also directly affect the CNS, such as rabies. Rabies-induced alterations begin in the early stages of infection and disappear at the same time that the clinical signs wane. Rabies does not affect any significant EEG abnormalities in mice but causes sleep disturbances. The hallmarks of this disorder are fewer REM sleep episodes and greater periods of wakefulness.

Compared with fixed rabies virus, street rabies alters EEG recordings, and sleep and waking stages are replaced by a pathological sleep stage.

To determine the function of immune responses in these disorders, infected immunosuppressed mice were studied to note the changes in sleep patterns versus immunocompetent mice. By EEG, both groups experienced the same alterations; thus, they are likely to be caused directly by pathogenic mechanisms of the virus rather than the immune responses against it [68].

Varicella zoster a neurotropic virus also causes sleep disturbances; patients develop fatigue, hypotension, and sleep disorders [69]. Hepatitis C virus affects psychiatric disorders and sleep disturbances, but whether it causes disease in the CNS is unknown. Approximately 60% of patients with chronic hepatitis C develop psychiatric disorders, including sleep disturbances, which also manifest during therapy with interferon- α (IFN- α) [70]. Hepatitis C patients have a high incidence of sleep disorders, depression, and anxiety during and after treatment with IFN- α and without treatment; thus, the effects on sleep appear to depend on the infection [71].

On the contrary, Raison showed that IFN- α therapy exacerbates these disorders—such patients had a significant decrease in sleep time in stages 3 and 4 and in sleep efficiency (total sleep time/time spent in bed \times 100), whereas they experienced increased fatigue, took fewer naps during the day, and had greater plasma cortisol levels [72]. These data are indicators of stress in such patients and suggest that sleep disorders, depression, and anxiety result from deterioration of the emotional state and the immune response against the virus.

Similarly, another study reported that hepatitis B-infected individuals who also had sleep disorders and were treated with alternative medicines (extracts of Jujube seed, Anemarrhena rhizome, Poria sclerotium, and Ligusticum wallichii rhizome), not IFN- α , improved their sleep quality. Sleep I and sleep II improved, whereas sleep III, sleep IV, and REM sleep increased significantly [73]. This evidence supports the finding that sleep disorders occur in patients who have not been given IFN- α and suggests that they are caused by altered levels of this cytokine, indicating that continued exposure to cytokines and innate immune molecules, such as IFN- α , reduce sleep continuity and induce a pattern that is consistent with insomnia and arousal.

The various alterations in the patients with hepatitis C also occur during influenza virus infection, which decreases the amplitude of delta waves during SWS sleep in mice and induces hypothermia and decreases locomotor activity clinically. Other strain-dependent alterations in mouse have been observed; for example, infected B57BL/6 mice spend more time in SWS during the dark period, resulting in loss of the circadian rhythm of sleep 4 days after infection. Further, total sleep time rises after viral challenge in immunized mice. On the contrary, BALB/c mice did not develop any of these disorders [41], implicating genetic differences and disparities in the type of immune response between strains with regard to the effects of infection on sleep patterns. This behavior has been attributed to the MC10-12 region of chromosome 6, which is related to prostaglandin metabolism.

As in C57BL/6 mice, Swiss-Webster mice differed in their response on infection with a lethal (H1N1) and nonlethal strain (H3N2). H1N1-infected young and adult mice had lower body temperature and locomotor activity and greater SWS, whereas REM sleep was suppressed. However, compared with the H3N1 virus, the sleep disturbances due to H3N2 virus were less extensive, despite being administered at a 10-fold higher dose [40]. Thus, the changes that are caused by the virus are mouse strain-dependent and are perhaps due to differences in the immune response against each viral strain.

Sleep disturbances might be part of the clinical profile that develops to infection. In a study of men and women who were infected with type 23 rhinovirus, the patients had decreased sleep time, whereas sleep efficiency fell by 5% during the active period of the virus, compared with its incubation period. These changes were greater in asymptomatic individuals and thus might be related to the acuteness of the immune response against this virus, at least in this infection [74].

Despite these studies, the alterations that are caused by viral infections are not well defined—whereas some promote various stages of sleep, others delete or disrupt its rhythm. These effects might be mediated by direct mechanisms of the virus against CNS or the type of immune response that is generated to contend with these infections, which remain unknown. In Figure 1, a chart of the connectivity between viral infections and sleep is depicted.

4. Bacterial Infections and Sleep

Bacteria are another large group of pathogens that infect and cause disease, significantly altering overall functioning of the body. Specifically, certain molecules from bacteria induce sleep, such as components of the cell wall. For example, muramyl peptide lengthens the SWS in rabbits, rats, and dogs [75]. However, intracerebroventricular and intravenous administration of LPS increase the SWS and its amplitude and suppress REM sleep in rabbits [76].

A study in which humans were inoculated with *Salmonella abortus* endotoxin reported significant declines in waking and REM sleep, which were accompanied by greater non-REM sleep [77]. In contrast to the changes in experimental animals, this endotoxin did not increase the amplitude of delta waves [77]. A subsequent study demonstrated that *Salmonella abortus* endotoxin reduced the total duration of NREM sleep, whereas waking and sleep latency and daytime sleepiness increased [78].

Toth and Kreuger (1988) [79] reported that sleep is altered during the course of an infection—not solely by inoculation with antigens. In their study, electrodes were implanted in rabbits, which were then inoculated intravenously with *Staphylococcus aureus*. With regard to changes in sleep patterns, the total SWS, amplitude, and duration of episodes rose. 10 hours after inoculation, REM sleep was suppressed and remained at low levels for the next 38 h. The effects of infection on sleep were attenuated by antibiotics (cephalothin). The same alterations as with cephalothin were

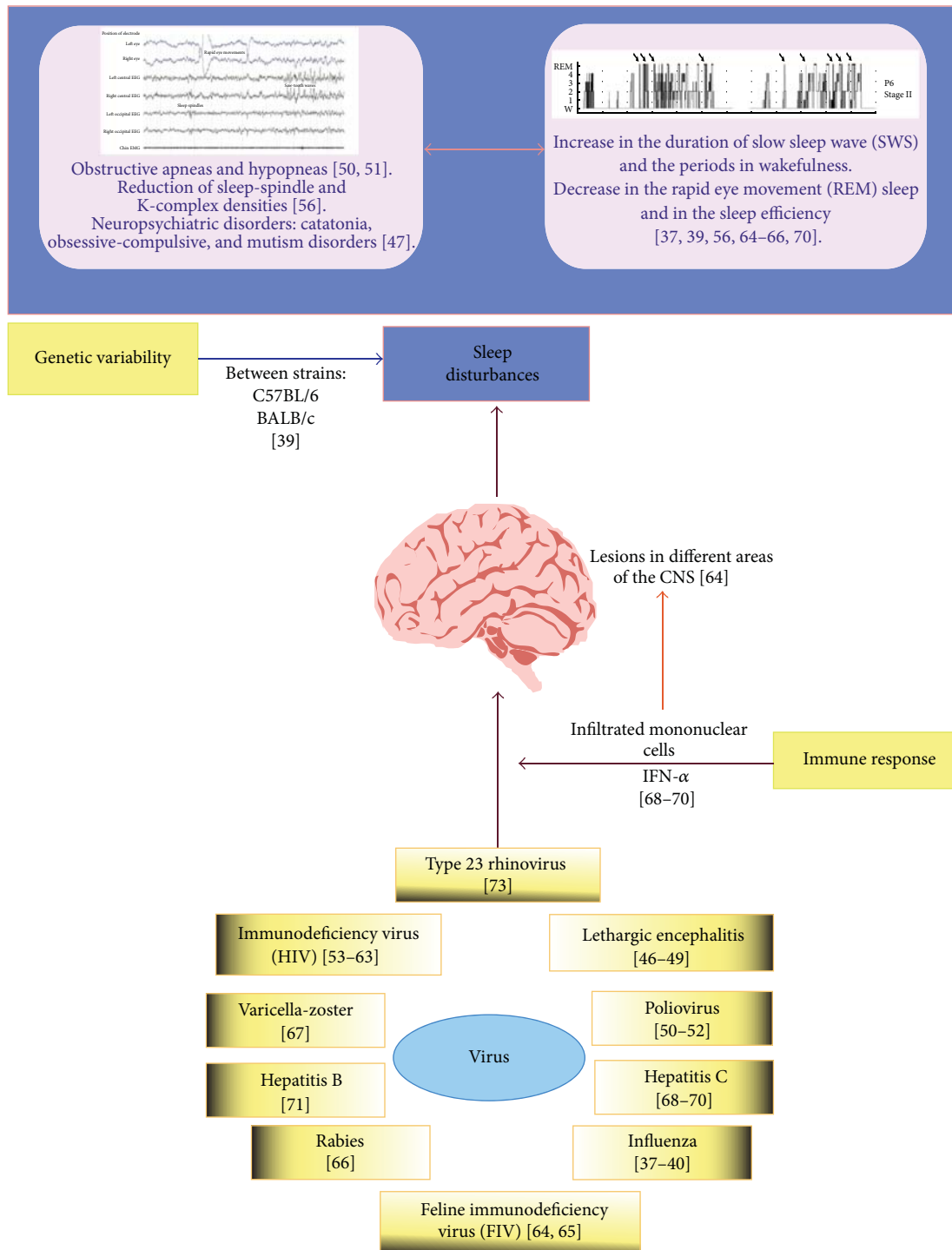


FIGURE I: Connectivity between viral infections and sleep. Sleep disorders that are caused by parasites include increased duration of slow sleep wave (SWS), periods of wakefulness, and a decrease in rapid eye movement sleep (REM), as well as, in general, sleep efficiency. Other disorders comprise alterations in electroencephalographic characteristics, such as reductions in sleep-spindle and K-complex densities. These changes may be caused by activation of the immune system and the consequent production of cytokines that have various effects on CNS structures, modulating the form and quantity of sleep. Such pathogens can disrupt sleep indirectly, causing respiratory dysfunction, obsessive-compulsive disorder, and mutism, all leading to sleep disturbances, such as sleep apnea-hypopnea syndrome, that accompany psychiatric disorders.

observed when dead bacteria were used to inoculate the animals [79].

A subsequent study showed that infection of rabbits with *Escherichia coli*, *Candida albicans*, and *Pasteurella multocida* had effects similar to *S. aureus* infection [80, 81]. On the contrary in a separate study, bacterial colonization in rats did not affect the sleep patterns in the first week after infection, although the number of episodes, frequency, and percentage of REM sleep declined in the second week. These results indicate that noninvasive bacterial colonization decreases REM sleep without causing fever, rendering it a sensitive indicator of the degree of bacterial colonization [82].

Clinical data show that bacterial infections also affect sleep disturbances. In contrast to the alterations in experimental animals, human Lyme disease, caused by the bacterium *Borrelia burgdorferi*, is associated with chronic fatigue and sleep disorders, including insomnia. Greenberg et al. reported that the chief sleep disorders that are cited are difficulty falling asleep, frequent nocturnal awakenings, excessive daytime sleepiness, and restless leg syndrome. To a lesser extent, increased sleep latency, decreased sleep efficiency, a higher arousal index, and sleep fragmentation are observed in these patients [83]. Notably, alpha waves (regular fusiform patterns that are usually present in sleepy or relaxed individuals) were also observed in the stages of non-REM sleep. These changes constitute the clinical presentation of Lyme disease [83], although the underlying mechanisms remain unknown. *Bordetella pertussis* induces alterations during sleep, such as epileptic seizures, choking sounds, and sleep walking. Such parasomnias are linked to the infection and disappear on clearance of the pathogen [84].

In contrast to these infections, sleep disorders develop during or after bacterial infection of the respiratory system. However, it has been argued that such sleep disorders are attributed to the effects of the infection on the respiratory system. Bacterial meningitis and rhombencephalitis caused by *Listeria*, sarcoidosis, and pneumococcal meningitis induce sleep disturbances. During sarcoidosis, general apnea develops, and the alterations in *Listeria* infections are likely to be elicited by lesions in the reticular formation, disrupting the respiratory rate and causing oxygen desaturation in REM and non-REM sleep [85–87]. Under these conditions, many arousals, and the quality of sleep declines. Patients with *Listeria* infections have increased total amounts of sleep, characterized by greater daytime sleep; less nighttime sleep; and longer durations of observed awakenings during the night, resulting in alterations in the sleep-wake cycle—the hallmark symptom in these patients. Yet, the mechanisms of these changes remain undetermined.

Other sleep disorders, such as narcolepsy, might also be related to bacterial infections. A large proportion of patients with narcolepsy have antibodies to *Streptococcus* (anti-streptolysin or ASO) and *Helicobacter pylori* (anti-Hp Ig)—2 bacterial infections that are associated with autoimmune diseases [88] and might trigger narcolepsy through autoimmune mechanisms.

As with viruses, bacterial infections cause various sleep disturbances, depending on the area of the brain that is affected. However, no direct infection of the CNS changes

wakefulness or SWS, possibly due to the influence of certain components of the immune or inflammatory response, such as prostaglandin D₂, the synthesis and release of which are promoted by bacterial infections. Figure 2 depicts a chart of the complex effects of bacterial on sleep patterns.

5. Parasitic Infections and Sleep

Parasitic infections can also alter sleep patterns, due to the resulting immune response or through direct effects. Because parasites are multicellular organisms, they can modify certain behaviors to facilitate infection and complete their life cycle [89]. It is possible that sleep is a state in which they can exploit the infected host, because the responsiveness to external stimuli declines, rendering the host more susceptible to infection. However, there is little evidence of this relationship.

As discussed, sleep is a physiological state that is linked to the maintenance of homeostasis. To achieve this goal, cerebral mechanisms that regulate sleep have a reciprocal relationship with the endocrine and immune systems. Acute and chronic sleep deprivation modifies the immune response, and conversely, immunological challenges alter normal sleep patterns. Thus, sleep impairments are expected to facilitate parasitic infection.

Nevertheless, this issue has not been studied extensively. Human African trypanosomiasis (HAT) is the most, well-characterized parasitic infection that affects sleep patterns. HAT is associated with severe disturbances in nervous system functions, such as endocrine and neuropsychiatric symptoms, sensory alterations, and dramatic changes in sleep patterns. These changes manifest as the complete loss of circadian rhythm, an increase in total sleep time, and narcoleptic-like episodes, defined as direct transition from wakefulness to REM sleep. Based on the changes in sleep patterns, HAT is also designated sleeping sickness [90].

Two subspecies of the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*, transmitted by populations of the tsetse flies in sub-Saharan Africa, cause HAT. *Trypanosoma brucei* gambiense causes the West African, or Gambian, form of the disease, and its main host is human. The disease progresses slowly over months or years, increasing the likelihood of parasitic transmission to the tsetse fly vector. *Trypanosoma brucei* rhodesiense causes the East African, or Rhodesian, form of sleeping sickness, and its main host is cattle; when humans are infected, the course of the disease accelerates, developing within several weeks to months [91].

The hallmark alterations in HAT patients are as follows: (i) polyphasic sleep-wake patterns, leading to the profound disruption in the alternation between sleep and wake times over 24 h and (ii) changes in the internal structure of sleep, characterized by slow rapid eye movement (SOREM) episodes, which can appear earlier than the sleep-wake alterations [90]. Uncharacteristic morphological alterations are also observed in the electroencephalographic (EEG) records of HAT patients. The loss of circadian rhythm affects other endocrine rhythms; for example, the release patterns of prolactin and growth hormone are disrupted. The severity of the dysregulation of the sleep-wake cycle, with short sleep episodes, is nearly equal between day and night and is

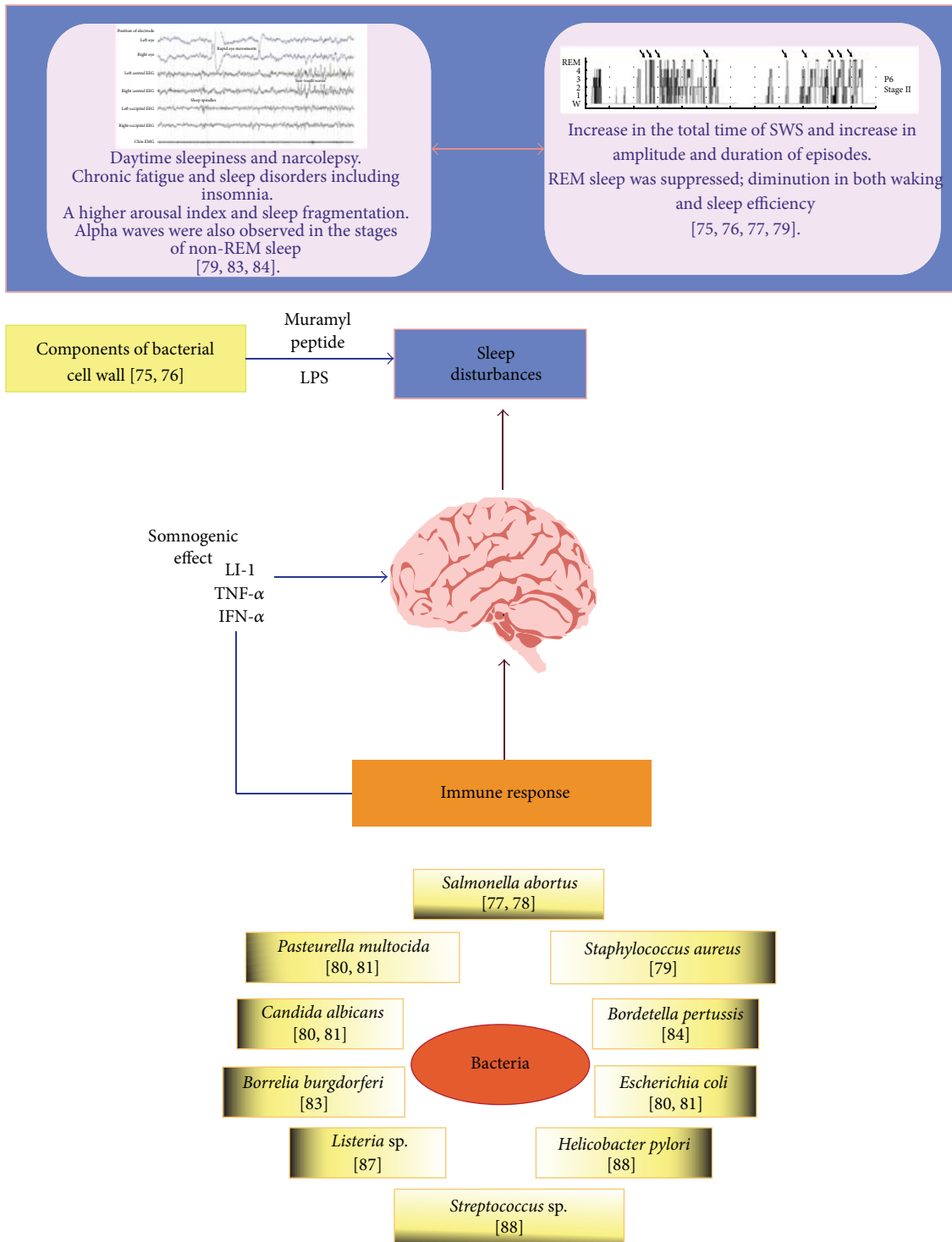


FIGURE 2: Effect of bacterial infections on the sleep process. The sleep disorders that are caused by bacteria include daytime sleepiness and narcolepsy, chronic fatigue, and insomnia, which are accompanied by higher arousal index and sleep fragmentation. Bacterial infections also cause other alterations, such as increases in the duration of slow sleep wave (SWS) and periods of wakefulness. Also, rapid eye movement (REM) sleep and sleep efficiency decrease in bacterial infections. Wall components of bacteria (primarily LPS) are strong inducers of proinflammatory cytokines, which is one possible mechanism by which the infection causes sleep disorders.

proportional to that of the disease. These findings indicate that sleep-wake changes in HAT are not directly related to the presence of the parasite in the brain and implicate slow, reversible functional alterations and compensatory mechanisms [92]. Animal models of HAT have been developed to understand the pathogenic mechanisms that lead to immune system alterations. In a study in which rats were infected with *Trypanosoma brucei brucei* analysis of the spontaneous sleep-wake architecture demonstrated an increased proportion of slow-wave sleep (SWS) and less wakefulness 2 days before death. Considerable sleep fragmentation was observed in infected rats, which experienced numerous changes in sleep-wake stages and more episodes of wakefulness and SWS. Infected rats developed a fragmented pattern of SWS and had reductions in mean paradoxical sleep (PS) latency, disrupting the PS-SWS sequences. Abnormal transitions, particularly the appearance of sleep-onset REM (SOREM) episodes, marked the dysregulation of the internal sleep structure [93].

Other parasitic infections can cause sleep disturbances, such as Plasmodium. The symptoms of malaria during acute infection are periodic fever with shivering, headache, body ache, sleepiness, and loss of appetite, which are caused by proliferating malaria parasite cells in the erythrocytic stage. Recent evidence suggests that these effects are directly related to the finding that *P. falciparum* synthesizes PGD₂, PGE₂, and PGF_{2a} disparately from PG biosynthesis by mammalian cyclooxygenase. PGD₂ is a somnogenic substance, suggesting that malaria parasites have certain strategies to evade host defenses and establish infection [94].

The neurological manifestations in filariasis have received little attention, due to the frequency with which this condition is superimposed on other diseases with meningovascular involvement, to which fatal complications have been attributed. In 1950, Kenney and Hewitt identified the psychoneurotic manifestations as loiasis, insomnia, headache, nervous depression, and abnormal irritability [95]. The first concerned a man aged 28 years who developed a change in personality that was accompanied by torpor. These symptoms were sufficiently severe for him to return to Europe. During his leave, he suffered from headache again with acute mental symptoms and eosinophilia, ranging from 50% to 56%. The removal of a worm (*M. boia*) from the eye ameliorated all his symptoms and decreased eosinophilia to 3% [96].

There are reports that other parasitic infections cause sleep disorders in the host, primarily due to the clinical features of these parasitemias. Hookworm-related cutaneous larva migrans (CLM) is a parasitic skin disease that is caused by the infestation of human skin by larval nematodes, such as *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*, or *Uncinaria stenocephala*. These nematodes usually parasitize dogs and cats [97]. Because humans are an incidental host, in whom normal larval development is impaired, CLM is self-limiting. However, creeping eruption can persist for several months [98]. Sleep disturbances in CLM are frequent. Patients report delayed sleep onset and sleep fragmentation due to frequent awakening episodes, all of whom attribute this complaint to itching—84% of patients complain about sleep disturbances. Although sleep disorders have many causes, we speculate that, in patients in the above-mentioned study, altered sleep

results from severe pruritus that is caused by the lesions [99]. Over 40 years ago, several groups performed studies on onchocerciasis, noting that the prevalence of epilepsy was higher in infected patients, which prompted them to consider that there was a causal relationship between the conditions [100]. All seizure types can be activated by sleep deprivation—a phenomenon that is reported in patients of all ages, although it occurs more frequently in younger subjects [101].

In the cases of parasitic infections that we have discussed in this section, the mechanisms by which they affect sleep remain unknown. Infections, such as malaria, filariasis, and trypanosomiasis, appear to change sleep patterns by modulating the immune response. To this end, our group has observed that experimental infection of rats caused with *Trichinella spiralis* significantly increases NREM sleep after 15 days. This infection comprises a local phase in the intestinal epithelium, lasting up to 5 days after infection, and a systemic phase. At 15 days of infection, the parasite is considered to be present systemically. During this period, a local immune response develops that is characterized by fewer total T cells and more B cells and gamma-delta cells in mesenteric lymph nodes, and there are an inflammatory infiltrate and eosinophilia in the intestinal epithelium (unpublished).

The importance of sleep in immune system function has been examined by many groups. In 2009, Preston and colleagues studied the possibility that sleep evolved across species to afford the organism special protection against parasitic infections. They also analyzed the correlation between sleep duration and parasitic infection levels in 12 mammalian species, finding a negative correlation.

A longer duration of sleep correlated significantly with lower levels of parasitic infection. Thus, the authors concluded that sleep evolved to protect animals from parasitic infections [102]. The possible relationship between sleep and parasite infections is depicted in Figure 3.

6. Concluding Remarks

In recent decades, much experimental and clinical evidence has been generated on the existence of and interaction between the neuroendocrine and immune systems. This communication network allows the body to maintain homeostasis, particularly when it is required to respond to a stimulus, such as an infection. During an infection, the body must alter many of its metabolic functions to eliminate the pathogen. For example, it must devote most of its energy to the immune system, leaving the remainder of the body with less input.

However, the mechanisms of these changes have not been determined entirely, particularly the brain mechanisms of sleep and the immune response. In general, these processes are linked, based on the effects of immune modulators (cytokines) and the sleep mechanisms and the resulting changes in the sleep-wake cycle and the effect of neurotransmitters in modulating sleep during an immune response. Certain cytokines influence sleep mechanisms, such as IL-1 β , which when administered intravenously or intraventricularly in rabbits induces a 60% to 70% increase in the amount of

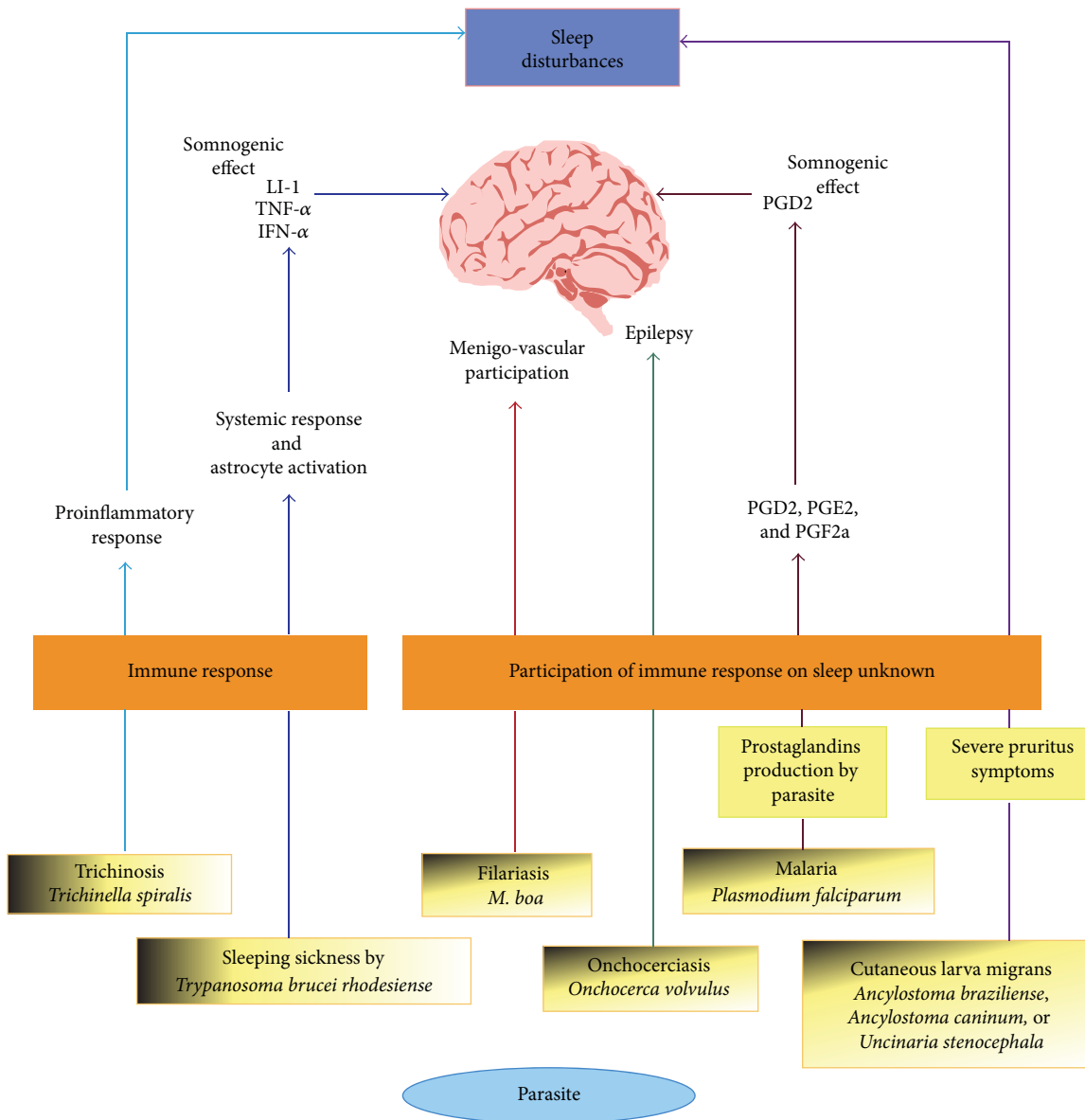
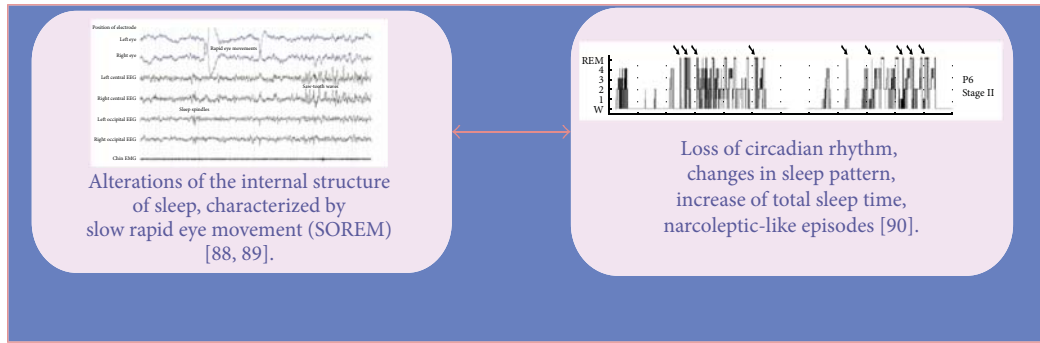


FIGURE 3: Relationship between sleep and parasitic infections. The sleep disorders that are caused by parasites include changes in sleep patterns, such as the amount of total sleep, and in the duration of each stage (wakefulness, sleep stages 1 and 2, slow wave sleep, and REM sleep). Other disorders comprise alterations in the sleep-wake transition at sleep onset and between sleep stages and electroencephalographic disorders. The disorders in parasitic infections, such as trypanosomiasis and trichinosis, have an immune component. The prostaglandins PGD2, PGE2, and PGF2a are induced by these infections; PGDs are somnogenic substances, explaining the effects of these parasites on sleep. The disorders in sleep due to parasites can modify certain behaviors to facilitate parasitic infection and completion of the life cycle.

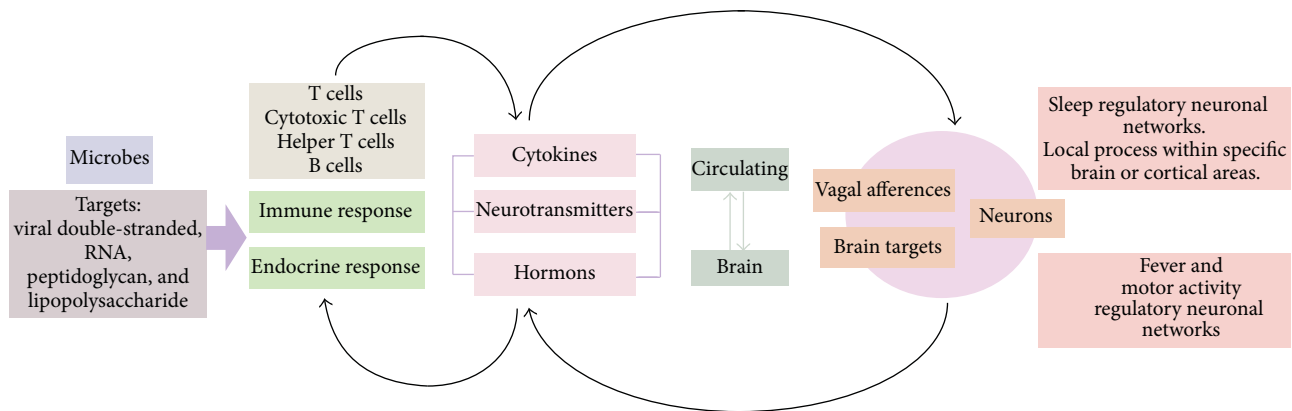


FIGURE 4: Bidirectional interactions between immunity to infections and sleep. The immune response to the invasion of a pathogen and the consequent secretion of immunological mediators, such as interleukins and cytokines, are accompanied by responses by the endocrine and nervous systems, such as the secretion of cortisol and epinephrine. These substances can cross the blood-brain barrier to reach their receptors in various neural structures or may have a vagal input to modulate the responses that maintain homeostasis. This modulation can also be exploited by pathogens to ensure establishment of the infection and completion of its life cycle. However, this series of events has a complex relationship: infections can modulate patterns of behavior, such as sleep, and such primary functions can alter immune and endocrine system functions. For example, the effects of sleep deprivation on the immune and endocrine response support that sleep is fundamental in maintaining homeostasis—its absence leads to physiological disorders and possibly death. Thus, complex systems must be studied to identify the interactions between 2 or more variables in various contexts to determine the mechanisms that are involved in preserving this balance.

NREM sleep time. The administration of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IFN-}\alpha$ has the same effect, which might be mediated by IL-1. IL-1 receptors are expressed in various structures of the brain, and there are immunoreactive hypothalamic neurons to IL-1, which, when coupled with the effects of IL-1 on the serotonergic system, could explain how cytokines facilitate sleep.

Further evidence supports the hypothesis that sleep modulates immune system cells and modulators; women who were deprived of sleep for 77 hours under battlefield-like conditions experienced changes in IFN production and phagocytic activity. Subsequent studies reported that sleep deprivation decreases lymphocyte blastogenesis and NK cell activity and upregulates IL-1 and IL-2. Further, youth who have been sleep-deprived for 64 h experience a significant rise in NK cells, granulocytes, and monocytes. Other studies in rats using a strategy that was designed to perform selective deprivation of REM sleep have reported increased total systemic leukocyte and IgM levels at 96 hours of deprivation. Changes were also observed at 72 hours of deprivation, including enhanced plasma levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, and IL-17A. These findings suggest that deprivation of total sleep and REM sleep entails modulation of the immune system, increasing the inflammatory processes or favoring a certain cellular response.

Conversely, the immune response effects alterations in sleep patterns. Modulators and immune system innate components might be involved in the mechanisms of the changes in sleep patterns. Based on these interactions, the relationship between these processes (sleep and the immune response) is critical in maintaining homeostasis and fending off parasites.

With regard to this hypothesis, Preston and colleagues recently examined the possibility that sleep helps protect the body against parasitic infections. In 12 species of mammals, they demonstrated that sleep duration correlated negatively

with the level parasitic infection, prompting the authors to conclude that sleep evolved to protect animals from parasitic infections.

We are merely beginning to understand how infections change sleep patterns, and why sleep is altered during illness remains unknown. One hypothesis suggests that altered sleep during infection is a component of the acute phase response, promoting recovery during illness, likely through mechanisms that involve cytokines and their receptors, as well as receptors of the innate immune system (Figure 4).

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Grant no. 176803 was obtained from Programa de Fondos Sectoriales CB-SEP, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), and Grant IN208715 was obtained from Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, both provided to Jorge Morales-Montor. Elizabeth G. Ibarra-Coronado is a Ph.D. student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Account no. 99158819, and had a doctoral scholarship from CONACyT, CVU 288056.

References

- [1] J. H. Benington and H. C. Heller, "Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep," *Progress in Neurobiology*, vol. 45, no. 4, pp. 347–360, 1995.

- [2] M. Mackiewicz, K. R. Shockley, M. A. Romer et al., "Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep," *Physiological Genomics*, vol. 31, no. 3, pp. 441–457, 2007 .
- [3] S. Dimitrov, T. Lange, K. Nohroudi, and J. Born, "Number and function of circulating human antigen presenting cells regulated by sleep," *Sleep*, vol. 30, no. 4, pp. 401–411, 2007 .
- [4] S. Yehuda, B. Sredni, R. L. Carasso, and D. Kenigsbuch-Sredni, "REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation," *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 29, no. 7, pp. 393–398, 2009 .
- [5] A. Zager, M. L. Andersen, F. S. Ruiz, I. B. Antunes, and S. Tufik, "Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats," *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 293, no. 1, pp. R504–R509, 2007.
- [6] M. H. Krueger, T. Roth, and W. C. Dement, *Principles and Practice of Sleep Medicine*, Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 4th edition, 2005.
- [7] J. M. Siegel, "Clues to the functions of mammalian sleep," *Nature*, vol. 437, no. 7063, pp. 1264–1271, 2005 .
- [8] P. M. Fuller, J. J. Gooley, and C. B. Saper, "Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback," *Journal of Biological Rhythms*, vol. 21, no. 6, pp. 482–493, 2006.
- [9] H. Zepelin, J. M. S. I. Tobler, M. H. Kryger, T. Roth, and W. C. Dement, "Sleep in animals," in *Principles and Practice of Sleep Medicine*, vol. 4, chapter 10, Elsevier, Philadelphia, Pa, USA, 2005.
- [10] R. R. M. Dent, C. Guilleminault, L. H. Albert, B. I. Posner, B. M. Cox, and A. Goldstein, "Diurnal rhythm of plasma immunoreactive β -endorphin and its relationship to sleep stages and plasma rhythms of cortisol and prolactin," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 52, no. 5, pp. 942 – 947, 1981.
- [11] E. van Cauter, R. Leproult, and L. Plat, "Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men," *The Journal of the American Medical Association*, vol. 284, no. 7, pp. 861–868, 2000 .
- [12] A. Karni, D. Tanne, B. S. Rubenstein, J. J. M. Askenasy, and D. Sagi, "Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill," *Science*, vol. 265, no. 5172, pp. 679–682, 1994 .
- [13] R. Stickgold and M. P. Walker, "Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep?" *Trends in Neurosciences*, vol. 28, no. 8, pp. 408–415, 2005.
- [14] J. Born, B. Rasch, and S. Gais, "Sleep to remember," *Neuroscientist*, vol. 12, no. 5, pp. 410–424, 2006 .
- [15] P. L. Parmeggiani, "Thermoregulation and sleep," *Frontiers in Bioscience*, vol. 8, pp. s557–s567, 2003 .
- [16] P. Ramm and C. T. Smith, "Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat," *Physiology & Behavior*, vol. 48, no. 5, pp. 749–753, 1990.
- [17] C. A. Janeway Jr., "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 54, part 1, pp. 1–13, 1989 .
- [18] R. Medzhitov, "Recognition of microorganisms and activation of the immune response," *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819 – 826, 2007.
- [19] T. Kawai and S. Akira, "Pathogen recognition with Toll-like receptors," *Current Opinion in Immunology*, vol. 17, no. 4, pp. 338–344, 2005.
- [20] J. Viala, P. Sansonetti, and D. J. Philpott, "Nods and 'intracellular' innate immunity," *Comptes Rendus Biologies*, vol. 327, no. 6 , pp. 551–555, 2004.
- [21] E. R. Unanue, "The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages," *Advances in Immunology*, vol. 31, pp. 1–136, 1981.
- [22] D. G. Schatz, M. A. Oettinger, and M. S. Schlissel, "V(D)J recombination: molecular biology and regulation," *Annual Review of Immunology*, vol. 10, pp. 359–383, 1992 .
- [23] K. Murphy, P. Travers, and M. Walport, *Janeway's Immunobiology*, Garland Science, New York, NY, USA, 7th edition, 2008.
- [24] R. L. Reinhardt, S.-J. Kang, H.-E. Liang, and R. M. Locksley, "T helper cell effector fates—who, how and where?" *Current Opinion in Immunology*, vol. 18, no. 3, pp. 271–277, 2006 .
- [25] D. B. Stetson, D. Voehringer, J. L. Grogan et al., "Th2 cells: orchestrating barrier immunity," *Advances in Immunology*, vol. 83, pp. 163–189, 2004.
- [26] T. Lange, S. Dimitrov, and J. Born, "Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1193, pp. 48–59, 2010 .
- [27] T. Lange, S. Dimitrov, H.-L. Fehm, J. Westermann, and J. Born, "Shift of monocyte function toward cellular immunity during sleep," *Archives of Internal Medicine*, vol. 166, no. 16, pp. 1695 – 1700, 2006.
- [28] T. Bollinger, A. Bollinger, J. Naujoks, T. Lange, and W. Solbach, "The influence of regulatory T cells and diurnal hormone rhythms on T helper cell activity," *Immunology*, vol. 131, no. 4 , pp. 488–500, 2010.
- [29] J. M. Krueger, J. Walter, C. A. Dinarello, S. M. Wolff, and L. Chedid, "Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1)," *The American Journal of Physiology*, vol. 246 , no. 6, pp. R994–R999, 1984.
- [30] M. R. Opp and J. M. Krueger, "Interleukin 1-receptor antagonist blocks interleukin 1-induced sleep and fever," *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 260, no. 2, part 2, pp. R453–R457, 1991 .
- [31] M. R. Opp, F. Obal Jr., and J. M. Krueger, "Interleukin 1 alters rat sleep: temporal and dose-related effects," *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 260, no. 1, part 2, pp. R52–R58, 1991 .
- [32] L. B. Deloria and G. J. Mannering, "Interferon induces sleep and other CNS responses in mice recovering from hexobarbital anesthesia," *Neuropharmacology*, vol. 32, no. 12, pp. 1433–1436 , 1993.
- [33] M. Kimura, J. A. Majde, L. A. Toth, M. R. Opp, and J. M. Krueger, "Somnogenic effects of rabbit and recombinant human interferons in rabbits," *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 267, no. 1, part 2, pp. R53–R61, 1994.
- [34] S. Shoham, D. Davenne, A. B. Cady, C. A. Dinarello, and J. M. Krueger, "Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep," *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 253, no. 1, pp. R142–R149, 1987.
- [35] C. D. Breder, C. A. Dinarello, and C. B. Saper, "Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus," *Science*, vol. 240, no. 4850, pp. 321–324, 1988 .
- [36] W. L. Farrar, P. L. Kilian, M. R. Ruff, J. M. Hill, and C. B. Pert, "Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain," *Journal of Immunology*, vol. 139, no. 2, pp. 459–463, 1987 .

- [37] L. Imeri, M. Mancina, and M. R. Opp, "Blockade of 5-hydroxytryptamine (serotonin)-2 receptors alters interleukin-1-induced changes in rat sleep," *Neuroscience*, vol. 92, no. 2, pp. 745–749, 1999.
- [38] D. M. Knipe and P. Howley, *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, 6th edition, 2013.
- [39] J. Fang, D. Tooley, C. Gatewood, K. B. Renegar, J. A. Majde, and J. M. Krueger, "Differential effects of total and upper airway influenza viral infection on sleep in mice," *Sleep*, vol. 19, no. 4, pp. 337–342, 1996.
- [40] J. Fang, C. K. Sanborn, K. B. Renegar, J. A. Majde, and J. M. Krueger, "Influenza viral infections enhance sleep in mice," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 210, no. 3, pp. 242–252, 1995.
- [41] L. A. Toth, J. E. Rehg, and R. G. Webster, "Strain differences in sleep and other pathophysiological sequelae of influenza virus infection in naive and immunized mice," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 58, no. 1, pp. 89–99, 1995.
- [42] L. A. Toth and R. W. Williams, "A quantitative genetic analysis of slow-wave sleep and rapid-eye movement sleep in CXB recombinant inbred mice," *Behavior Genetics*, vol. 29, no. 5, pp. 329–337, 1999.
- [43] G. S. Cooke and A. V. S. Hill, "Genetics of susceptibility to human infectious disease," *Nature Reviews Genetics*, vol. 2, no. 12, pp. 967–977, 2001.
- [44] A. V. S. Hill, "The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility," *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, vol. 2, pp. 373–400, 2001.
- [45] A. De Maio, M. B. Torres, and R. H. Reeves, "Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis," *Shock*, vol. 23, no. 1, pp. 11–17, 2005.
- [46] A. Tuite and P. Gros, "The impact of genomics on the analysis of host resistance to infectious disease," *Microbes and Infection*, vol. 8, no. 6, pp. 1647–1653, 2006.
- [47] R. A. Trammell, T. A. Liberati, and L. A. Toth, "Host genetic background and the innate inflammatory response of lung to influenza virus," *Microbes and Infection*, vol. 14, no. 1, pp. 50–58, 2012.
- [48] L. L. Anderson, J. A. Vilensky, and R. C. Duvoisin, "Review: neuropathology of acute phase encephalitis lethargica: a review of cases from the epidemic period," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 35, no. 5, pp. 462–472, 2009.
- [49] R. C. Dale, A. J. Church, R. A. H. Surtees et al., "Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity," *Brain*, vol. 127, part 1, pp. 21–33, 2004.
- [50] R. T. Ravenholt and W. H. Foege, "1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism," *The Lancet*, vol. 2, no. 8303, pp. 860–864, 1982.
- [51] S. McCall, J. M. Henry, A. H. Reid, and J. K. Taubenberg, "Influenza RNA not detected in archival brain tissues from acute encephalitis lethargica cases or in postencephalitic parkinson cases," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 60, no. 7, pp. 696–704, 2001.
- [52] D. G. Steljes, M. H. Kryger, B. W. Kirk, and T. W. Millar, "Sleep in postpolio syndrome," *Chest*, vol. 98, no. 1, pp. 133–140, 1990.
- [53] V. Dahan, R. J. Kimoff, B. J. Petrof, A. Benedetti, D. Diorio, and D. A. Trojan, "Sleep-disordered breathing in fatigued postpoliomyelitis clinic patients," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 87, no. 10, pp. 1352–1356, 2006.
- [54] T. M. e Silva, G. A. Moreira, A. A. J. Quadros, M. Pradella-Hallinan, S. Tufik, and A. S. B. Oliveira, "Analysis of sleep characteristics in post-polio syndrome patients," *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 68, no. 4, pp. 535–540, 2010.
- [55] D. F. Darko, J. A. McCutchan, D. F. Kripke, J. C. Gillin, and S. Golshan, "Fatigue, sleep disturbance, disability, and indices of progression of HIV infection," *The American Journal of Psychiatry*, vol. 149, no. 4, pp. 514–520, 1992.
- [56] National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, and National Institute of Mental Health, *AIDS Research: An NIMH Blueprint for the Second Decade*, Publication no. 93-3563, National Institutes of Health, 1993.
- [57] L. S. Franck, L. M. Johnson, K. Lee et al., "Sleep disturbances in children with human immunodeficiency virus infection," *Pediatrics*, vol. 104, no. 5, p. e62, 1999.
- [58] S. Kubicki, H. Henkes, D. Alm et al., "Polygraphic sleep data in AIDS patients," *EEG-EMG Zeitschrift für Elektroenzephalographie, Elektromyographie und verwandte Gebiete*, vol. 20, no. 4, pp. 288–294, 1989.
- [59] S. E. Norman, A. D. Chediak, C. Freeman et al., "Sleep disturbances in men with asymptomatic human immunodeficiency (HIV) infection," *Sleep*, vol. 15, no. 2, pp. 150–155, 1992.
- [60] M. Wiegand, A. A. Moller, W. Schreiber, J.-C. Krieg, and F. Holsboer, "Alterations of nocturnal sleep in patients with HIV infection," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 83, no. 2, pp. 141–142, 1991.
- [61] L. Ferini-Strambi, A. Oldani, G. Tirloni et al., "Slow wave sleep and cyclic alternating pattern (CAP) in HIV-infected asymptomatic men," *Sleep*, vol. 18, no. 6, pp. 446–450, 1995.
- [62] D. F. Darko, M. M. Mitler, and J. L. White, "Sleep disturbance in early HIV infection," *Focus*, vol. 10, no. 11, pp. 5–6, 1995.
- [63] M. R. Opp, P. L. Rady, T. K. Hughes Jr., P. Cadet, S. K. Tyring, and E. M. Smith, "Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120 alters sleep and induces cytokine mRNA expression in rats [published errata appear in Am J Physiol 1996 Aug;271(2 Pt 2):section R following table of contents and 1996 Dec;271(6 Pt 3):section R following table of contents]," *The American Journal of Physiology*, vol. 270, no. 5, part 2, pp. R963–R970, 1996.
- [64] L. P. Raymon, A. S. Kimes, B. Tabakoff, and E. D. London, "AIDS and sleep disorders: effect of gp120 on cerebral glucose metabolism," *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, vol. 183, no. 5, pp. 407–418, 1989.
- [65] C. Gemma and M. R. Opp, "Human immunodeficiency virus glycoproteins 160 and 41 alter sleep and brain temperature of rats," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 97, no. 1-2, pp. 94–101, 1999.
- [66] T. R. Phillips, O. Prospero-Garcia, D. L. Puaoli et al., "Neurological abnormalities associated with feline immunodeficiency virus infection," *Journal of General Virology*, vol. 75, no. 5, pp. 979–987, 1994.
- [67] O. Prospéro-García, N. Herold, T. R. Phillips, J. H. Elder, F. E. Bloom, and S. J. Henriksen, "Sleep patterns are disturbed in cats infected with feline immunodeficiency virus," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 26, pp. 12947–12951, 1994.
- [68] P. Gourmelon, D. Briet, D. Clarençon, L. Court, and H. Tsiang, "Sleep alterations in experimental street rabies virus infection occur in the absence of major EEG abnormalities," *Brain Research*, vol. 554, no. 1-2, pp. 159–165, 1991.
- [69] J. S. Shapiro, "Does varicella-zoster virus infection of the peripheral ganglia cause Chronic Fatigue Syndrome?" *Medical Hypotheses*, vol. 73, no. 5, pp. 728–734, 2009.

- [70] B. Gohier, J.-L. Goeb, K. Rannou-Dubas, I. Fouchard, P. Calès, and J.-B. Garré, "Hepatitis C, alpha interferon, anxiety and depression disorders: a prospective study of 71 patients," *The World Journal of Biological Psychiatry*, vol. 4, no. 3, pp. 115–118, 2003.
- [71] S. Sockalingam, S. E. Abbey, F. Alosaimi, and M. Novak, "A review of sleep disturbance in hepatitis C," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 44, no. 1, pp. 38–45, 2010.
- [72] C. L. Raison, D. B. Rye, B. J. Woolwine et al., "Chronic interferon-alpha administration disrupts sleep continuity and depth in patients with hepatitis C: association with fatigue, motor slowing, and increased evening cortisol," *Biological Psychiatry*, vol. 68, no. 10, pp. 942–949, 2010.
- [73] S.-J. Zhang, Z.-X. Chen, Y.-W. Lin, Y.-H. Cheng, S.-L. Liu, and C.-J. Wang, "Clinical observation of modified Suan Zao Ren decoction on insomnia of chronic hepatitis B patients," *Zhong Yao Cai*, vol. 30, no. 11, pp. 1482–1484, 2007.
- [74] C. L. Drake, T. A. Roehrs, H. Royer, G. Koshorek, R. B. Turner, and T. Roth, "Effects of an experimentally induced rhinovirus cold on sleep, performance, and daytime alertness," *Physiology & Behavior*, vol. 71, no. 1-2, pp. 75–81, 2000.
- [75] J. M. Krueger, J. R. Pappenheimer, and M. L. Karnovsky, "Sleep-promoting effects of muramyl peptides," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 79, no. 19 I, pp. 6102–6106, 1982.
- [76] J. M. Krueger, S. Kubillus, S. Shoham, and D. Davenne, "Enhancement of slow-wave sleep by endotoxin and lipid A," *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 251, no. 3, pp. R591–R597, 1986.
- [77] T. Pollmacher, W. Schreiber, S. Gudewill et al., "Influence of endotoxin on nocturnal sleep in humans," *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 264, no. 6, part 2, pp. R1077–R1083, 1993.
- [78] D. M. Hermann, J. Mullington, D. Hinze-Selch, W. Schreiber, C. Galanos, and T. Pollmacher, "Endotoxin-induced changes in sleep and sleepiness during the day," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 23, no. 5, pp. 427–437, 1998.
- [79] L. A. Toth and J. M. Krueger, "Alteration of sleep in rabbits by *Staphylococcus aureus* infection," *Infection and Immunity*, vol. 56, no. 7, pp. 1785–1791, 1988.
- [80] L. A. Toth and J. M. Krueger, "Effects of microbial challenge on sleep in rabbits," *The FASEB Journal*, vol. 3, no. 9, pp. 2062–2066, 1989.
- [81] L. A. Toth and J. M. Krueger, "Somnogenic, pyrogenic, and hematologic effects of experimental pasteurellosis in rabbits," *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 258, no. 2, pp. R536–R542, 1990.
- [82] S. DeMesquita, L. H. Aulick, and K. A. Burgess, "Effect of burn wound bacterial colonization on sleep and respiratory pattern," *Physiology & Behavior*, vol. 51, no. 2, pp. 363–369, 1992.
- [83] H. E. Greenberg, G. Ney, S. M. Scharf, L. Ravdin, and E. Hilton, "Sleep quality in Lyme disease," *Sleep*, vol. 18, no. 10, pp. 912–916, 1995.
- [84] T. Eidlitz-Markus and A. Zeharia, "Adolescent pertussis-induced partial arousal parasomnia," *Pediatric Neurology*, vol. 35, no. 4, pp. 264–267, 2006.
- [85] T. Hasegawa, J. Kohyama, T. Kohji, M. Shimohira, and Y. Iwakawa, "Impairment of respiratory rhythmogenesis and sequelae of bacterial meningitis," *Pediatric Neurology*, vol. 12, no. 4, pp. 357–360, 1995.
- [86] G. A. Turner, E. E. Lower, B. C. Corser, K. L. Gunther, and R. P. Baughman, "Sleep apnea in sarcoidosis," *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Disease*, vol. 14, no. 1, pp. 61–64, 1997.
- [87] D. Milhaud, G. Bernardin, P. M. Roger, M. Magnié, and M. Mattei, "Central apnea with consciousness impairment due to listeria rhombencephalitis sequelae," *Revue Neurologique*, vol. 155, no. 2, pp. 152–154, 1999.
- [88] A. Aran, L. Lin, S. Nevsimalova et al., "Elevated anti-streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset," *Sleep*, vol. 32, no. 8, pp. 979–983, 2009.
- [89] P. J. Donovick and R. G. Burreight, "The consequences of parasitic infection for the behavior of the mammalian host," *Environmental Health Perspectives*, vol. 73, pp. 247–250, 1987.
- [90] A. Buguet, S. Bisser, T. Josenando, F. Chapotot, and R. Cespuglio, "Sleep structure: a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness," *Acta Tropica*, vol. 93, no. 1, pp. 107–117, 2005.
- [91] K. Picozzi, E. M. Fèvre, M. Odiit et al., "Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases," *British Medical Journal*, vol. 331, no. 7527, pp. 1238–1241, 2005.
- [92] D. Malvy and F. Chappuis, "Sleeping sickness," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. 7, pp. 986–995, 2011.
- [93] A. Darsaud, L. Bourdon, S. Mercier et al., "Twenty-four-hour disruption of the sleep-wake cycle and sleep-onset REM-like episodes in a rat model of African trypanosomiasis," *Sleep*, vol. 27, no. 1, pp. 42–46, 2004.
- [94] B. K. Kubata, N. Eguchi, Y. Urade et al., "Plasmodium falciparum produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 188, no. 6, pp. 1197–1202, 1998.
- [95] M. Kenney and R. Hewitt, "Psychoneurotic disturbances in filariasis, and their relief by removal of adult worms or treatment with hetrazan," *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 30, no. 6, pp. 895–899, 1950.
- [96] L. Van Bogaert, A. Dubois, P. G. Janssens, J. Radermecker, G. Tverdy, and M. Wanson, "Encephalitis in loa-loa filariasis," *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, vol. 18, no. 2, pp. 103–119, 1955.
- [97] D. D. Bowman, S. P. Montgomery, A. M. Zajac, M. L. Eberhard, and K. R. Kazacos, "Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans," *Trends in Parasitology*, vol. 26, no. 4, pp. 162–167, 2010.
- [98] H. Feldmeier and A. Schuster, "Mini review: Hookworm-related cutaneous larva migrans," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 31, no. 6, pp. 915–918, 2012.
- [99] A. Schuster, H. Lesshafft, S. Talhari, S. Guedes de Oliveira, R. Ignatius, and H. Feldmeier, "Life quality impairment caused by hookworm-related cutaneous larva migrans in resource-poor communities in Manaus, Brazil," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 11, Article ID e1355, 2011.
- [100] C. Kaiser, S. Pion, and M. Boussinesq, "Do helminths cause epilepsy? The case of onchocerca volvulus," *Parasite Immunology*, vol. 32, no. 1, pp. 79–80, 2010.
- [101] A. M. Pereira, O. Bruni, R. Ferri, A. Palmi, and M. L. Nunes, "The impact of epilepsy on sleep architecture during childhood," *Epilepsia*, vol. 53, no. 9, pp. 1519–1525, 2012.
- [102] B. T. Preston, I. Capellini, P. McNamara, R. A. Barton, and C. L. Nunn, "Parasite resistance and the adaptive significance of sleep," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 9, article 7, 2009.

Reciprocal Relationship Between Sleep and the Immune Response: A Survey

J. Velázquez-Moctezuma*¹, E. Esqueda-León¹ and E. G. Ibarra-Coronado²

¹Neurosciences Area, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México City CP, 092340, Mexico, USA;

²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México D.F. 04510, México, USA

Abstract: It is well known that sleep restriction or impairment results in an increase of the risk of get an infectious disease. As well, once a subject is sick due to an infectious disease, his sleep pattern changes completely. For a number of years these facts have been interpreted as the result of the alteration or lost of the main sleep function, the restoration of the defense system. Nevertheless, the experimental evidences to support this idea are surprisingly scarce. In a recent study on several species, a positive correlation was found between total sleep time and the number of circulating immune cells and, in addition, the species with longer sleep periods had reduced levels of parasitic infections. Experimental impairments of sleep, result in alterations in both the cellular and the humoral immune response. Early experiments on sleep restricted humans showed an increase of monocytes and natural killer (NK) cells, with a significant decrease of lymphocytes T. Concerning the immune humoral response, several cytokines have shown a close relationship with sleep. Some of them are capable of induce sleep when administered to specific regions in the brain. As well, some of them display significant changes when sleep is altered. Thus, it seems that sleep has an influence on the cellular and humoral immune response and, in turn, cytokines regulate the sleep pattern. The full understanding of this relationship could enable us to open new approaches in the therapeutic management of immune diseases. This paper reviews some of the most conspicuous data on these reciprocal influences.

Keywords: REM sleep, immune response, sleep-wakefulness, cytokines.

INTRODUCTION

Although the function of sleep is not fully elucidated yet, it has been known for a number of years that sleep plays a restorative role on most of the organic functions. Restriction of sleep due to social or working conditions leads to a notorious impairments of human capabilities [1]. Even when the onset of sleep is delayed the performance of subjects before easy task is deteriorated. When a subject has a restriction of the duration of his sleep, the number of failures in driving simulators is quite similar to the number of failures that a subject intoxicated with alcohol display in the same task [2]. Thus, even with a slight modification of sleep the organism starts to lost vital functions as attention and performance.

CELLULAR IMMUNE RESPONSE

Concerning immune response in human beings, when continuous wakefulness is prolonged for 40 hours a significant decrease of NK cells activity is observed [3]. Pioneering studies performed by Palmlad and colleagues [4] in healthy women volunteers showed that, after 77 hours of prolonged wakefulness, no changes were observed in the number of polymorphonuclear leukocytes, monocytes or lymphocytes B. However, the authors found that interferon production by virus protein stimulated lymphocytes

increased during the sleep deprivation and this increase remains significant even after 5 days of recovery period. In addition when the leukocyte phagocytic activity was assessed, a biphasic response was observed, with an initial decrease during sleep deprivation and a significant increase after 5 days recovery period.

Although this study was the first to explore in humans the effect of sleep lost in immune function, some controversies can be observed regarding its design. The study was performed in healthy women without paying much attention to the hormonal levels or the moments of the menstrual cycle. In addition, the experiment was performed in a simulated battle field environment continuous at 95 dB battle noise and with the subjects firing an electronic rifle. The stress component of this design was not properly assessed.

In a second study [5], the same group analyzed the effects of sleep deprivation for 48 hours in healthy young men. In this experiment, venous blood draws were done before and after sleep deprivation and lymphocytes were stimulated with phytohemagglutinin (PHA). Results showed that blastogenesis induced by PHA decrease during sleep deprivation. This decrease was significant when compared with values observed before sleep deprivation and the values observed after a five days recovery period. However, in this study the sleep of the subjects during the pre-deprivation assessment and during the recovery period was fragmented. Some memory tests were performed and the subjects were

*Address correspondence to this author at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CP 09340. Mexico City, México, USA; Tel/Fax 52558044704; E-mail: jvm@xanum.uam.mx

awake several times during the night, inducing a possible alteration of lymphocyte activity assessment.

In addition to these observations, Moldofsky and colleagues [6] performed similar studies. Healthy male volunteers were sleep deprived for 64 hours and venous blood was drawn every two hours before and during sleep deprivation. Besides the assessment of cortisol, the authors studied the activity of the NK cells and the lymphocyte blastogenesis induced by both PHA and pokeweed mitogen (PWM). The main finding in this study was a clear difference between both mitogens. During baseline sleep, both PHA and PWM induce an increase of blastogenesis. However, during sleep deprivation, PWM-induced blastogenesis increased while PHA-induced blastogenesis decreased.

David Dinges and his group [7, 8] performed also an observation on total sleep deprivation and immune function. Healthy young volunteers included men and women were included in the study. The sleep deprivation lasted for 64 hours and subjects were sampled before, during and after sleep deprivation. The authors analyzed total blood white cells, monocytes, granulocytes, lymphocytes and different subsets as lymphocytes B, T, helper, NK among others, eosinophils. The authors also stimulate lymphocytes blastogenesis with PHA, PWM and they include another mitogens, concanavalin-A (Con-A). The results showed a significant increase in the counts of white blood cell, granulocytes, monocytes and different subsets of NK cells (CD56 and CD57). Some lymphocytes subsets showed no changes during sleep deprivation as lymphocytes B, T and helper. As well, no changes were observed in mitogen-induced blastogenesis of lymphocytes induced by PHA, PWM and Con-A. The only subset that showed a significant decrease was the T-helper cells.

In this study, the authors introduced by the first time the assessment of interleukin (IL) plasma levels, including IL-1Beta, IL-2, IL-6 and IL-12. In addition, plasma levels of tumor necrosis factor alpha (TNF) and gamma interferon (IFN-gamma) were determined. Results showed no significant variations concerning plasma levels of IL-2, IL-6, IL-12 and TNF. Concerning IL-1 and IFN γ , an initial trend to increase was observed during sleep deprivation, followed by a clear decrease after sleep deprivation.

However, the most common experience for a modern human being, living in a large city is the restriction of sleep, instead of the total sleep lost. Therefore, Irwin and colleagues [9] analyzed the effect on immune response of partial sleep deprivation, allowing the subjects to sleep either during the first half of the night or during the second part. In the first study reported by this group, the assessment of NK cells activity was determined in healthy males. Blood samples were obtained in the morning after normal sleep night during three consecutive days. At the same hour after a partial sleep deprivation. Subjects were awoken at 03:00 in the morning and were kept awake. Last sample was taken after a recovery night of sleep. They found that partial sleep deprivation induced a decrease of NK activity that was correlated with basal values, i.e., the higher the basal values the greater decrease after sleep lost.

Thereafter, the same group [10] analyzed the effects of sleep deprivation during the first half of the night. Results showed a reduction of NK activity. In addition, the authors reported a reduction of IL-2 production by lymphocytes stimulated with Con-A. After a recovery night, the levels of NK activity returned to basal values but the production of IL-2 remains decreased, confirming that only a slight loss of sleep could induce a significant impact on immune response.

The decrease of NK cells after sleep lost was confirmed by a Turkish group. Healthy males were sleep deprived for 48 hours. The levels of NK decreased during sleep deprivation and returned to basal levels during the recovery period. In this study the authors compared the results with those obtained in a control group [11].

Besides experimental reports, there are other sources of information to support the influence of sleep on immune response in humans. Studies on shift workers that commonly experience sleep disturbances, display a notorious decrease of their immune function. This impairment in the immune response has been correlated with the increase frequency of the respiratory tract infections that this group often suffers [12, 13. Cited in: 10].

Several diseases impair normal sleep. Among them, the most conspicuous is, of course, chronic insomnia. Savard *et al.*, in 2003 [14], performed a study in insomniac patients assessing immune parameters including lymphocytes subsets. Compared to results obtained in healthy subjects, insomniac patients showed a significant decrease in CD-3, CD-4 and CD-8 lymphocyte subsets. Unexpectedly, no changes were observed concerning NK cells activity or IL-1, IL-2 and IFN production.

Recently, in a novel approach, Preston and colleagues [15] analyzed the possibility that sleep has evolved across the species to allow the organism special protection against parasitic infections. To test this hypothesis, the authors performed a correlation analysis of total sleep time and the number of circulating immune cells. The authors analyzed the characteristics of 26 mammalian species concerning their total sleep duration. On the other hand, the number of immune cells was correlated with the data of sleep. Neutrophils, which are the largest component of innate immune system and are linked to the rapid response against pathogens, show a positive direct correlation with sleep duration. The mammalian species that show higher amounts of total sleep also show the bigger numbers of circulating neutrophils. Lymphocytes are also an important component of white cell count and are related to the acquired immune response. Lymphocytes also show a significant positive correlation with sleep duration. In addition, basophils and eosinophils which are a relatively minor component of the white cell count and have been linked to parasitic challenge also showed a significant positive correlation with sleep duration. Unexpectedly, monocytes are the only component of white cells that did not show any significant association with sleep duration.

In addition, the authors analyzed the correlation of each one of the main sleep components, rapid eye movements sleep (REM) and non rapid eye movements sleep (NREM), with immune cells. No significant variations were found for each one of the sleep stages. Both stages seem to positively

correlate with immune cells. Furthermore, the authors also analyzed the correlation between sleep duration and parasitic infections levels in 12 mammalian species. In this case, a negative correlation was found. The longer duration of sleep significantly correlates with the lower level of parasitic infection. Thus, the authors conclude that sleep evolved to protect animals from parasitic infections.

In laboratory animals, prolonged sleep deprivation has proved to have a lethal effect. Animals died after approximately 19 days. Carol Everson [16] suggested in 1993 that lethal effect of sleep deprivation could be link to the complete failure of host defenses. After a sustained sleep deprivation of about 24 days, blood cultures were analyzed and showed an invasion of opportunistic microbes. Furthermore, these microorganisms did not produce febrile responses. It must be pointed out that these were healthy animals that did not receive any pathological agent. The observed bacteremia develops just after sleep deprivation which indicates a total failure of the immune response.

To further define the effect of sleep deprivation, Everson and Toth [17] analyzed the development of the bacterial invasion in deprived animals. To this aim, they made tissue cultures of several organs and assess microbial growth. An early sign detected was the infection of the mesenteric lymph nodes with bacteria that supposedly translocated from the intestine. Bacterial presence were later found in several extraintestinal sites, suggesting that this is the mechanisms by which bacteria in sleep deprived animals reach the whole organism leading to death. Formation of colonies was detected mainly in the liver and the lungs.

Using the same paradigm of prolonged sleep deprivation, Everson [18] analyzed white blood cell count in bone and blood. Likewise, immunoglobulins, cytokines, chemokines and endotoxin concentration in serum were assessed. Results showed a significant increase of leukocytes identified as neutrophils. The increase reach 70 % at the end of the 18 days of sleep deprivation, that was significantly different from the 46% observed during the baseline period. Monocytes increased almost three times compared to baseline values. Immunoglobulins display a trend to increase that, however, did not reach statistical significance. IL-1 showed a significant increase only after 15 and 20 days of sleep deprivation. No other significant cytokines variations were detected. The chemokine macrophage chemotactic protein-1 increased during sleep deprivation. Endotoxin concentration in serum increased in sleep deprived animals since 5 days of sleep deprivation and this increase remain significantly different from control animals until the 20 days of sleep deprivation. These data supports the idea that lethal effect of sleep deprivation is the result of bacteremia due to host response failure.

It must be pointed out that, both in humans and in animals, sleep lost is supposedly a very stressful situation. However both in humans and in animals some reports indicate that sleep deprivation does not share the main characteristics of common stressors. In humans, several reports indicate that plasma levels of cortisol and urinary excretion of catecholamines are not elevated after sleep deprivation [19].

In experimental animals, several procedures have been proposed for sleep deprivation. One of the most commonly used for a number of years was the so-called "island technique" that was develop by Michel Jouvet in 1963 [20]. In brief, the technique consists in placing an animal, rat or cat on a small platform surrounded by water. The animal must remain on the platform where can be stand up or seated and, in this condition, they can reach slow wave sleep. As REM sleep is accompanied by muscle atonia, the animal fall into the water each time he tried to enter in REM sleep. A huge volume of papers have been published using this technique to elucidate REM sleep function [21]. As can be easily noticed this technique has several stressful components. First, as the platform is 10 cm high the animal must remain immobilized at the top. Second, the animal remains isolated for several days. Third, each time he falls into the water, the animal must swim and climb to be on the platform again.

To discard the stress component in the results obtained using the island technique, several modification have been proposed. Our group modified the original technique and decreased the height of the platform to 4.5 cm, so the water level also decreased to 3 cm. Thus, the animals are allowed to come down from the platform and move freely in the cage, until they decided to come back to the platform and get some slow wave sleep [22].

Recently, the method was modified in an effort to diminish even more the stress component of this technique. To avoid another stressful component, isolation, a method using multiple platforms was developing. In this case, a group of rats is placed in a tank, usually with more platforms than animals [23]. This modification diminishes the stress component which can be further decreased if the animals had been previously kept in socially stable groups [24].

On the other hand, another popular method to achieve total sleep deprivation was developed by Allan Rechtschaffen and his group in Chicago [25]. In brief the methods and apparatus are as follows: in a large tank fill with water up to 2.5 cm height. A large round platform (46 cm diameter) is horizontally located 2 cm above the water level. The platform is divided by an acrylic wall in two halves. A pair of rats is located in each half of the platform in exactly the same conditions. The animals are usually implanted with electrodes for sleep recording. The animals are kept in these conditions for a habituation period of about seven days. During this period rats are recording continuously and usually 46 % of wakefulness, 48% of NREM sleep and 6% of REM sleep can be observed. During the period of sleep deprivation, the electroencephalographic (EEG) signal of the sleep deprived rat triggers the rotation movement of the platform. When the EEG signal meets the criteria of sleep, the rotation movement start and the animals are forced to walk. Thus, the deprived animal is not allowed to sleep while the control animal can sleep but is facing exactly the same conditions as the deprived rat. This procedure increases wakefulness to more than 90% and decrease sleep to less than 10% of mainly transitional sleep. REM sleep is reduced to about 1% [26].

Thus, despite the efforts to decrease the stress component of the sleep deprivation methods, it seems that stress is a factor that always has to be taken into account in sleep

deprivation studies. The results obtained in any given study are due to sleep lost or are due to the stress component of the deprivation technique. Furthermore, as stress response implies a significant effect of immune response, studies that analyze the impact of sleep lost in immune system, should take stress into account.

With that idea in mind, our group compared the effect of short and long term REM sleep deprivation with the effect of short and long term stress by immobilization [27]. Immobilization stress has been reported as a powerful stressful situation for rats. REM sleep deprivation was achieved by placing the animals in a tank with multiple platforms for either one day and for 10 days. Immobilization stress was achieved by placing the animal inside a small plexiglass cylinder for 6 hours one day or 6 hours daily during 10 days.

Results showed that REM sleep deprivation induce a significant increase in NK cells, even with just one day of deprivation. This increase is even bigger after 10 days. Percentage of lymphocytes T, decrease significantly the first day and remain equally decreased after 10 days of REM deprivation. Percentage of lymphocytes B did not show any significant variation. On the other hand, immobilization stress did not show any effect on NK cells. In addition, percentage of lymphocytes B increases while percentage of lymphocytes T decreases during the first day, but no significant changes were detected after 10 days. These results indicate that sleep lost has a specific effect of the immune response that seems not to be due to any stress component.

As mentioned above, in the modern urban societies the most common experience is not the total loss of sleep but the marked restriction of sleep time. To address this issue, the Brazilian groups of Andersen and Tufik [28] performed a study on REM deprived animals for both a short (24 hours) and long (96 hours) periods. As well, the authors studied a group of rats restricted of sleep for a 21 day period. Sleep restriction was achieved by placing the animals in the multiple platform tank for REM deprivation but only for 18 hours a day.

REM sleep deprivation for 24 hours has no effect on total leukocytes or monocytes. REM deprivation for 96 hours increases significantly leukocytes and the increase is even bigger during the recovery period. Monocytes showed a trend to increase that is bigger and reach significance during the recovery period. Sleep restriction showed the opposite effect. Total leukocytes decrease after 21 days of restriction and returns to control values after the recovery period. Monocytes also showed a trend to decrease in both conditions. Neutrophils are slightly disturbed in all the condition. Only a significant increase was observed during the recovery period after 96 hours of REM deprivation. Lymphocytes decrease after 24 hours of REM deprivation and also after 21 days of sleep restriction. Concerning immunoglobulins, IgM increases significantly after sleep restriction and remains high after recovery period. Interestingly, cortisol increases only after 96 hours of REM deprivation.

Thus, it seems clear that sleep deprivation or restriction has marked effects on cellular immune response. These

effects are not due to the stressful conditions in which usually sleep manipulation is done. As well, it seems that the effect of sleep disturbances on the immune system depends on the duration and the characteristics of the sleep impairment technique.

HUMORAL RESPONSE

Besides immunoglobulins, there is another large family of proteins known as cytokines. These proteins are linked to immune response to infection, inflammation, injury and stressors. Madje in 1994 [29] grouped cytokines in pro- and anti-inflammatory cytokines; chemokines, cellular immunity potentiating cytokines, antibody potentiating cytokines; antiproliferative cytokines and hemopoietic cytokines. Cumulative evidence indicates that a number of them are expressed not only in the immune system but in other organs as in the brain and some of them participate actively in the acute phase response to trauma and infection. This is a complex response that involves the orchestration of several systems [30].

On the other hand, since the beginning of the XX century, sleep researcher have actively look for the sleep substance. For a number of years, researchers look for a humoral factor responsible for the regulation of sleep. Mostly using sleep deprived animals, they analyzed cerebrospinal fluid, blood, urine and of course, the brain to look for this substance. These lines of research leads to a huge number of sleep factors. These factors have been defined as endogenous substances that fill some criteria to clearly show its relationship with sleep regulation [31, 32].

Both lines of research were convergent and during the nineties, cytokines become members of the group of the proposed sleep factors. James Krueger group published a number a papers regarding this issue [for review see.33]. Initially, Krueger was working in the characterization of the muramyl peptide, a sleep factor isolated from human urine and rabbit brain. The peptide was somnogenic when applied in rabbits, cats, rats and monkeys [34]. In addition, muramyl peptides activities are mediated by the production of cytokines, specially IL-1 and TNF [35].

Despite the existence of a number of cytokines, the information regarding the participation on sleep control, involves mainly IL-1 and TNF. Electrophysiological, biochemical and molecular genetic studies have shown a specific effect on sleep-wake behavior. Concerning IL-1, experiments on several species showed a systematic increase in NREM sleep (For review see: 33). In humans patients who received treatment with IL-1 shows a clear increase of diurnal sleepiness [36]. IL-1 has brain receptors that are widely distributed and they are located in brain structures that are linked to sleep regulation. Likewise, IL-1 is interacting with classical neurotransmitters that are involved in sleep regulation [37].

Sleep regulation has a major component located in the basal forebrain and preóptica area. Administration of IL-1 in this region, through a microdialysis probe in a freely moving rat, reduce firing rate of neurons identified as wake-related neurons. In addition, sleep-related neurons increased their firing rate. These observations were done when the animal was awake. When the administration was done during NREM sleep, no alteration of the firing rate of sleep-related

neurons was observed. Additionally, a IL-1 receptor antagonist was perfused before the administration of IL-1. As consequence, the effects of IL-1 in both wake-related and sleep-related neurons were significantly diminished. The results indicate that IL-1 influence sleep by suppressing the activity of wake promoting neurons and activating sleep related neurons. These actions are mediated by a specific receptor located in these neurons [38].

TNF has also shown a similar action in the same area. Microinjection of TNF directly into the preoptica promotes NREM sleep and suppresses REM sleep [39]. In addition both TNF and IL-1 are affective when applied to primary cultures of hypothalamic and hippocampal neurons. Low doses of both cytokines increases cytoplasmic Ca^{2+} , an essential step for neurotransmitters release and this effect is blocked by selective antagonists [40, 41].

In addition, growing evidence supports also the participation of other cytokines as sleep regulators. For instance Interferon alpha (IFN) which is reputed for its antiviral activity also has proved to influence the regulation of sleep [42]. A number of viral infections such as influenza, human immunodeficiency virus (HIV) and feline immunodeficiency virus (FIV) alter drastically the sleep pattern. In addition, viral infections usually induce the production of IFN by almost all nucleated cells. In addition, several brain regions express INF receptors and the administration of IFN induce NREM sleep in rats and rabbits. Thus, it seems that IFN plays a major role in the regulation of sleep, especially on those alterations observed as consequence of viral infections.

Relatively recently another interleukin emerge as a possible sleep regulator, IL-6. The presence of IL-6 in plasma shows circadian variations. It reach its highest concentration during sleep and its lowest during wakefulness [43]. In addition, in healthy humans that have been sleep deprived, a significant increase is observed in plasma levels of IL-6 [44]. Furthermore, subcutaneous administration of IL-6 to humans induces a significant increase of slow wave sleep and a reduction of REM sleep [45]. Likewise, in sleep disorders characterized mainly for the presence of excessive diurnal sleepiness, IL-6 has been found elevated in plasma [46]

CONCLUDING REMARKS

Growing evidence clearly indicate that immune system have a close relationship with the nervous system and with the endocrine system. The intense communication among these three systems seems to play a major role in the maintenance of homeostatic equilibrium. On the other hand, sleep is also a crucial phenomenon to keep the organism in a healthy balance to face the environmental challenges during wakefulness. Thus, the adequate reciprocal influences between sleep and the immune system seems to be a major condition for health. Thus, disturbances of sleep will have an effect on the immune response and, vice versa, components of the immune response will modify the sleep pattern. The full understanding of these relationships will certainly open new avenues in the search for therapeutic alternatives particularly, of sleep disorders and autoimmune diseases.

REFERENCES

- [1] Boivin DB, Tremblay GM, James FO. Working on atypical schedules. *Sleep Med* 2007; 8: 578-89.
- [2] Horne JA, Reyner LA, Barret PR. Driving impairment due to sleepiness is exacerbated by low alcohol intake. *Occup Environ Med* 2003; 60: 689-92.
- [3] Moldofsky H, Lue F, Davidson J, Gorczyński R. Effects of sleep deprivation in human immune functions. *FASEB J* 1989; 3: 1972-77.
- [4] Palmblad J, Cantell K, Strander H, *et al.* Stressor exposure and immunological response in man: Interferon-producing capacity and phagocytosis. *J Psychosom Res* 1976; 20: 193-9.
- [5] Palmblad J, Petrini B, Wasserman J, Akerstedt T. Lymphocyte and granulocyte reactions during sleep deprivation. *Psychosom Med* 1979; 41: 273-8.
- [6] Moldofsky H, Lue F, Davidson J, Jephthah-Ochola J, Carayanniotis K, Gorczyński R. The effect of 64 hours of wakefulness on immune functions and plasma cortisol in humans. Horne J, Ed. *Stuttgart Gustav Fischer Verlag* 1989b.
- [7] Dinges DF, Douglas SD, Zaugg L, *et al.* Leucocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest* 1994; 93: 1930-39.
- [8] Dinges DF, Douglas SD, Hamarman S, Zaugg L, Kapoor S. Sleep deprivation and human immune function. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5: 97-110.
- [9] Irwin M, Mascovich A, Gillin JC, Willoughby R, Pike J, Smith TL. Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosom Med* 1994; 54: 107-26.
- [10] Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J, Gillin JC. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *FASEB J* 1996; 10: 643-53.
- [11] Öztürk L, Pelin Z, Karadeniz D, Kaynak H, Cakar L, Gözükmizi E. Effects of 48 hours sleep deprivation on human immune profile. *Sleep Res Online* 1999; 2: 107-11.
- [12] Curti R, Radice L, Cesana GC, Zanettini R, Grieco A. Work stress and immune system: lymphocyte reactions during rotating shift work. Preliminary results. *Med Law* 1982; 6: 564-9.
- [13] Nakano Y, Miura T, Hara I, *et al.* The effect of shift work on cellular immune function. *J Hum Ergol* 1982; 11: 131-7.
- [14] Savard J, Laroche L, Simard S, Ivers H, Morin CM. Chronic insomnia and immune functioning. *Psychosom Med* 2003; 65: 211-21.
- [15] Preston BT, Capellini I, McNamara P, Barton RA, Nunn CL. Parasite resistance and the adaptive significance of sleep. *BMC Evol Biol* 2009; 7: 9.
- [16] Everson CA. Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am J Physiol* 1993; 265: 1148-54.
- [17] Everson CA, Thot LA. Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R905-916.
- [18] Everson CA. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: 1054-63.
- [19] Salin-Pascual RJ, Ortega-Soto H, Huerto-Delgado L, Camacho-Arroyo I, Roldán-Roldán G, Tamarkin L. The effect of total sleep deprivation on plasma melatonin and cortisol in healthy human volunteers. *Sleep* 1988; 11: 362-9.
- [20] Jouvet D, Vimont P, Delorme F, Jouvet M. Study of selective deprivation of the paradoxal sleep phase in the cat. *C R Seances Soc Biol Fil* 1964; 158: 756-59.
- [21] Vogel GW. A review of REM sleep deprivation. *Arch Gen Psychiatry* 1975; 32: 749-61.
- [22] Velazquez-Moctezuma J, Monroy E, Beyer C, Canchola E. Effects of REM deprivation on the lordosis response induced by gonadal steroids in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1984; 32(1): 91-4.
- [23] Suchecki D, Duarte-Palma B, Tufik S. Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Res* 2000; 875: 14-22.
- [24] Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 2000; 68(3): 309-16.
- [25] Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 2002; 25: 68-87.

- [26] Bergmann BM, Kushida CA, Everson CA, Gilliland MA, Obermeyer W, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat. II. Methodology. *Sleep* 1989; 12: 5-12.
- [27] Velázquez Moctezuma J, Dominguez Salazar E, Cortes Barberena E, *et al.* Differential effects of rapid eye movement sleep deprivation and immobilization stress on blood lymphocyte subsets in rats. *Neuroimmunomodulation* 2004; 11: 261-67.
- [28] Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB, Tufik S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: 504-9.
- [29] Majde JA. An overview of cytokines and their associations with the brain. *Ann NY Acad Sci* 1994; 739: 262-69.
- [30] Sagar SM. The functional neuroanatomy of the acute phase response. *Ann NY Acad Sci* 1994; 739: 282-91.
- [31] Krueger JM, Fang J, Hansen MK, Zhang J, Obál F Jr. Humoral Regulation of Sleep. *N Physiol Sci* 1998; 13: 189-94.
- [32] Steiger A. Neurochemical regulation of sleep. *J Psychiatr Res* 2007; 41: 537-52.
- [33] Krueger JM, Takahashi S, Kapas L, *et al.* Cytokines in sleep regulation. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5: 171-88.
- [34] Krueger JM. Somnogenic activity of immune response modifiers. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 122-6.
- [35] Krueger JM, Majde JA. Sleep as a host defense: its regulation by microbial products and cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57: 188-99.
- [36] Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 7: 1627-52.
- [37] De Simoni MG, Imeri L, De Matteo W, Perego C, Simard S, Terrazzino S. Sleep regulation: Interactions among cytokines and classical neurotransmitters. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5: 189-200.
- [38] Alam M, McGinty D, Bashir T, *et al.* Interleukin 1beta modulates state-dependent discharge activity of preóptica area and basal forebrain neurons: role in sleep regulation. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 207-16.
- [39] Kubota T, Li N, Guan Z, Brown RA, Krueger JM. Intrapreoptic microinjections of TNF-alpha enhances non-REM sleep in rats. *Brain Res* 2002; 932: 37-44.
- [40] De A, Churchill L, Obal Jr F, Simasko SM, Krueger JM. GHRH and IL-1 beta increase cytoplasmic Ca²⁺ levels in cultured hypothalamic gabaérgica neurons. *Brain Res* 2002; 949: 209-12.
- [41] Da A, Krueger JM, Simasko SM. Tumor necrosis factor alpha increases cytosolic calcium responses to AMPA and KCl in primary cultures of rat hippocampal neurons. *Brain Res* 2003; 981: 133-42.
- [42] Opp M, Toth LA. Neural-immune interactions in the regulation of sleep. *Front Biosci* 2003; 8: 520-50.
- [43] Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, *et al.* Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metabol* 1990; 84: 2603-7.
- [44] Redwine L, Hauger RL, Gillin JC. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol and melatonin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3597-603.
- [45] Späth-Schwalbe E, Hansen K, Schmidt F, *et al.* Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; 83: 1573-9.
- [46] Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1313-6.

Received: November 09, 2009

Revised: December 15, 2009

Accepted: February 06, 2010

© Velázquez-Moctezuma *et al.*; Licensee *Bentham Open*.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



RELACIONES RECÍPROCAS ENTRE EL SUEÑO Y EL SISTEMA INMUNE

Javier Velázquez Moctezuma
Elizabeth Ibarra Coronado

INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre ha sido capaz de reflexionar sobre sí mismo, uno de los fenómenos que ha llamado poderosamente su atención es el sueño. Este es un estado de inconsciencia reversible, periódico, donde el sujeto se encuentra en una situación de extrema vulnerabilidad y que, sin embargo, es extraordinariamente necesario para poder funcionar adecuadamente. El ser humano ha sabido desde siempre que el sueño lo restaura, le alivia del cansancio, le brinda energías renovadas y, en relación con la enfermedad, el ser humano ha conocido ancestralmente que el adecuado dormir le protege contra la enfermedad, así como la falta de sueño le vuelve más vulnerable a padecer algún trastorno. A pesar de este conocimiento ancestral, solamente hace apenas unas décadas, la investigación científica ha comenzado a abordar tanto las características de la relación del sueño con la enfermedad, así como

los posibles mecanismos que estén mediando este fenómeno. En esta relación, el sistema inmune parece jugar un papel primordial en la mediación de las relaciones recíprocas entre el sueño y la enfermedad. En este capítulo daremos un panorama general de la relación entre el sueño y el sistema, así como de los abordajes que se han utilizado recientemente.

EL SUEÑO

No obstante que durante siglos el hombre ha experimentado diariamente este estado fisiológico, el conocimiento de sus mecanismos y funciones se ha empezado a estudiar científicamente apenas a partir de principios del siglo XX. Experimentos previos en animales ya habían demostrado que el sistema nervioso generaba actividad eléctrica.

Aún así, fue hasta que Hans Berger desarrolló la técnica del registro electroencefalográfico (EEG), que se pudieron registrar las variaciones del voltaje generadas por el sistema nervioso central, con placas conductoras colocadas en el cráneo, esto es, sin necesidad de penetrar con electrodos en el tejido cerebral.

Posteriormente, se pudo determinar que la actividad EEG presentaba oscilaciones tanto en su frecuencia como en su voltaje y esto, dependiendo del estado de atención del sujeto. Así, se hicieron las primeras determinaciones de las bandas de frecuencia EEG que son vigentes hasta nuestros días. La actividad EEG se clasifica en términos generales en 4 bandas: delta, teta, alfa y beta. Como se observa en la figura 1.

Un sujeto despierto y atento presentará primordialmente actividad beta. Un sujeto somnoliento o relajado presentará actividad alfa. Cuando el sujeto se ha dormido y se ha desconectado de su entorno presentará actividad teta y delta al profundizar su sueño. Existe, sin embargo, una etapa de sueño en la que la actividad EEG vuelve a ser beta, es decir, similar a la que se presenta en vigilia, pero con el sujeto profundamente dormido. Por ello, a esta etapa se le ha llamado también sueño paradójico.

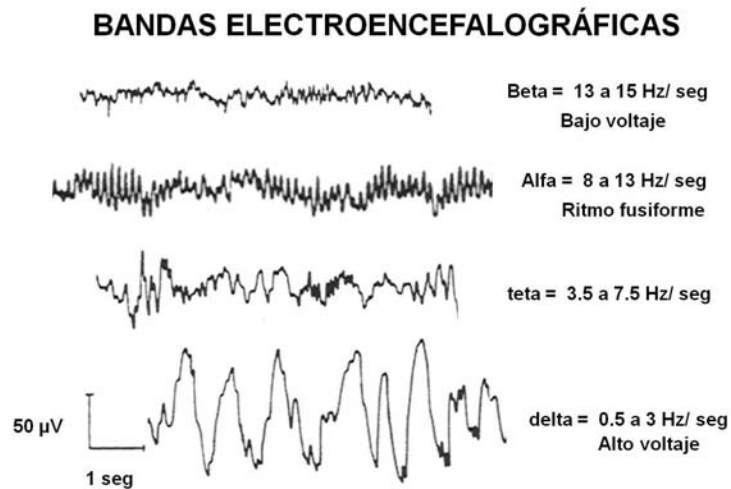


Figura 1. La banda delta es la más lenta y de mayor amplitud. Su frecuencia va de 0.5 a 3.5 ciclos por segundo. La frecuencia teta tiene una frecuencia que va de 4 a 7.5 ciclos por segundo y su amplitud es menor a la delta. La frecuencia alfa que va de 8 a 12 ciclos por segundo se caracteriza por tener un patrón muy regular, fusiforme. Finalmente la frecuencia más rápida es la beta que va de 12.5 hasta 35 ciclos por segundo y presenta el menor voltaje. Aunque se han propuesto algunas subdivisiones de estas bandas, esta clasificación es la de uso más constante. Cada una de estas bandas se ha asociado con estados de vigilancia.

Cuando se agrega el registro de la actividad eléctrica muscular, el electromiograma (EMG), así como el registro del movimiento de los ojos, electro-óculograma (EOG), es posible entonces diferenciar con claridad estados diferentes. Así, después de

años de experiencia y del registro de una gran cantidad de sujetos durante la noche, se han hecho una gran variedad de propuestas acerca de las diferentes etapas del sueño, hasta llegar a las más reciente, publicada en 2005 con el acuerdo de las federaciones internacionales de sueño. Esta clasificación propone que existe la vigilia, dos etapas de sueño ligero, una etapa de sueño de ondas lentas y una etapa de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). Las etapas de sueño ligero y de ondas lentas también se agrupan frecuentemente como sueño no-MOR. Las características de cada etapa se observan en la figura 2.

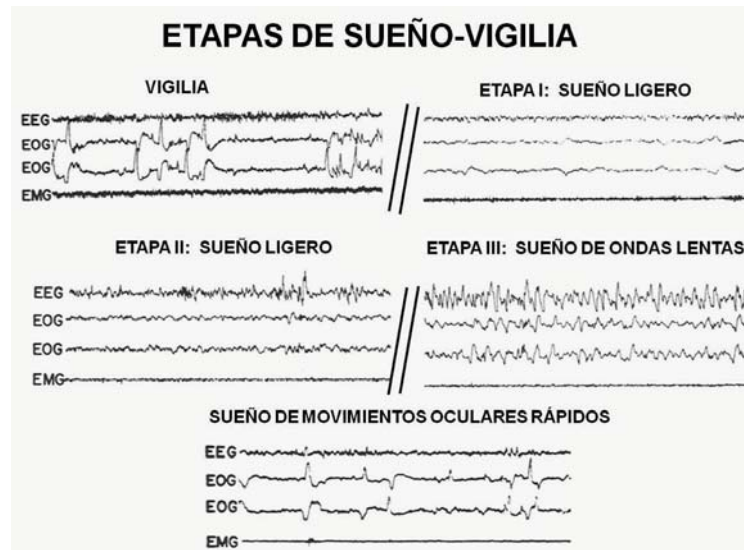


Figura 2. En la vigilia hay actividad EEG rápida, beta, de bajo voltaje, con tono muscular y actividad ocular. En la etapa 1 de sueño, la actividad EEG se lentifica, teta, la actividad muscular disminuye y los movimientos oculares cesan. En la etapa 2, se presentan señales peculiares en el EEG, conocidos como husos de sueño, períodos de hasta 2 segundos de actividad rápida, así

■
como complejos K que son espigas de alto voltaje. En la etapa 3 o de ondas lentas, se presenta frecuencia delta desde 20% de una época de registro y, como en las etapas anteriores, no hay movimiento de los ojos y la actividad muscular esta disminuida. Durante la etapa de sueño MOR, la actividad EEG se torna rápida y de baja frecuencia, se presenta atonía muscular y los ojos empiezan a presentar movimientos rápidos.

Al contar con una clasificación de las etapas de sueño, es posible entonces construir una descripción gráfica de cómo estas etapas se suceden durante la noche. Esta gráfica, que se conoce como hipnograma, nos permite observar las latencias, duración y ritmicidad de las diferentes etapas de sueño. Estas características varían en determinadas enfermedades, por lo que el registro de sueño se convierte además en una herramienta diagnóstica. En los animales, particularmente en los mamíferos, existen también correlatos de sueño MOR y sueño no-MOR. De hecho, han sido los estudios realizados, particularmente en ratas y gatos, los que han permitido determinar, en un grado considerable, cuales son las estructuras cerebrales involucradas, así como los mediadores químicos que están propiciando esta respuesta.

Una vez que Aserinsky y Kleitman describen las características del sueño MOR, una de las peculiaridades más notable es la atonía muscular que acompaña este estado. Este rasgo permitió al grupo francés encabezado por Michel Jouvet, proponer una técnica que permitía suprimir selectivamente y por largos períodos la presencia de esta etapa de sueño. Esta técnica llamada de la isla o del florero invertido, permitió abordar una de las preguntas cruciales en el estudio del sueño: cuál es la función que el sueño y, esta etapa en particular, cumple en el organismo. Figura 3. Así, una gran cantidad de trabajos empezaron a reportar muy diversos efectos sobre el organismo derivados de esta manipulación. Se reveló entonces que ésta etapa es fundamental para el buen funcionamiento del organismo. Su supresión ocasiona problemas a muy diversos niveles. A nivel conductual, los cambios se manifiestan en las

■
primeras 24 horas y el sujeto se torna hiperactivo y agresivo. Las conductas dependientes de hormonas se alteran bruscamente, al igual que los procesos de memoria y aprendizaje. A nivel celular, la sensibilidad de los receptores sinápticos a dopamina, norepinefrina, serotonina y acetilcolina principalmente, se modifican tornándose tanto hiper- como hiporeactivos a su estimulación selectiva. En 1985 Vogel hizo una precisa revisión de lo que hasta entonces pudo conocerse de la privación selectiva de sueño MOR.

TÉCNICA DE LA ISLA

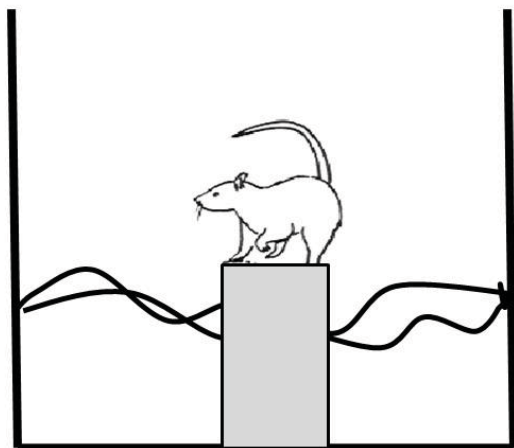


Figura 3.

■

Más adelante, Rechtschaffen y colaboradores propusieron una nueva técnica, ya con metodología computacional, utilizando una plataforma circular giratoria que se deslizaba por debajo de una pared del tamaño del diámetro de la plataforma. La pared divide la plataforma en dos mitades y en cada una de ella se ubicaba una rata. Uno de los animales estaba implantado con electrodos y estaba siendo registrado poligráficamente. Cada vez que este animal entraba a sueño MOR, la plataforma empezaba a girar y naturalmente, este animal se despertaba. El otro animal, el control, podía dormir libremente y solamente se despertaba cuando la plataforma empezará a girar. Esta metodología confirmó algunas observaciones previas y añadió algunas nuevas, en particular, relacionadas con el efecto de la privación sobre el sistema inmune. Esta técnica de privación no ha sido utilizada tan ampliamente como la técnica de la isla.

Recientemente, el grupo brasileño ha propuesto algunas modificaciones a la técnica original que disminuyen substancialmente el estrés. En estas modificaciones se evitan el aislamiento y la inmovilidad que en la técnica original generaban malestar. Ahora se realiza la privación en cajas amplias en donde existen más plataformas que sujetos, de manera que se puedan estar desplazando entre plataformas y, por otro lado, se utilizan animales que ya han estado viviendo en la misma caja de manera que ya se conocen. Estos dos cambios eliminan substancialmente el componente de estrés (Sucheki y Tufik, 2000).

TÉCNICA DE LAS PLATAFORMAS MÚLTIPLES

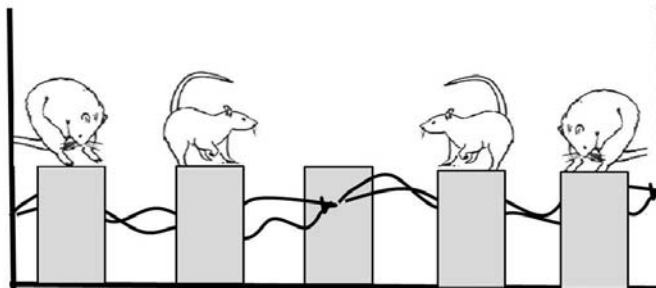


Figura 4

SUEÑO Y RESPUESTA INMUNE EN HUMANOS

Como se mencionó anteriormente, la humanidad ha observado reiteradamente como la privación de sueño nos hace más vulnerables ante agentes infecciosos. Sin embargo, pocos grupos de investigación han abordado este tema y sorprende la poca información con que se cuenta al respecto. Adicionalmente, el hombre es la única especie que voluntariamente puede suprimir su

■
sueño, lo cual tendría algunas ventajas experimentales comparados con los estudios en animales a los que se obliga a permanecer despiertos. En 1976, Palmblad y colaboradores reportaron la primera observación sistemática acerca del impacto de la pérdida de sueño sobre el sistema inmune. En este primer estudio, 8 mujeres fueron privadas totalmente de sueño por 77 horas en circunstancias que simulaban un campo de batalla en donde ocasionalmente se les pedía que dispararan un rifle electrónico. Se tomo una muestra de sangre antes, durante y después de la privación. Los autores no encontraron cambios en cuanto a leucocitos, monocitos o linfocitos circulantes, pero si en la producción de interferón y en la actividad fagocítica.

El mismo grupo realizó un estudio similar 3 años después en un grupo de 12 hombres que se mantuvieron despiertos por 64 horas y a quienes se les tomaron muestras de sangre antes, durante y después de la privación. Los autores estimularon al los linfocitos con fitohemaglutinina observando una disminución de la blastogénesis linfocitaria durante la privación (Palmblad 1979). Después de este estudio tuvieron que pasar 10 años para que el grupo de Moldofsky realizara observaciones similares, agregando la cuantificación de la actividad de los linfocitos NK (natural killers) y la cuantificación de varias interleucinas. Aunque los resultados no demostraron mucha contundencia, los autores reportaron un claro incremento de IL-1 y IL-2 durante la privación de sueño (Moldofsky).

En 1994, David Dinges y su grupo nuevamente estudian un grupo de jóvenes sanos quienes son privados de sueño total durante 64 horas y a quienes se les analiza la respuesta inmune antes, durante y después del privación de sueño. Los autores reportaron que la respuesta celular mostró claras modificaciones debidas a la privación de sueño. El porcentaje de granulocitos, monocitos y células NK aumentaron significativamente, mientras que los linfocitos T-ayudantes decrementaron su porcentaje. Asimismo, este grupo reportó cambios significativos en los niveles de IL-1B y de interferón gama (IFN), mientras que la interleucinas 2, 6 12 y el factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés), no presentaron ninguna variación a lo largo del tiempo.

▪
Otro abordaje interesante de este problema ha sido utilizar la privación parcial de sueño que es, de hecho, el fenómeno que los humanos experimentamos con mayor frecuencia. En esta estrategia se priva a los sujetos de la mitad de la noche, ya sea de la primera o de la segunda. Los resultados mostraron que en ambos casos la actividad de las células NK disminuye, así como la producción de IL-2 (Irwin).

Citoquinas y sueño

Las citoquinas son proteínas que habitualmente se han relacionado con la respuesta inmune. Sin embargo, estudios filogenéticos han detectado evidencias de la presencia de citoquinas en especies ancestrales de varios millones de años de existencia. Aunado a esto, otros datos han permitido suponer que las citoquinas han tenido un papel adicional a su participación en la respuesta inmune. En las últimas décadas ha surgido un enorme volumen de información acerca de la participación de la citoquinas en fenómenos relacionados, por supuesto, con la respuesta inmune, pero también hay sólidas evidencias de su participación en otros fenómenos diferentes a los relacionados con la respuesta inmune.

¿Qué pasa con las citoquinas cuando no hay un estímulo antigénico que exacerbe la respuesta inmune?. ¿Cómo se ha demostrado que las citoquinas están participando en la regulación de fenómenos diferentes a la respuesta inmune? Ante estas interrogantes, los datos existentes nos dicen que, los acercamientos a estos problemas se han abordado, de manera similar, a como se ha abordado el estudio de la participación de algún supuesto regulador fisiológico. En el caso del sistema nervioso, tradicionalmente han existido dos tipos de acercamientos. El primero, de tipo electrofisiológico, analiza los efectos de sustancias particulares sobre la excitabilidad neuronal.

Por otro lado, el abordaje bioquímico analiza los efectos de las interacciones con potenciales receptores a nivel membranal. Adicionalmente, en los últimos años se han agregado abordajes que

■
utilizan técnicas de la biología molecular. Para analizar la posibilidad de que las citoquinas están participando de alguna manera en la regulación de la actividad neuronal, se han utilizado también estas aproximaciones. Con respecto a las estructuras que participan en la regulación del ciclo sueño vigilia, una gran cantidad de información se ha generado al respecto, revelando que algunas regiones participan de manera muy evidente en esta regulación. Algunas de las más destacadas, son el cerebro basal anterior, el hipotálamo y la región preóptica, el tálamo, estructuras del sistema límbico como el hipocampo, núcleos del tallo como el locus coeruleus, los núcleos del rafé, así como los núcleos laterodorsal y pedúnculo pontinos, entre muchos otros. Sumado a esto, se ha encontrado que los receptores específicos a diferentes citoquinas se encuentran distribuidos ampliamente en el sistema nervioso central y la mayoría de las estructuras cerebrales que regulan el sueño presentan receptores para una o varias citoquinas.

Estudios realizados en los años recientes, han obtenido resultados sólidos acerca de la relación de las citoquinas con el sueño, particularmente en dos citoquinas, la interleucina 1 beta (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF). Esto no significa que no hayan sido analizadas muchas otras citoquinas, sin embargo, para estas últimas solo se tiene información fragmentaria.

La administración de IL-1 y TNF provoca un incremento significativo del sueño No MOR en diferentes especies como ratones, ratas, conejos y gatos. En seres humanos que por alguna condición patológica tienen que recibir tratamientos a base de IL-1, se encuentran frecuentemente reportes de fatiga y de somnolencia excesiva diurna.

Los efectos reportados se han visto tanto en administraciones centrales, primordialmente intracerebroventricular o en microinyecciones en diferentes estructuras cerebrales, pero también después de ser administrados de manera sistémica. Asimismo, aunque el efecto es primordialmente sobre el sueño no MOR, existe el reporte frecuente de que con dosis mayores es posible observar un decremento de sueño MOR. Esto puede

■
deberse a la amplia distribución de los receptores de citoquinas en estructuras cerebrales que regulan los componentes del sueño. Por ejemplo, la microinyección de IL-1 en los núcleos del rafe dorsal, donde se ubican neuronas primordialmente serotoninérgicas, provoca un incremento de sueño no MOR. De manera similar, la microinyección de TNF en el área preóptica también incrementa significativamente el sueño no MOR.

Tanto IL-1 como TNF han sido estudiados *in vitro* y, en particular, en relación a su capacidad de provocar la entrada de calcio en las neuronas. Cabe recordar que la entrada de calcio en las neuronas es un paso determinante para el proceso de liberación de neurotransmisores. Cuando se han aplicado bajas concentraciones de IL-1 en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas de rata, se ha observado un incremento significativo en las cantidades de calcio citoplasmático. Más aún, la gran mayoría de estas neuronas resultaron ser de naturaleza gabaérgica, ligándose así de manera muy clara el efecto de la IL-1 con la transmisión gabaérgica. Por otro lado, en estudios similares, el TNF fue aplicado en cultivo de neuronas hipocámpicas, observándose una facilitación de la entrada de calcio a las neuronas por efecto del AMPA y el cloruro de potasio. Este efecto pudo bloquearse con la administración previa de un antagonista a los receptores de TNF.

En cuanto a su relación con sistemas de neurotransmisión, es de destacar la estrecha relación que se ha revelado entre el sistema serotoninérgico y la IL-1. Cabe mencionar aquí que existe un considerable volumen de evidencias que indican la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de diversas conductas entre otras, el sueño y la vigilia. Uno de los ejemplos más conspicuos a este respecto, deriva de los estudios realizados utilizando el registro unitario y que han encontrado que neuronas de carácter serotoninérgico que disparan intensamente durante la vigilia, disminuyen su actividad en el sueño no MOR y cesan completamente de disparar cuando el animal entra en sueño MOR. La IL-1 y el sistema serotoninérgico parecen interactuar a diferentes niveles y algunas evidencias sugieren que la serotonina afecta el sueño a través de la participación de la IL-1. Como se ha mencionado

■
anteriormente, la administración de IL-1 promueve, eleva, la cantidad de sueño no MOR, sin embargo, este efecto parece depender de la integridad del sistema serotoninérgico. Cuando se administran fármacos de interfieren con la síntesis de serotonina y cuando se aplican fármacos que bloquean los receptores 5-HT₂, la IL-1 es incapaz de incrementar el sueño no MOR. (IMERI 1999). Por otro lado, la administración de IL-1 estimula la liberación de serotonina en el hipotálamo y en otras regiones cerebrales.

Adicionalmente, las neuronas núcleo del rafe dorsal, que son primordialmente serotoninérgica, presentan receptores a IL-1 y la microinyección de IL-1 en estos núcleos promueven el sueño no MOR en ratas. Estudios realizados en rebanadas de cerebro de cobayo han también aportado información acerca de esta relación. Una vez que se identifican tanto electrofisiológica como farmacológicamente neuronas serotoninérgicas, se lleva a cabo el registro intracelular, observándose que la administración de IL-1 reduce la frecuencia de disparo de estas neuronas aproximadamente al 50%. Una vez que se lleva a cabo el lavado para retirar el fármaco, las neuronas recuperan su frecuencia de disparo original. Estos resultados llevaron a proponer que si la actividad serotoninérgica promueve la vigilia, entonces la IL-1 promoverá el sueño no MOR inhibiendo la actividad serotoninérgica.

Por otro lado, existen también sólidas evidencias que señalan un papel muy relevante del área preóptica hipotalámica en la regulación del sueño y la vigilia. En esta región se concentran neuronas que aumentan su frecuencia de disparo al principio del sueño no MOR. Adicionalmente, neuronas adyacentes que se encuentran en el cerebro anterior basal aumentan su frecuencia de disparo durante la vigilia. Tomando en cuenta esta información, se piensa que para la instalación del sueño no MOR se requiere que incrementen su actividad las neuronas relacionadas con el sueño y , este incremento de actividad inhibirá la actividad de las neuronas adyacentes que son promotoras de la vigilia. Este efecto inhibitor es el que se observa cuando se ha perfundido IL-1 a través de una sonda de microdiálisis en el área preóptica y el cerebro anterior basal. En ratas en libre movimiento se ha podido observar una reducción muy significativa de

■
la actividad de neuronas cuyo disparo está relacionado con la vigilia. Por otro lado, las neuronas que están relacionadas con el sueño, incrementan su frecuencia de disparo cuando la perfusión de IL-1 se hace estando el animal en vigilia. Cuando la perfusión se hace estando el animal en sueño no MOR, la frecuencia de disparo no aumenta. Estos datos se complementan con la observación de que la perfusión del antagonista de IL-1 antes de la aplicación de IL-1, el efecto de esta se abole completamente. Estos datos se han analizado en su totalidad y se ha propuesto que la IL-1 puede estar incrementando el sueño no MOR suprimiendo la actividad de neuronas relacionadas con la vigilia y, al mismo tiempo promoviendo la actividad de neuronas promotoras del sueño no MOR ubicadas en el área preóptica y el cerebro anterior basal.

Por otra parte, con enfoques diferentes pero complementarios, se han realizado estudios con otros abordajes como la cuantificación tanto de IL-1 como de TNF a lo largo del día. Se han observado cambios que van paralelos con la presencia de sueño no MOR. Las concentraciones plasmáticas de IL-1 tienen su pico en 24 horas cuando aparece el sueño no MOR en humanos. Además, cuando se han administrado antagonistas que bloquean tanto a IL-1 como a TNF el sueño no MOR se reduce. Cuando esto se ha hecho en animales privados de sueño y en los cuales se espera un incremento del sueño, los antagonistas de IL-1 y TNF reduce este rebote de sueño.

Actualmente y gracias a los avances en genética, es posible tener ratones a los que se les ha bloqueado la expresión de algún receptor. En ratones a los que se les han afectado los receptores a IL-1 y TNF muestran una significativa reducción de sueño no MOR. En general, todas las sustancias que promueven el incremento de IL-1 y TNF también producen un incremento de sueño no MOR, mientras que todas aquellas sustancias que interfieren con estas citoquinas también tienen un efecto negativo en la cantidad de sueño no MOR.

A lo largo de los últimos 20 años se han estudiado una gran cantidad de citoquinas en relación a su influencia sobre el sueño y la vigilia, observándose que la gran mayoría de ellas producen un

▪
incremento del sueño no MOR. Aquí cabe hacer la observación de que 3 de ellas, IL-4, IL-10 e IL-13, producen el efecto contrario, es decir, reducen el sueño no MOR. Lo que es también interesante es que al menos dos de ellas, IL4 e IL-10, inhiben la síntesis de IL-1 y de TNF, lo que puede ser el fundamento de su efecto inhibitorio sobre el sueño no MOR. Una estupenda revisión de este tema ha sido publicada por Mark Opp.

¿PRIVACIÓN DE SUEÑO O ESTRÉS?

Los estudios de privación selectiva de sueño MOR llevados a cabo en ratas, como se detalló en párrafos anteriores, regularmente están contaminados con una componente de estrés que es inherente a la técnica de privación. A pesar de que se han introducido modificaciones tendientes a disminuir este componente, todavía existe controversia al respecto. Aún mas, tratándose de valorar la respuesta inmune, esta controversia es todavía más relevante, dado el marcado efecto del estrés sobre el sistema inmune. Por ello, ocasionalmente se ha recurrido a la estrategia de comparar los efectos de la privación de sueño MOR con algún estresor que provoque la respuesta habitual.

Nuestro grupo de investigación abordó este problema analizando los efectos sobre la respuesta inmune celular, tanto a corto (24 horas) como a largo plazo (10 días) de la privación selectiva de sueño MOR y comparándolos con los efectos también a corto y a largo plazo del estrés inducido por inmovilización durante 6 horas diarias dentro de un cilindro. Después de cada manipulación, se obtuvo la sangre total de los sujetos y se analizaron, utilizando anticuerpos específicos, mediante su cuantificación por medio de un citómetro de flujo, los diferentes subtipos de población linfocitaria.

Los resultados de este estudio mostraron que el impacto de ambas manipulaciones sobre el sistema inmune es claramente diferente. Como se puede observar en la figura 5. Para los críticos de la técnica de privación de sueño, estos resultados pueden simplemente estar expresando el resultado de la respuesta de estrés provocada por la misma técnica de privación y, por tanto, no deberse

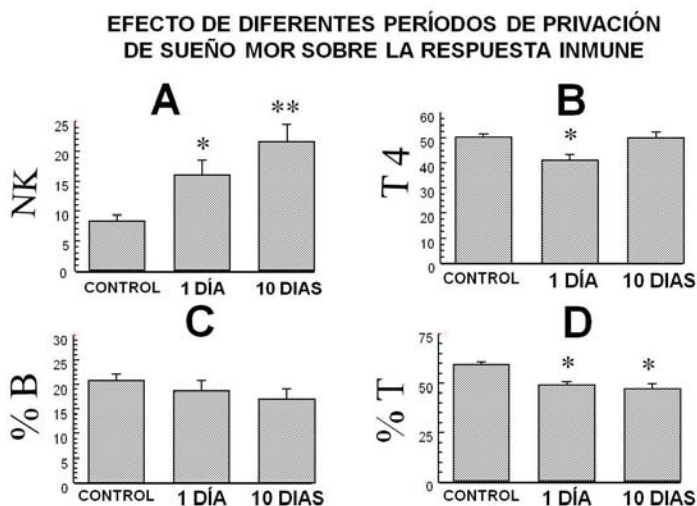


Figura 5. En el Panel A, las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), aumentan significativamente con solamente 24 horas de privación selectiva de sueño MOR. A pesar de que este es un incremento notable, a los diez días de privación se presenta un incremento aún mayor, que es significativamente diferente aún comparado con el incremento que se observó a las 24 horas. De manera que las NK parecen aumentar en correlación directa con la duración de la privación de sueño. En el Panel B se puede observar una disminución significativa de los linfocitos T4 ante las primeras horas de privación, sin embargo, a los diez días de privación parece presentarse una especie de habituación, de manera que en el largo plazo ya no se observan diferencias significativas cuando se hace la comparación con el control. En el Panel C se observa el porcentaje total de linfocitos B y estos no presentan ninguna diferencia

significativa cuando se compara con el control ni a las 24 horas ni a los diez días. Por el contrario, como se observa en el Panel D, el porcentaje total de linfocitos T, disminuye significativamente desde las primeras 24 horas. Esta disminución se mantiene sin cambios aún hasta los diez días de privación.

a la privación selectiva de sueño MOR. En un esfuerzo para tratar de arrojar luz sobre este tema, nuestro grupo llevó a cabo un experimento similar pero ahora utilizando una de los estresores que provocan una marcada respuesta en la rata, la inmovilización. Esto se logra colocando diariamente a los sujetos dentro de un cilindro de plástico, que tiene las medidas adecuadas para que la rata no se pueda mover. Esta manipulación dura 6 horas cada día y se realizó una vez y a lo largo de diez días (Velázquez Moctezuma et al.) Los resultados se pueden observar en la figura 6.

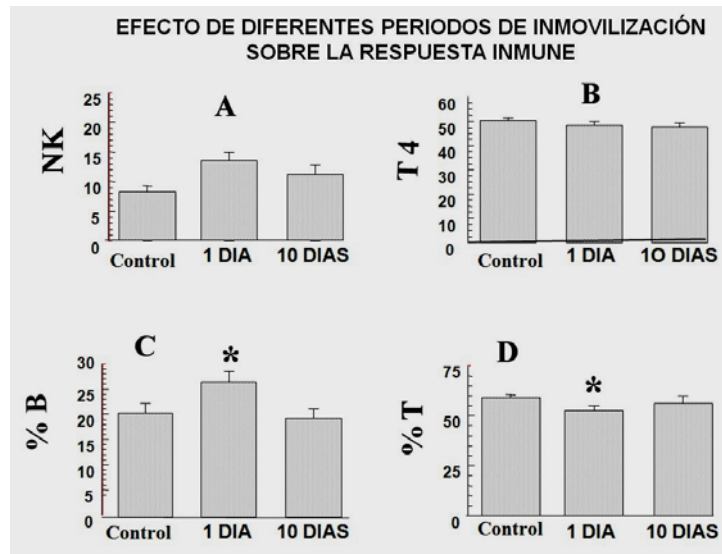


Figura 6. Como puede observarse en el Panel A y en el Panel B, ni las células NK ni los linfocitos T4 presentan respuestas significativas ante el estrés por inmovilización. Por otro lado, el porcentaje de linfocitos B (Panel C) presenta un incremento significativo el primer día de inmovilización, pero esta respuesta desaparece después de 10 días de inmovilización, lo que sugiere que se establece un proceso de habituación ante la repetición constante del estresor. Por el contrario, el porcentaje de linfocitos T disminuye significativamente el primer día y ésta respuesta también desaparece a los diez días de inmovilización.

Recientemente, en una aproximación novedosa, Preston y cols. (2009) estudiaron la relación del sueño con la respuesta inmune, pero para ello recurrieron al análisis de diferentes especies en las que correlacionaron las características de su sueño junto con las características de su respuesta inmune. A partir de un grupo de especies de mamíferos, en donde se observan diferencias marcadas en su cantidad diaria de sueño (de 3 a 20 horas), los autores se preguntaron las razones de éstas diferencias y plantearon la siguiente posibilidad. La evolución del sueño a través de las diferentes especies puede deberse a la necesidad de proteger al organismos específicamente contra infecciones parasitarias. Para probar esta posibilidad, los autores hicieron un análisis comparativo en 26 especies de mamíferos de sus características de sueño, confrontando con diferentes parámetros de su sistema inmune. Según estos autores, existe una sólida correlación entre el incremento en la duración del sueño en diferentes mamíferos con el aumento de las defensas inmunes medidas a través del número de células circulantes. Se observa que hay una correlación positiva entre la cantidad tanto de sueño no MOR como de sueño MOR con el número de células de la fórmula blanca. Las células de la fórmula roja no tienen ninguna variación significativa. Los neutrófilos que representan alrededor del 47 % de los glóbulos blancos y que se ubican como la primera línea de defensa ante ataques de patógenos,

■
se incrementan en correlación con el incremento de sueño. De manera similar, los linfocitos que representan alrededor del 44 % de los glóbulos blancos y que se relacionan con la inmunidad adquirida también aumentan junto con el aumento de sueño de las 26 especies de mamíferos estudiados.

Asimismo, tanto los eosinófilos como los basófilos que juntos suman alrededor del 6 % de los glóbulos blancos también presentan esta correlación positiva con la cantidad de sueño. Finalmente, así como este estudio brinda nueva información acerca del sueño, también abre interrogantes. Por ejemplo, solamente los monocitos, que son alrededor del 5% de los glóbulos blancos, no presentan esta correlación positiva con la cantidad de sueño. De manera que tendríamos que tratar de explicarnos tanto la relación positiva con la cantidad de sueño con la mayoría de las células inmunes, como la falta de correlación del sueño con los monocitos. ¿Por qué estas células no se comportan como el resto de sus pares en relación con el sueño?.

En este mismo estudio, los autores continuaron explorando la posible relación entre la cantidad de sueño y la respuesta inmune. Si esta existe, entonces las especies que presenten mayor cantidad de sueño, tendrán una mejor capacidad en contra de infecciones parasitarias. En este segundo abordaje, los autores analizaron en 12 especies de mamíferos la cantidad de sueño y el parasitismo, tanto de microparásitos, incluyendo aquí virus, bacterias y hongos, como de macroparásitos como helmintos, protozoarios y artrópodos. Los resultados mostraron una significativa correlación negativa entre la cantidad del sueño y el parasitismo.

A partir de estos resultados, la propuesta de estos autores se orienta a entender al sueño como un momento en que el organismo orienta el consumo de energía hacia el mantenimiento del sistema inmune. Si bien durante la vigilia, el organismo tiene que dedicar el mayor consumo de energía a la sobrevivencia, la obtención de alimento o a la reproducción. Durante el sueño, las prioridades parecen cambiar hacia otros sistemas como el sistema inmune para prepararlo ante las necesidades que se le plantean durante la vigilia.

▪

CONCLUSIONES

Como se puede desprender de la información aquí resumida, existe una estrecha relación entre el sueño y el sistema inmune. Sabemos que cuando cada uno de ellos por separado tiene deficiencias, el organismo inmediatamente estará seriamente amenazado en cuanto a su supervivencia. Las alteraciones, aunque sean temporales, en cada uno de ellos, implican enfermedad. Y cuando la falla se prolonga en el tiempo, la misma supervivencia del individuo estará comprometida. Por consecuencia, el sistema inmune requiere de un aporte energético garantizado, lo cual, para no competir con otras funciones substantivas para la supervivencia que ocurren en la vigilia, ocurrirá durante la noche, cuando el organismo duerme. La relación entre el sueño y el sistema inmune, que apenas en los últimos empieza a revelar sus misterios, seguramente nos brindará claves acerca de la integración neuro-inmuno-endocrina y abrirá enormes posibilidades para un futuro manejo adecuado de una gran cantidad de enfermedades para las que hoy no se tiene un entendimiento preciso y menos, alternativas de tratamiento.

REFERENCIAS

Aserinsky E, Kleitman N. Regulatory occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 1953; 11: 273-274.

Berger H. Uber das Elektrenkephalogramm. *Arch Psychiatr Nervenkrank* 1929; 87:527-570.

Bergmann, B.M., Kushida, C.A., Everson, C.A., Gilliland, M.A., Obermeyer, W. and Rechtschaffen, A. (1989) Sleep deprivation in the rat: II. Methodology. *Sleep* 12:5-12.

■
Dinges, D., Douglas, S., Zaugg, L., Campbell, D., McMann, J., Whitehouse, W., Orne, E., Kapoor, S., Icaza, E., & Orne, M. (1994) Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J. Clin. Invest.* 93, 1930-1939.

Dinges, D.F., Douglas, S.D., Hamarman, S., Zaugg, L., & Kapoor, S. (1995) Sleep deprivation and human immune function. *Adv. Neuroimmunol.* 5, 97-110.

Jouvet, D., Vimont, R., Delorme, F., and Jouvet, M. (1964) Etude de la privation selective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *CR Soc. Biol.* 158, 756-759.

Imeri L, mancia M, Opp MR. Blockade of 5-HT₂ receptors alters interleukin-1-induced changes in rat sleep. *Neuroscience* 1999.92:745-749.

Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J, Gillin JC Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *FASEB J.* 1996 Apr;10(5):643-53.

Moldofsky H, Lue FA, Davidson JR, Gorczynski R. Effects of sleep deprivation on human immune functions. *FASEB J* 1989 Jun;3(8):1972-7.

Opp M. Cytokines and sleep. *Slee Medicine Rev.*9:355-364. 2005.
Palmlblad J, Cantell K, Strander H, Fröberg J, Karlsson CG, Levi L, Granström M, Unger P. Stressor exposure and immunological response in man: interferon-producing capacity and phagocytosis. *J Psychosom Res.* 1976;20(3):193-9.

Palmlblad J, Akerstedt T, Fröberg J, Melander A, von Schenck H. Thyroid and adrenomedullary reactions during sleep deprivation. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1979 Feb;90(2):233-9

■
Preston BT, Capellini I, McNamara P, Barton RA, Nunn CL. Parasite resistance and the adaptive significance of sleep. *BMC Evol Biol.* 2009 Jan 9;9:7

Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: X. integration and discussion of the findings. *Sleep* 1989; 12: 68–87.

Suchecki, D. and Tufik, S. (2000) Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav.* 68(3):309-16.

Suchecki. D., Duarte Palma, B. and Tufik, S. (2000) Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Res.* 875(1-2):14-22.

Velazquez Moctezuma J., Dominguez Salazar E., Cortes Barberena E., Najera Medina O., Retana Marquez S., Rodriguez Aguilera E., Jiménez Anguiano A, Cortes Martinez L. and Ortiz Muñoz R Differential effects of rapid eye movement sleep deprivation and immobilization stress on blood lymphocyte subsets in rats... *Neuroimmunomodulation.* 11: 261-267. 2004

Vogel, G.W. (1975) A review of REM sleep deprivation. *Arch. Gen. Psychiat.* 32, 749-761.