



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**“PAPEL DE LAS SINAPSIS ELÉCTRICAS
EN LA REGULACIÓN DEL CICLO SUEÑO-
VIGILIA DE LA RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JAVIER EDGAR FRANCO PEREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLOS HERLINDO PAZ TRES

COMITÉ TUTORAL: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2011



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **FRANCO PÉREZ JAVIER EDGAR** con número de cuenta **96532717** con la tesis titulada: **"PAPEL DE LAS SINAPSIS ELÉCTRICAS EN LA REGULACIÓN DEL CICLO SUEÑO VIGILIA DE LA RATA"** realizada bajo la dirección de : **DR. CARLOS HERLINDO PAZ TRES**

Presidente: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
Vocal: DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA
Secretario: DR. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA
Suplente: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Suplente: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de octubre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por
otorgar la Beca para estudios de Doctorado (Becario 49130)*

A los Miembros del Comité Tutorial:

Dr. Carlos Paz Tres

Dra. Carolina Escobar Briones

Dr. Oscar Próspero García

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y en particular al Departamento de Neurofisiología

A la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica y en especial al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda, Dra. Isabel Ruiz Olmedo y a la M. en C. Edith González Figueroa por su invaluable ayuda para obtener los resultados del Western Blot

A los Miembros del Jurado por brindarme un poco de su valioso tiempo para revisar este trabajo de tesis:

Dr. Manuel Miranda Anaya

Dr. Oscar Prospéro García

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Dra. Carolina Escobar Briones

A todos los compañeros del laboratorio: Verónica Custodio, Edith González, Carmen Rubio, Francisco Gutiérrez, Miguel Hernández y Carlos Martínez por todos los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos

Para Polly, por ser una fuente inagotable de alegrías, anhelos e ilusiones

*Para mi Madre Teresa Pérez Valencia, a quien deberían otorgarle un
Doctorado Honoris Causa por todo su empeño, perseverancia, dedicación
y esfuerzo para sacar a sus hijos adelante*

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”

Albert Einstein

ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina

ACh – Acetilcolina

APVL - Área preóptica ventrolateral

ATP – Adenosin trifosfato

CAB - Cerebro anterior basal

Cx's – Conexinas

Cx36 – Conexina 36

Cx43 – Conexina 43

EEG – Electroencefalograma

EMG – Electromiograma

EOG – Electrooculograma

GABA - Ácido gama amino butírico

Hz – Hertz

HIS - Histamina

HL - Hipotálamo lateral

ICV - Intracerebroventricular

kDa – Kilodaltones

LC - Locus coeruleus

LCR – Líquido cefalorraquídeo

LDT - Núcleo laterodorsal tegmental

μV – Microvolts

NA - Noradrenalina

no MOR - Sueño de no movimientos oculares rápidos

NPOM - Núcleo preóptico medio

NR - Núcleos del rafé

NTM - Núcleo tuberomamilar

ORX - Orexina

Panx's – Panexinas

PC – Precoeruleus

PGO – Ondas ponto-geniculo-occipitales

PPT - Núcleo pedunculopontino tegmental

REM - Rapid eye movements

REM-on - Neuronas promotoras de sMOR

REM-off - Neuronas inhibitoras de sMOR

sMOR - Sueño de movimientos oculares rápidos

SLD – Núcleo sublaterodorsal

SNC - Sistema nervioso central

SOL - Sueño de ondas lentas

SRAA – Sistema reticular activador ascendente

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Del descubrimiento del EEG a la identificación de las etapas del sueño	7
Características electrofisiológicas de la vigilia y las fases de sueño	10
a. Vigilia	12
b. SOL	13
c. sMOR	14
Estudios pioneros acerca de los mecanismos de regulación del sueño	16
Neuroanatomía y neuroquímica del ciclo sueño-vigilia	21
Introducción a las sinapsis eléctricas	24
Estructura y composición molecular de las sinapsis eléctricas	27
Distribución de Cx's en el cerebro	32
Papel de la Cx36 y Cx43 en el SNC	34
Sueño, sinapsis eléctricas y Cx's	40
Planteamiento del problema	45
Hipótesis	46
Objetivos	46
Método	
a. Animales	47
b. Implantación de electrodos y cánulas	47
c. Grupos	48

d. Registros de sueño	49
e. Privación de sueño	50
f. Disección de las regiones cerebrales	51
g. Western blot	53
Resultados	
a. Artículo original: Quinine, a selective gap junction blocker, decreases REM sleep in rats. <i>Pharmacol Biochem Behav</i> , 2009; 94: 250-254	56
b. La privación total de sueño y/o el consiguiente rebote de sueño cambian la expresión de la Cx36 y Cx43 en el cerebro	61
Discusión y Conclusiones	69
Bibliografía	85
Anexo 1	
Artículo de Revisión: Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia. <i>Rev Inv Clin</i> , 2011	95

RESUMEN

Las sinapsis eléctricas están constituidas por uniones estrechas (*gap junctions* en inglés) las cuales son canales que permiten la comunicación directa entre las neuronas, la transferencia intercelular de iones y el acoplamiento eléctrico entre varios conjuntos neuronales. El acoplamiento eléctrico está mediado por las proteínas conexina36 y conexina43, las cuales son el componente estructural de las uniones estrechas en las neuronas y los astrocitos respectivamente. Existen reportes que muestran la expresión de conexina36 y conexina43 en el hipotálamo y el tallo cerebral, específicamente en núcleos que han sido implicados en la regulación del ciclo sueño-vigilia como el sublaterodorsal, tegmento pedúnculo pontino y el locus coeruleus. Así, el primer objetivo de este trabajo fue analizar los efectos del bloqueo de las sinapsis eléctricas neuronales sobre los parámetros de sueño de la rata. Para esto, ratas Wistar fueron implantadas con electrodos bipolares en la corteza frontal y con una cánula guía para microinyección en el ventrículo lateral derecho. Posteriormente, se comparó un grupo control con tres grupos experimentales tratados con un bloqueador de sinapsis eléctricas (quinina 0.5, 1 y 2 μM por vía intracerebroventricular). Dicha comparación se realizó mediante la valoración electrográfica y conductual de los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia (vigilia, sueño de ondas lentas y sueño de movimientos oculares rápidos). El segundo objetivo fue tratar de correlacionar la expresión proteica de la conexina36 y conexina43 con la vigilia prolongada y el subsecuente rebote de sueño. Esto se llevo a cabo con dos grupos de ratas, las cuales fueron sacrificadas al término de 24 horas de privación total de sueño y después de la recuperación de sueño durante 4 horas. Posteriormente, se les extrajeron

diferentes regiones cerebrales las cuales fueron seleccionadas debido a su relación con la regulación del ciclo sueño-vigilia. Las muestras se procesaron para analizar el nivel proteico de conexina36 y conexina43 mediante Western Blot. Nuestros resultados indican que la administración intracerebroventricular de quinina (1 μ M) originó un incremento en la duración de la vigilia y una disminución del sueño de ondas lentas a lo largo de las 24 horas analizadas. Las tres dosis utilizadas de quinina significativamente provocaron una reducción del tiempo total de sueño de movimientos oculares rápidos. Los cambios observados en el sueño de movimientos oculares rápidos se debieron principalmente a una disminución en el número de episodios, asimismo se observó un incremento en la latencia de aparición del primer episodio de ésta fase de sueño. Los resultados del Western blot indicaron que la privación total de sueño disminuyó los niveles de conexina36 los cuales no mostraron recuperación con el rebote de sueño. Por otro lado, la conexina43 no se ve alterada con la privación total de sueño pero interesantemente se incrementan sus niveles cuando las ratas presentan rebote de sueño. En conclusión, el bloqueo de las sinapsis eléctricas neuronales altera la estructura del ciclo sueño-vigilia y además la manipulación experimental de la estructura normal del sueño modifica significativamente los niveles de dos principales conexinas presentes en el cerebro. Estos resultados podrían sugerir que las sinapsis eléctricas podrían estar participando conjuntamente con sistemas de neurotransmisión química en la modulación de los estados del ciclo sueño-vigilia de la rata.

ABSTRACT

Electrical synapses are formed by gap junctions that allow the direct communication between neurons, intercellular transference of ions and small molecules as well as electrical coupling of cells within neuronal groups. The electrical coupling is mediated by the proteins connexin36 and connexin43 which are the structural component of gap junctions in neurons and astrocytes respectively. There are reports that show expression of connexin36 and connexin43 in the hypothalamus and brainstem specifically in some nuclei that previously have been implicated in the regulation of sleep-wake cycle such as sublaterodorsal, pedunculopontine tegmental and locus coeruleus. Therefore, the first objective of this study was analyze the effects of blocking neuronal electrical synapses on sleep parameters of the rat. For this, Wistar rats were implanted with bipolar electrodes in frontal cortex and a guide cannula to microinjection in the right lateral ventricle. Then, it was compared a control group with three experimental groups treated with a gap junction blocker (quinine 0.5, 1.0 and 2.0 μ M, intracerebroventricular via). The comparison was carried out by electrographic and behavioral evaluation of the different states of the sleep-wake cycle (wakefulness, slow wave sleep and rapid eye movements sleep). The second objective was try to correlate protein levels of connexin36 and connexin43 with prolonged wakefulness and subsequent sleep rebound. This was carried out with two groups of rats which were sacrificed at the end of 24 hours of total sleep deprivation and after sleep recovery for 4 hours. Subsequently, different brain regions were dissected in accordance with their involvement in the modulation of sleep-wake cycle. The samples were processed to analyze the protein levels of connexin36 and

connexin43 by Western blot. Our results showed that intracerebroventricular quinine administration (1 μ M) increased the total time spent in wakefulness and decreased the time spent in slow wave sleep along the 24 hours of sleep recording. The three doses used of quinine caused a significant decrease of rapid eye movement sleep. Alterations observed in rapid eye movement sleep were relating with the both diminution of episodes number and mean duration, even it was observed an increase of the latency of rapid eye movement sleep onset. The results of Western blot indicated that total sleep deprivation decreased the levels of connexin36 even without recovery in the sleep rebound. On the other hand, connexin43 is not modified by sleep deprivation but interestingly increases its levels when the rats have sleep rebound. In conclusion, manipulation of neuronal electrical synapses changes the structure of sleep wake cycle. In addition, experimental disruption of normal sleep significantly modifies the levels of two main connexins in the brain rat. These results may suggest that electrical synapses and therefore gap junctions formed by connexin36 and connexin43 might be involved in conjunction with chemical neurotransmitter systems in modulating the sleep wake cycle of the rat.

INTRODUCCION

Tomando la contribución de diferentes autores ahora podemos decir que el sueño es un estado funcional natural reversible, caracterizado por una reducción de la actividad motora voluntaria, incremento del umbral de respuesta a estímulos externos y postura estereotípica. Estas características se han considerado como las mínimas importantes para diferenciar entre el sueño y los periodos de inactividad, aunque algunos autores han propuesto algunas otras como organización circadiana, presencia de sitios específicos de descanso, proceso de regulación e incluso ojos cerrados. Así, la diferencia entre descanso y sueño parece determinarse por el número de características mostradas por una especie dada. Filogenéticamente el sueño es un fenómeno ampliamente presente, se ha preservado a través de la evolución de los mamíferos lo cual sugiere que es un mecanismo compartido a lo largo de las especies y con una significancia funcional universal. Entre los mamíferos, la cantidad y naturaleza del sueño está correlacionada con la edad, el tamaño del cuerpo y variables ecológicas como el ambiente terrestre o acuático en donde viven, la dieta y la seguridad de los nichos que ocupan para dormir. Así, el sueño ha proporcionado una ventaja selectiva para poder persistir ya que la prolongada pérdida de sueño afecta, entre otras cosas, el control de la temperatura, el metabolismo y la función inmune, pudiendo producir en condiciones extremas hasta la muerte. Con esto podemos darnos cuenta de la importancia que tiene este proceso y todos los niveles de organización que participan o que son influidos directa o indirectamente por el sueño. Funcionalmente, el sueño puede representar un periodo de tiempo eficiente para la ejecución de una gran variedad de funciones pero las variaciones

en la expresión del sueño indican que estas funciones pueden diferir entre las especies. Aunque parece indudable que el sueño puede tener algunas funciones fundamentales, éstas aún no son del todo claras. De hecho, la función del sueño ha sido un tema de arduo debate durante los últimos 40 años. Asimismo, el sueño ha sido asociado con algunas funciones como conservación de energía, función inmune, metabolismo cerebral, implicaciones ecológicas como el riesgo de depredación, mantenimiento de redes neuronales y para facilitar el aprendizaje y la memoria a través de cambios en la plasticidad cerebral y en la generación de sinapsis neuronales. Teniendo en cuenta los múltiples posibles beneficios que el sueño puede proporcionar, sería inconcebible tratar de establecer que el sueño tiene solamente una función. Lo que es indudable es que cuando un individuo cae dormido asume los costos potenciales del sueño para cubrir una necesidad primaria pero también al mismo tiempo se beneficia de todas las funciones secundarias relacionadas con dicho proceso.

Hasta ahora, hemos abordado dos preguntas fundamentales: ¿qué es el sueño? y ¿cuáles son sus funciones? sin embargo, existe una tercera que ha sido objeto de innumerables estudios y de algunas hipótesis ¿cuáles son sus mecanismos? Aunque aún no se ha determinado de manera precisa cuales son los mecanismos, el sueño parece ser un fenómeno global altamente regulado ya que se ha propuesto que presenta diferentes niveles de control desde los genes y procesos sinápticos hasta redes neuronales centrales. Todo lo anterior nos ha llevado a la siguiente reflexión: si invertimos una tercera parte de nuestras vidas durmiendo, porque no invertimos otra tercera parte en investigar cuales son los mecanismos que nos hacen dormir durante todo ese tiempo. Es indudable la importancia del

sueño y más aun la importancia de conocer los mecanismos cerebrales que subyacen a que un individuo caiga dormido o se mantenga despierto (para referencias ver Siegel, 2005; Mignot, 2008; Roth et al, 2010).

DEL DESCUBRIMIENTO DEL EEG A LA IDENTIFICACION DE LAS ETAPAS DEL SUEÑO

Desde 1875 Richard Caton describió que las señales eléctricas del cerebro podían ser registradas directamente de la superficie de la corteza cerebral expuesta. Caton investigó la actividad eléctrica de los cerebros de gatos, monos y conejos y notó que los voltajes de la señal podían mostrar cambios espontáneos además de ser influenciados por estímulos externos (Caton, 1887). Medio siglo después, Hans Berger (1929) publicó el primer reporte en humanos de registros electroencefalográficos realizados con electrodos de aguja en pacientes con daños en el cráneo y con electrodos de cuero cabelludo en sujetos sanos. A pesar de su importancia estos reportes fueron ignorados hasta que en 1934 Adrian y Matthews reprodujeron los registros y publicaron sus resultados para de esta forma asegurar el reconocimiento del electroencefalograma (EEG). Para 1935 un gran número de investigadores utilizaron los registros del EEG para documentar los efectos del sueño, narcolepsia, hipoxia, isquemia, hiperventilación, crisis tónico-clónicas y estatus epilépticos. Así, concluyeron que los cambios observados en la actividad eléctrica del cerebro podían proporcionar una ayuda inmediata para la diagnosis y ofrecer una nueva aproximación para el estudio de los mecanismos neurales (Cooper y MacGillivray, 2003). El descubrimiento del EEG fue el primer evento importante que marcó el comienzo de la era científica en la investigación

del sueño y proporcionó las bases de los conceptos actuales acerca de la identificación de las etapas del sueño. Loomis y colaboradores fueron el primer grupo de investigadores que utilizó el EEG para hacer una clara distinción entre la vigilia y el sueño en humanos. Ellos describieron que existían cinco etapas de sueño caracterizadas por marcadas diferencias en los potenciales cerebrales. Dichos estados fueron identificados por letras (A-E) de acuerdo con el orden de aparición. Etapa A: somnolencia, etapa B: inicio del sueño, etapa C: sueño ligero, etapa D: sueño intermedio y etapa E: sueño profundo. También describieron que podían presentarse movimientos corporales sin un cambio notable en la etapa así como cambios de etapa sin movimientos corporales. Sus hallazgos no solo definieron estados objetivos de vigilia y sueño sino también la hipótesis que las ensoñaciones ocurrían en la etapa B denotada por ondas de baja amplitud (Loomis et al, 1937). Por otro lado, Klaue encontró mediante registros de EEG en gatos que el sueño progresaba en una secuencia propia, es decir primero se presentaba un periodo de sueño ligero durante el cual la corteza generaba ondas lentas seguidas por un periodo de sueño profundo donde la actividad cortical se aceleraba (Citado por Datta y MacLean, 2007). Estas observaciones fueron de suma importancia ya que documentaron las ondas lentas corticales pero también las ondas rápidas de baja amplitud e indicaron que existían principalmente dos diferentes patrones de actividad del EEG durante el sueño. En 1951 Eugene Aserinsky, un estudiante de doctorado del laboratorio del profesor Nathaniel Kleitman en la Universidad de Chicago, encontró una especie de activación cerebral generada endógenamente y reflejada en los movimientos rápidos tipo espasmódicos de los ojos durante el sueño de su hijo de ocho años. Dos años

más tarde, Aserinsky y Kleitman realizaron un estudio electroencefalográfico en sujetos adultos y mostraron la aparición de movimientos oculares rápidos, describiendo que el patrón de movilidad era de duración variable y aparecía cerca de 3 horas después de ir a la cama, recurría aproximadamente 2 horas después y entonces emergía a intervalos más cercanos justamente antes del despertar (Aserinsky y Kleitman, 1953). Además de los movimientos de los ojos, ellos pudieron observar un patrón del EEG y actividad del sistema nervioso autónomo lo cual les permitió proponer que eran fenómenos significativamente relacionados y que no ocurrían al azar, sino que más bien se trataba de un nivel de actividad cortical que se encontraba de manera natural en el sueño. Estos hallazgos son considerados como el descubrimiento de lo que ahora conocemos como el sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR). Posteriormente, William Dement, otro alumno de Kleitman, fue el primero en estudiar intensivamente la conexión entre el SMOR y las ensoñaciones. Asimismo, para facilitar la organización y el análisis de las extensas observaciones propuso la categorización de los patrones del EEG durante el sueño en cuatro etapas, caracterizándose principalmente la etapa 3 y 4 por la presencia de ondas lentas de gran amplitud (Dement y Kleitman, 1957). Esta categorización permitió la elaboración de una representación gráfica denominada hipnograma, la cual permitió determinar que la mayoría de los individuos analizados mantenían una estrecha regularidad en su patrón de sueño a lo largo de las noches. También, gracias a los estudios realizados en gatos, Dement pudo determinar que dichos animales mostraban un EEG con muchos periodos de ondas rápidas de bajo voltaje asociados con sacudidas de las extremidades y movimiento de las vibrisas y las orejas, los cuales eran alternados

regularmente con periodos dominados por ondas lentas y asociados con inmovilidad total de los animales (Dement, 1958). Por otro lado, un año más tarde Juvet y Michel mostraron que los gatos durante el sueño exhibían periodos de EEG similar al estado de alerta aunque con pérdida de tono muscular, tasas de respiración y cardiacas fluctuantes y ojos con movimientos bruscos y rápidos. Describieron que aunque los animales parecían estar profundamente relajados aparecían rastros de actividad en el cuerpo como temblor en las extremidades y movimientos rápidos de vibrisas. De esta forma, Juvet atinadamente nombró a este estado como “sueño paradójico” debido a que durante esta fase del sueño los animales paradójicamente muestran señales biológicas muy similares a las de un individuo despierto (Juvet, 1965). Actualmente es bien reconocido por la comunidad científica que el descubrimiento e identificación del sMOR o sueño paradójico es igualmente adjudicado tanto a Aserinsky, Kleitman y Dement como a Juvet y Michel.

CARACTERISTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LA VIGILIA Y LAS FASES DE SUEÑO

En la actualidad, un registro poligráfico permite definir y clasificar al sueño utilizando diversas herramientas como el EEG para observar las variaciones en la actividad eléctrica cortical y subcortical, el electrooculograma (EOG) para registro de movimientos oculares y el electromiograma (EMG) para registro de tono muscular. Otros parámetros que pueden registrarse son la frecuencia cardiaca y respiratoria así como la presencia, en ciertos animales, de actividad en regiones específicas del cerebro como las ondas ponto-geniculo-occipitales (PGO). A partir

de los datos del EEG se puede obtener un análisis del espectro de frecuencia. Este análisis utiliza una función matemática llamada Transformación de Fourier para convertir los datos del EEG y clasificarlos principalmente en 5 “ritmos” o bandas de frecuencia: 1) ritmo delta (0.5 - 3.9 Hz), 2) ritmo theta (4 – 7.9 Hz), 3) ritmo alfa (8 – 12.9 Hz), 4) ritmo beta (13 – 19.9 Hz) y 5) ritmo gamma (20 – 100 Hz). El sueño normal en el humano comprende dos estados, el sueño no MOR (NMOR) y el sMOR los cuales alternan cíclicamente a lo largo de un episodio de sueño o en otras palabras a lo largo de una noche de sueño. Convencionalmente el sueño NMOR es subdividido en tres etapas definidas por sus características electroencefalográficas. En la etapa 1, el EEG presenta actividad de bajo voltaje y una frecuencia que combina ritmos alfa y theta. Esta etapa usualmente persiste por pocos minutos (1 a 7) al inicio del sueño y está asociada con un bajo umbral de respuesta ya que aun percibimos la mayoría de los estímulos que suceden a nuestro alrededor. En la etapa 2, la actividad cerebral es predominantemente theta, son característicos de esta fase los husos de sueño (brotes de 0.5 a 2 segundos de actividad beta) y los complejos K (ondas bifásicas de gran amplitud). En la etapa 2 se necesita un estímulo más intenso para despertar, interesantemente el mismo estímulo que produciría un despertar en la etapa 1 a menudo origina un complejo K evocado en la etapa 2. La etapa 3 se caracteriza por presentar actividad de ondas lentas de gran voltaje, los investigadores a menudo se refieren a esta etapa como sueño de ondas lentas, sueño delta o sueño profundo. Por otra parte, el sMOR se caracteriza por actividad rápida de bajo voltaje, atonía muscular, movimientos oculares rápidos y pequeñas mioclonias en las extremidades (Figura 1) (Carskadon y Dement, 2005).

Etapas del sueño en el humano

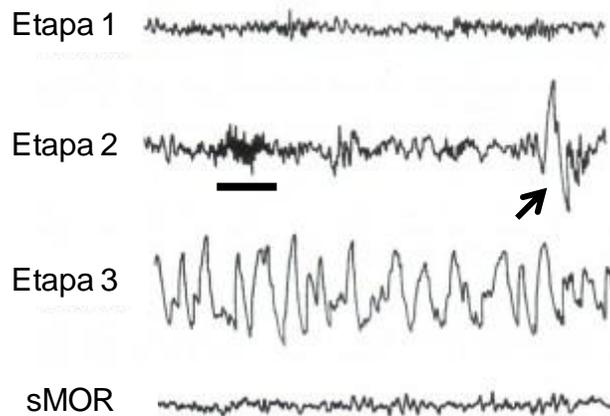


Figura 1. Etapas del sueño en humanos determinadas a partir del electroencefalograma (EEG). La etapa 1 se caracteriza por actividad rápida de bajo voltaje. En la etapa 2 se presentan los husos de sueño (línea horizontal) y los complejos K (flecha). La etapa 3 o sueño profundo está definida por ondas lentas de gran amplitud. En el sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR) se presentan ondas de bajo voltaje.

La investigación básica del sueño se ha llevado a cabo principalmente en dos modelos animales: ratas y gatos. A diferencia de los humanos, en las ratas el sueño NMOR o sueño de ondas lentas (SOL) no presenta subdivisión alguna, en los gatos algunos autores lo han clasificado en SOL 1 para el sueño ligero y SOL 2 para la presencia de ondas lentas de gran amplitud. Lo que es indudable es que tanto la vigilia como el SOL y sMOR presentan patrones conductuales y electrofisiológicos diferenciados.

a. Vigilia

En general, las ratas en vigilia presentan características conductuales particulares como cabeza erguida con respuestas rápidas a estímulos del medio ambiente, ojos abiertos y ritmo respiratorio rápido e irregular. La fase de vigilia se ha dividido en activa y pasiva. En la activa los animales presentan conductas típicas de su

especie y en la pasiva los animales permanecen quietos con los ojos abiertos y alertas a los estímulos significativos del medio ambiente por lo que presentan un umbral bajo para responder a cualquier estímulo sensorial. Durante la vigilia activa el EEG cortical muestra predominantemente actividad de bajo voltaje (40-60 μV) y alta frecuencia (35-50 Hz). El EMG exhibe alto tono muscular con brotes ocasionales de actividad de acuerdo con los movimientos del cuello y la cabeza. Dependiendo de la tasa y el tipo de actividad se pueden observar movimientos oculares representados en el EOG como espigas bifásicas con amplitudes ligeramente menores a las observadas en el sMOR. En el EEG hipocampal, la mayoría de las ondas registradas se encuentran en el rango de frecuencia entre 5 y 13 Hz y el ritmo theta bien definido aparece ocasionalmente. Durante la vigilia pasiva el EEG cortical no muestra diferencias notables con respecto a la vigilia activa y no se detecta ritmo theta en el EEG hipocampal. El tono muscular está marcadamente reducido e incluso llega a desaparecer dependiendo de la postura de la rata (Datta y Hobson, 2000).

b. Sueño de ondas lentas (SOL)

El SOL presenta patrones conductuales bien definidos, durante esta fase la rata asume una postura reclinada por lo general echada sobre el abdomen pero algunas veces enroscada y con los ojos cerrados. Se ha observado que la respiración se torna profunda y lenta, mientras que la presión arterial disminuye y el umbral para reaccionar a los estímulos se encuentra elevado en relación con la vigilia (Orem et al, 2002). El EEG cortical progresivamente disminuye su frecuencia e incrementa su amplitud, en general durante el SOL se presentan ondas de baja frecuencia (0.1-10 Hz) y gran amplitud (200-400 μV). El tono

muscular es mínimo y algunas veces ausente mientras que el EOG no muestra registro de movimientos oculares. En el EEG hipocampal no se registra ritmo theta ya que solo se pueden observar ondas lentas de gran amplitud. Finalmente, las ondas tipo PGO (denominadas ondas P en la rata) no son detectables en el registro pontino de esta fase del sueño (Datta y Hobson, 2000).

c. Sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR)

Inmediatamente antes del inicio de esta etapa del sueño las ratas usualmente asumen una posición denominada de ovillo. Durante este estado, aparecen movimientos rápidos de los ojos, orejas, vibrisas y extremidades además la respiración se vuelve irregular y con periodos cortos de apnea (Orem et al, 2002). El EEG cortical consiste de ondas de alta frecuencia (20-40 Hz) y baja amplitud (50-80 μ V). El EMG de los músculos de la nuca muestra atonía y el EOG registra movimientos oculares rápidos los cuales son unipolares y con amplitudes más altas que los registrados durante la vigilia. En el EEG hipocampal se observa solamente un ritmo sinusoidal en la frecuencia theta (4-8 Hz) mientras que las ondas P se hacen presentes en el registro del puente en racimos de 2-3 espigas hasta alcanzar un nivel de 35-60 ondas P por minuto (Figura 2) (Datta y Hobson, 2000).

La transición de SOL a vigilia tiene una duración corta y consiste en una disminución de la amplitud e incremento en la frecuencia de las ondas registradas en el EEG, precedida de un incremento abrupto del tono muscular; por otra parte, la transición de vigilia a SOL no muestra una clara sincronización ininterrumpida del EEG, sino que está marcada por la aparición episódica de husos de sueño. Las ondas lentas aparecen generalmente uno o varios minutos después de la

presentación de los husos. La transición de SOL a sMOR está marcada por un periodo corto, durante el cual el EEG está todavía sincronizado, aún sin indicios de atonía muscular pero con la presencia de ondas PGO (gatos) u ondas P (ratas) de gran amplitud.

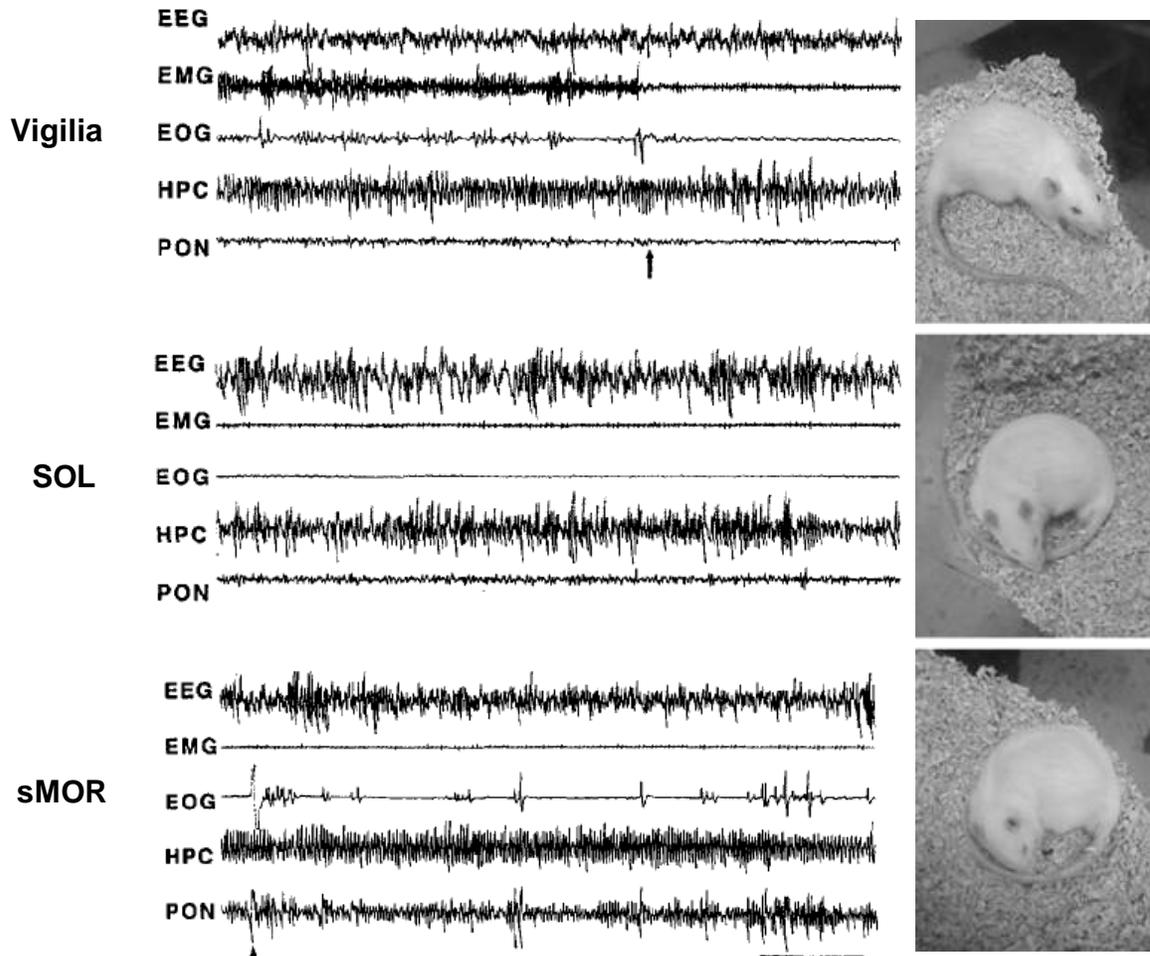


Figura 2. Registro poligráfico del electroencefalograma (EEG) cortical, electromiograma (EMG) de los músculos de la nuca, electrooculograma (EOG), EEG hipocampal (HPC) y pontino (PON) todos registrados simultáneamente en rata adulta. Los trazos caracterizan la vigilia, el sueño de ondas lentas (SOL) y el sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR). La flecha en el trazo de vigilia indica el final de la vigilia activa y el comienzo de la vigilia pasiva. La barra indica una escala de tiempo de 5 segundos. Tomada y modificada de Datta y Hobson, 2000.

Cuando el sMOR está completamente desarrollado, la desincronización cortical es evidente y el tono muscular se abate totalmente. Algunas funciones como la

respiración y el ritmo cardíaco disminuyen su frecuencia al transitar de la vigilia al SOL hasta presentar arritmias durante el sMOR. Incluso, la temperatura corporal también sigue un ritmo asociado con la vigilia y el sueño (Orem, 1980; Orem et al, 2002).

ESTUDIOS PIONEROS ACERCA DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL SUEÑO

Desde principios del siglo XX se comenzó a gestar el inicio del estudio del sueño gracias al desarrollo de nuevos métodos experimentales. Uno de los primeros trabajos que surgieron para tratar de describir los mecanismos de este fenómeno fueron los realizados por Legendre y Pieron en 1913. Estos reportaron que la inyección de líquido cefalorraquídeo (LCR) de perros privados de sueño en la cisterna magna de perros controles era capaz de incrementar el sueño. De esta forma, Pieron postuló que durante la vigilia prolongada se acumulaba cierta sustancia a la que nombró “hipnotoxina” y que era la responsable de la generación del sueño. Dichos resultados fueron reevaluados en 1939 por Schnedorf e Ivy obteniendo resultados positivos en solo 9 de 20 intentos. Sin embargo estos hallazgos fueron cuestionados debido a que las condiciones de obtención y transfusión de LCR causaban estrés severo tanto a los perros privados como a los controles. En 1967 Pappenheimer y cols llevaron a cabo una nueva evaluación del fenómeno descrito por Pieron pero con nuevas técnicas y bajo condiciones más controladas. De esta forma, describieron que el LCR de cabras privadas de sueño durante 72 horas inducía sueño profundo en gatos y ratas gracias a una molécula que denominaron “factor sueño” (Pappenheimer et al, 1967). Por otra parte, entre

1920 y 1930 el neurólogo Von Economo realizó una gran cantidad de estudios y reportó que los pacientes afectados por encefalitis letárgica presentaban entre otros síntomas claras alteraciones del sueño. Gracias al estudio anatómico de los cerebros de pacientes muertos por encefalitis, pudo observar que las lesiones asociadas con insomnio se localizaban al nivel de lo que ahora conocemos como hipotálamo anterior y su coyuntura con el cerebro anterior basal mientras que las lesiones asociadas con hipersomnolencia se encontraban en el hipotálamo posterior y su unión con el mesencéfalo rostral (Figura 3). De esta forma, Von Economo postuló la existencia de un centro regulador del sueño y dedujo por primera vez la existencia de distintos centros en el cerebro para la regulación del sueño y la vigilia (revisado en Triarhou, 2006).

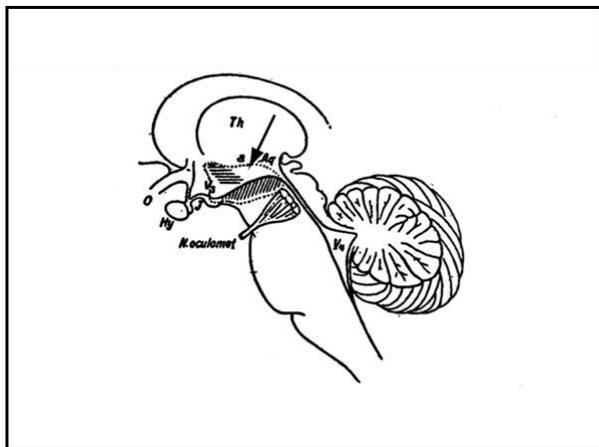


Figura 3. Esquema del tallo cerebral humano tomado del trabajo original de von Economo donde ilustra con líneas diagonales el sitio de lesión asociado con hipersomnolencia y localizado en el hipotálamo posterior y su unión con el mesencéfalo. Además de la lesión que causaba insomnio y localizada en el hipotálamo anterior (líneas horizontales). La flecha indicaba la región entre los dos sitios de lesión.

Siguiendo con la búsqueda de los mecanismos neurales involucrados en el control del ciclo sueño-vigilia, Bremer en los años treinta seccionó entre el bulbo y la

médula espinal (*encéphale isolé*) de gatos y observó que el animal se mantenía con una actividad cerebral normal y en el que se alternaban los periodos de sueño y de vigilia. Sin embargo, observó que cuando la sección se realizaba entre los colículos superior e inferior (*cerveau isolé*), se presentaba un estado de sueño total con la presencia de ondas lentas en la corteza. Basándose en sus experimentos, Bremer afirmó que el sueño resultaba por una interrupción mayor de las vías ascendentes o por la deafferentación cortical y concluyó que el sueño ocurría por la ausencia de estimulación sensorial (revisado por Kerkhofs y Lavie, 2000). Así, las primeras hipótesis de los neurofisiólogos consideraron al sueño como un estado pasivo opuesto a la vigilia. Con el descubrimiento del sistema reticular activador ascendente (SRAA) localizado en la formación reticular pontina y mesencefálica (Figura 4), la vigilia pasó a ser explicada en términos de un incremento en la actividad de este sistema y el sueño en términos pasivos del propio sistema. Esta hipótesis fue apoyada por los trabajos clásicos de Moruzzi y Magoun en los cuales estimularon la formación reticular en gatos anestesiados y observaron un fenómeno al que llamaron despertar electroencefalográfico caracterizado por una desincronización del EEG parecida a la observada en la vigilia. Asimismo, gracias a que la aplicación de diferentes estímulos sensoriales o mecánicos originaba desincronización del EEG, concluyeron que la actividad mantenida en el SRAA podría contribuir a la vigilia, mientras una reducción de dicha actividad podría precipitar la aparición del sueño (Moruzzi y Magoun, 1949).

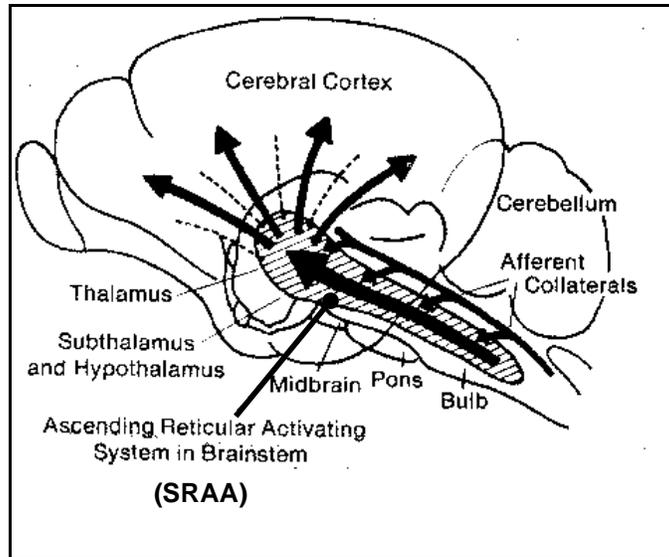


Figura 4. Esquema de la localización del sistema reticular activador ascendente (SRAA) en el cerebro de gato.

Sin embargo, para comprobar la existencia de un sistema activo inductor de sueño fue necesario producir un estado de insomnio por medio de una lesión que destruyera dicho sistema. Con este objetivo, se estableció que la lesión de la parte inferior del tallo cerebral producía un incremento en la vigilia y la aparición del registro electroencefalográfico característico de este estado conductual (Batini et al, 1958). Estos descubrimientos postularon así que las estructuras especializadas en la generación del sueño estaban localizadas en el tallo cerebral inferior. Para principios de los 60's se comenzaron a identificar regiones que, estimuladas, generaban sueño, como la región preóptica del hipotálamo y regiones adyacentes del cerebro anterior basal, así como la región del núcleo del tracto solitario; posteriormente se demostró que la activación de estas regiones inhibía el SRAA (Magnes et al, 1961; Serman y Clemente, 1962). Estos datos empezaron a mostrar que en el sistema nervioso central (SNC) hay regiones que activamente pueden generar sueño. De esta forma, para la década de los años 60's la mayoría

de los neurofisiólogos aceptaban la hipótesis de la existencia de mecanismos inductores de sueño los cuales podían activamente disminuir la actividad del SRAA. Fue en la misma década cuando se propone probablemente por primera vez la existencia de un sustrato neuroquímico para explicar la compleja naturaleza del sueño. Esta teoría fue apoyada por los trabajos realizados en gatos, en los que se observó que la aplicación de microcristales de acetilcolina o carbacol, una agonista colinérgico, a través de cánulas implantadas estereotáxicamente en varias regiones del cerebro producía un estado de sueño indistinguible desde los puntos de vista conductual y electroencefalográfico del sueño espontáneo. Es decir, el animal adoptaba la postura característica para dormir y se sucedían las dos etapas de sueño, empezando siempre por el sueño sincronizado o de ondas lentas al que se sucedían periodos de sueño desincronizado o con movimientos oculares rápidos junto con un aumento del umbral del despertar (Hernández-Peón, 1962; Hernández-Peón et al, 1963). Posteriormente, Jouvet (1969) planteó que los estados de sueño pueden ser modificados o suprimidos por drogas específicas o lesiones limitadas. Específicamente, describió que la inhibición de la síntesis de serotonina mediante la inactivación de la enzima triptófano hidroxilasa inducía un estado de insomnio total el cual podía ser revertido por la inyección de 5-hidroxitriptofano, el precursor directo de la serotonina. Asimismo, describió que la destrucción de las neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral podía suprimir tanto el SOL como el sMOR debido a una disminución de la serotonina cerebral. Estos estudios proporcionaron las bases para establecer la participación de algunos neurotransmisores y para determinar que la manipulación y alteración de dichas moléculas podrían correlacionar con cambios en los estados del sueño.

NEUROANATOMIA Y NEUROQUIMICA DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA

A lo largo de la historia se ha realizado una gran cantidad de trabajos para tratar de determinar las estructuras neurales y los sistemas neuroquímicos involucrados en la regulación del sueño y la vigilia. Los estudios actuales han proporcionado evidencia extensa acerca de la regulación del estado conductual, el cual es modulado por una serie de interacciones recíprocas que involucran múltiples sistemas neuronales neuroquímicamente distintos localizados a lo largo del cerebro. Por otra parte, se ha propuesto que el sueño es un estado muy frágil que fácilmente puede ser modificado o influenciado por una gran variedad de sustancias o manipulaciones experimentales, de hecho hoy en día se conocen varias moléculas de naturaleza peptídica, lipídica e incluso citocinas con propiedades hipnogénicas, las cuales se han denominado como “factores inductores de sueño” (Tabla 1) (García-García y Drucker-Colín, 1999; Garcia-Garcia et al, 2009). En general, estas moléculas difieren en muchos aspectos que van desde su naturaleza química y función hasta el efecto que tienen sobre el sueño. La pregunta que aun no ha sido esclarecida es si dichas sustancias actúan o intervienen en aquellos procesos neuroquímicos que normalmente regulan el sueño o si alteran el sueño únicamente en condiciones patológicas o inusuales.

Lo que sí está claro, es que dentro del tallo cerebral, cerebro anterior basal e hipotálamo existen varias poblaciones neuronales que promueven la vigilia mediante la acción de diferentes neurotransmisores como acetilcolina, noradrenalina, serotonina, histamina y orexina. Mientras que otras neuronas GABAérgicas y colinérgicas localizadas en núcleos específicos del hipotálamo y el tallo cerebral respectivamente, han sido involucradas en la iniciación y

mantenimiento del sueño. Estos sistemas neuroquímicos y sus interacciones reciprocas (Figura 5) mediante las cuales regulan la alternancia entre el sueño y la vigilia son analizados más detalladamente en el artículo de revisión presentado en el anexo 1 (Franco-Pérez J, Ballesteros-Zebadúa P, Custodio-Ramírez V, Paz C. Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia. Rev Inv Clin, 2011).

Tabla 1. Algunas moléculas determinadas como “factores inductores de sueño”

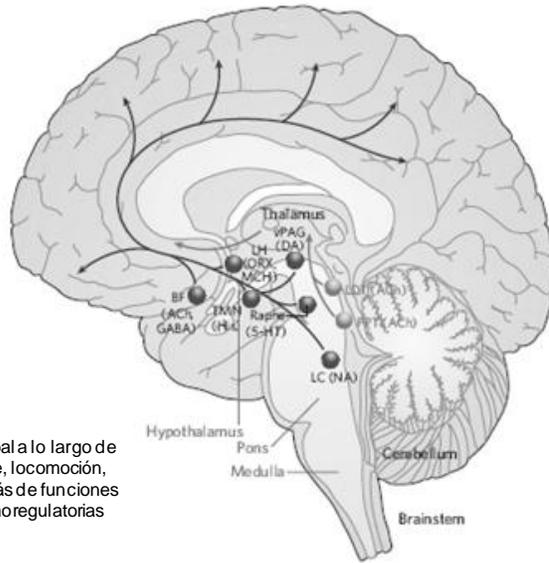
<i>Molécula</i>	<i>SOL</i>	<i>sMOR</i>	<i>Molécula</i>	<i>SOL</i>	<i>sMOR</i>
Insulina	↑	↑	VIP	=	↑
PRL	=	↑	DSPI	↑	=
GH	=	↑	CLIP	=	↑
CCK-8	↑	↑	IL-1	↑	=
Somatostatina	=	↑	INF- α	↑	=
CRF	=	↑	TNF	↑	=
GHRF	↑	=	Uridina	↑	=
Oleamida	↑	↑	Anandamida	↑	↑

= significa sin cambio y ↑ incremento

PRL: prolactina, GH: hormona del crecimiento, CCK-8: colecistoquinina, CRF: factor liberador de corticotropina, GHRF: factor liberador de hormona del crecimiento, VIP: péptido vasoactivo intestinal, DSPI: péptido inductor de sueño delta, CLIP: péptido intermediario de corticotropina, IL-1: interleucina 1, INF- α : interferon α , TNF: factor de necrosis tumoral

Tomada y modificada de García-García y Drucker-Colín, 1999 y Garcia-Garcia y cols, 2009.

A



Neurotransmisores clave:

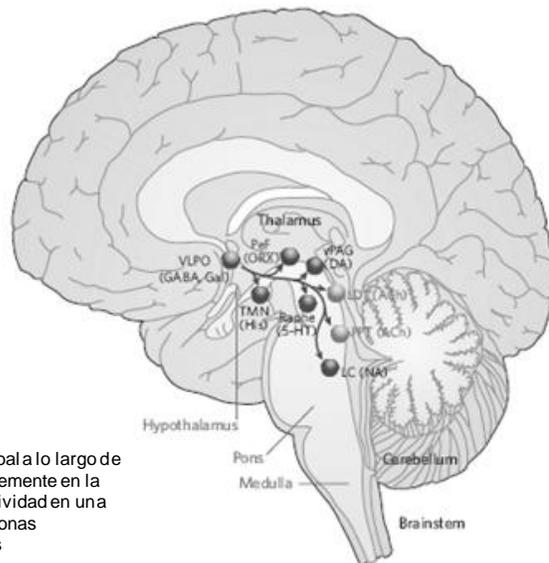
5-HT	
NA	
HIS	↑
ORX	
ACH	
<hr/>	
GABA	↓

Alta actividad neuronal global a lo largo de todo el cerebro, aprendizaje, locomoción, percepción sensorial además de funciones básicas autonómicas y termoregulatorias



Bajo voltaje, desincronizado

B



Neurotransmisores clave:

5-HT	
NA	
HIS	↓
ORX	
ACH	
<hr/>	
GABA	↑

Baja actividad neuronal global a lo largo de todo el cerebro, mas notablemente en la corteza y el tálamo. Alta actividad en una pequeña población de neuronas GABAérgicas hipotalámicas



Alto voltaje, sincronizado

Figura 5. Sistemas neuroquímicos participantes en la regulación de la vigilia y el sueño. A) durante la vigilia los sistemas monoaminérgicos, orexinérgicos y colinérgicos están activos y contribuyen a la desincronización del EEG por medio de sus proyecciones talámicas y corticales. B) durante el SOL las neuronas GABAérgicas del VLPO y mPO están altamente activas e inhiben a los núcleos activos durante la vigilia. 5-HT: serotonina, NA: noradrenalina, HIS: histamina, ORX: orexina, ACH: acetilcolina, GABA: ácido aminobutírico, LC: locus coeruleus, PPT: tegmento pedúnculo pontino, LDT: tegmento laterodorsal, TMN: núcleo tuberomamilar, BF: cerebro anterior basal, LH: hipotálamo lateral, VLPO: área preóptica ventrolateral, mPO: área preóptica media, EEG: electroencefalograma, SOL: sueño de ondas lentas. Tomado y modificado de Saper y cols, 2005.

INTRODUCCIÓN A LAS SINAPSIS ELÉCTRICAS

El manejo de la información en el sistema nervioso se sustenta en la comunicación entre las neuronas. Estas células establecen conexiones a las que Sherrington llamo sinapsis (proveniente de la palabra griega *synapse*, la cual significa “contacto”). Aunque Sherrington refinó el concepto y adoptó la palabra sinapsis a finales del siglo XVIII, no fue hasta principios del siglo XX que se desarrolló el esquema completo de las sinapsis involucrando neurotransmisores y receptores. La sinapsis ha sido definida como una estructura especializada que permite la interacción funcional entre dos neuronas y que posee características morfológicas y funcionales capaces de conducir y modular las señales eléctricas. En la actualidad se ha descrito la presencia en el sistema nervioso de dos tipos de sinapsis: químicas y eléctricas. Las sinapsis eléctricas fueron descritas por primera vez en 1959 por Furshpan y Potter después de estudiar las neuronas gigantes de cangrejo y en particular al examinar las conexiones entre las fibras laterales y las motoneuronas. Específicamente estos neurofisiólogos colocaron electrodos tanto en las fibras laterales como en las fibras motoras y aplicaron breves pulsos de corriente en una fibra para provocar potenciales de acción en la otra, ellos propusieron que si este sistema trabajaba con sinapsis químicas debería existir un retraso sináptico significativo en la respuesta. No obstante, descubrieron que el potencial de acción postsináptico surgía casi simultáneamente con la estimulación e incluso la aplicación de pequeñas corrientes en la fibra lateral inducía una respuesta equivalente en la fibra motora. Así, concluyeron que este fenómeno no podría estar ocurriendo bajo un sustrato de sinapsis químicas e infirieron que la corriente pasaba directamente entre los axones por un proceso de transmisión

eléctrica en el cual las corrientes locales podían atravesar directamente la membrana sináptica (Furshpan y Potter, 1959). Este tipo de conexión pronto fue denominada como “sinapsis eléctricas”. En un principio se asumió que estas sinapsis estaban limitadas a las demandas funcionales más simples del sistema nervioso de los invertebrados, sin embargo pronto se describió que podían ocurrir también en el cerebro de vertebrados (Bennett et al, 1963). Posteriormente, en 1967 se describió que el sustrato estructural de las sinapsis eléctricas eran las denominadas uniones estrechas (*gap junctions* en inglés) (Revel y Karnovsky, 1967), las cuales son poros que atraviesan la membrana y que no solo conducen corrientes eléctricas sino que permiten la difusión de moléculas entre el citoplasma de dos células.

Es bien sabido que la sinapsis química transfiere la actividad eléctrica de la neurona presináptica por medio de la difusión en la hendidura sináptica de un mensajero químico llamado neurotransmisor. Esta molécula se une a receptores específicos originando cambios en la permeabilidad iónica de la membrana plasmática y provocando una respuesta en la neurona postsináptica. En cambio, en las sinapsis eléctricas la comunicación se realiza por medio de un contacto directo entre las neuronas, lo que permite la libre conducción de iones entre los espacios citoplasmáticos además del acoplamiento eléctrico de las dos células (Figura 6). En otras palabras, las sinapsis químicas y eléctricas difieren en los mecanismos moleculares de transferencia de información y en su organización morfológica. En las sinapsis químicas no existe comunicación directa entre el citoplasma de las dos células y el espacio que separa las membranas pre- y postsinápticas mide aproximadamente 20-40 nm. En contraste, las sinapsis

eléctricas están caracterizadas por un área de estrecha aproximación (2-4 nm) entre las membranas de dos neuronas. Dentro de esta área de aproximación las células se comunican por medio de uniones estrechas, las cuales son canales transmembranales que comunican el espacio intracelular de las dos neuronas (Tabla 2).

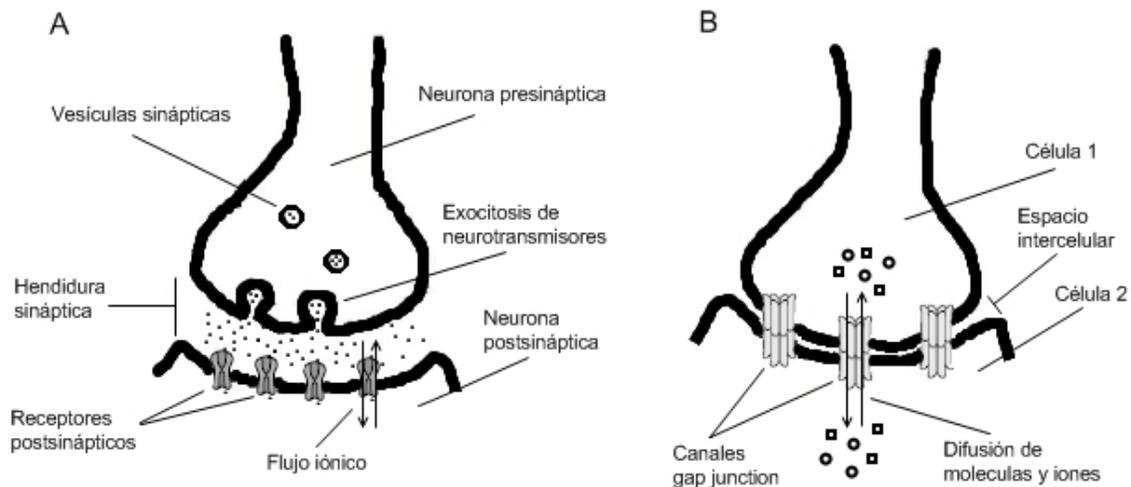


Figura 6. Principales características de los dos tipos de sinapsis presentes en el sistema nervioso: química y eléctrica. A) La sinapsis química transfiere la información mediante la exocitosis de neurotransmisores los cuales son liberados en la hendidura sináptica. Estas moléculas se unen a receptores específicos originando cambios en la permeabilidad iónica de la membrana plasmática y provocando una respuesta en la neurona postsináptica. B) En las sinapsis eléctricas la comunicación se realiza por medio de uniones estrechas, las cuales permiten el contacto entre las neuronas y la comunicación directa entre el citoplasma de dos células. A través de las uniones estrechas pueden difundir iones y pequeñas moléculas como metabolitos y segundos mensajeros.

La sinapsis eléctrica es también conocida como sinapsis electrotónica porque puede mediar el acoplamiento eléctrico entre las células y sus propiedades funcionales difieren considerablemente de las correspondientes a las sinapsis químicas. Gracias a su reciprocidad, velocidad y simplicidad, las sinapsis eléctricas son características únicas de los circuitos neuronales en el cerebro.

Tabla 2. Principales diferencias entre las sinapsis químicas y eléctricas

Sinapsis químicas	Sinapsis eléctricas
Hendidura sináptica, distancia entre membranas 20-40 nm	No existe hendidura sináptica, presencia de uniones estrechas
Sin continuidad citoplasmática	Existe continuidad citoplasmática
Transmisión mediada por neurotransmisores	Paso directo de corriente iónica
Unidireccional	Bidireccional
Retraso sináptico	Ausencia de retraso sináptico

ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LAS SINAPSIS ELÉCTRICAS

El sustrato estructural de las sinapsis eléctricas son las uniones estrechas, las cuales han sido estudiadas de manera más precisa gracias al desarrollo de técnicas inmunocitoquímicas y de microscopía por fractura en congelación. El término uniones estrechas deriva de estudios histológicos realizados en los años 60's y en los cuales se describe su apariencia mediante observaciones de microscopía electrónica e incubaciones con metales pesados (Revel y Karnovsky, 1967). Las uniones estrechas son regiones especializadas de contacto intercelular las cuales están formadas por hexámeros denominados conexones. Los conexones se acoplan formando canales intercelulares permitiendo el intercambio de nutrientes, metabolitos, iones y pequeñas moléculas de hasta 1 kDa (Loewenstein, 1981). Estos canales intercelulares son denominados como homotípicos cuando los dos conexones tienen la misma composición molecular, o heterotípicos cuando los conexones difieren entre sí. Cada conexón es un

ensamble de seis subunidades proteicas llamadas conexinas (Cx's). Las Cx's son una familia de proteínas constituida por 20 miembros en el ratón y 21 en el humano, las cuales son distinguidas de acuerdo con su peso molecular (por ejemplo, la Cx36 tiene una masa molecular de aproximadamente 36 kDa) y son expresadas en una gran variedad de tejidos incluido el sistema nervioso donde diferentes tipos celulares a menudo expresan diferentes tipos de Cx's (Tabla 3) (Beyer et al, 1990; Rackauskas et al, 2010).

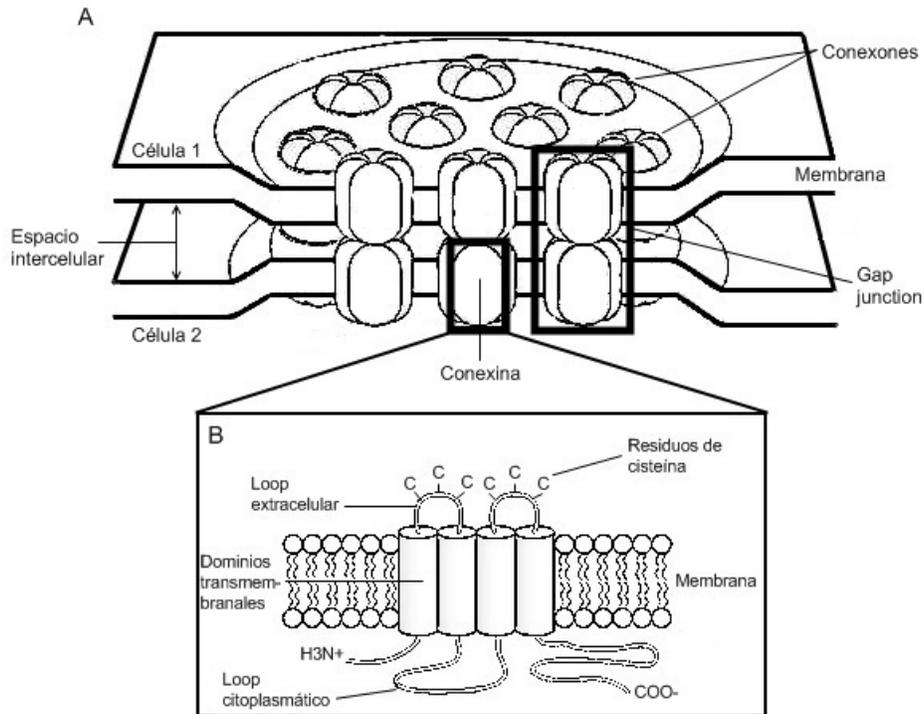
Tabla 3. Patrones de expresión de las Cx's en ratón y humano

Humano	Ratón	Expresión	Humano	Ratón	Expresión
Cx23	Cx23	ND	Cx36	Cx36	Neuronas, retina
Cx25		ND	Cx37	Cx37	Ovario, piel, endotelio
Cx26	Cx26	Piel, cóclea, placenta, mama, páncreas, glía	Cx40	Cx40	Piel, corazón, endotelio, pulmón, sistema nervioso
Cx30	Cx30	Piel, cerebro, cóclea, epitelio aéreo	Cx40.1	Cx39	Músculo
Cx31.3	Cx29	Hígado, páncreas, riñón, oligodendrocitos	Cx43	Cx43	Astrocitos, 34 tejidos, 46 tipos celulares
Cx30.3	Cx30.3	Piel, riñón	Cx45	Cx45	Piel, osteoblastos, retina, útero, corazón
Cx31	Cx31	Piel, cóclea, placenta, epitelio aéreo	Cx46	Cx46	Cristalino, epitelio alveolar
Cx31.1	Cx31.1	Piel	Cx47	Cx47	Cerebro, medula espinal oligodendrocitos
Cx31.9	Cx30.2	Corazón, cerebro	Cx50	Cx50	Cristalino
Cx32	Cx32	Hígado, piel, endometrio oligodendrocitos,	Cx58		ND
	Cx33	Testículos	Cx62	Cx57	Retina, ovocitos

ND: No determinado, Tomada y modificada de Rackauskas y cols, 2010.

El análisis estructural de varias Cx's propone que cada una contiene cuatro dominios transmembranales denominados M1, M2, M3 y M4 procedentes desde el N-terminal hacia el C-terminal. Se ha determinado que los dominios transmembranales se conectan por medio de dos *loops* extracelulares (E1, conectando M1-M2 y E2, conectando M3 a M4) y un *loop* citoplasmático que enlaza los dominios M2 y M3. Una característica singular es la presencia de tres residuos de cisteína en los *loops* extracelulares. Tanto el C-terminal como el N-terminal residen en el citoplasma (Figura 7). Además, se ha observado que las secuencias más conservadas son los dominios transmembranales y los *loops* extracelulares. Por el contrario, los dominios más variables, tanto en longitud como en secuencia, son el citoplasmático C-terminal y el *loop* que conecta M2 y M3 (Yeager y Harris, 2007). Las Cx's no son las únicas proteínas que forman canales en las sinapsis eléctricas del sistema nervioso. A finales de los años 90's, se demostró la presencia de proteínas estructurales de uniones estrechas en invertebrados, las cuales fueron llamadas *inexinas* (Phelan et al, 1997). Aunque las Cx's y las *inexinas* no tienen homología en su secuencia primaria de aminoácidos, sorprendentemente presentan algunas características similares como los cuatro dominios transmembranales y la presencia de residuos de cisteína en los dos *loops* extracelulares (Scemes et al, 2009). Recientemente, se demostró la presencia de proteínas homólogas de *inexinas* en diferentes grupos taxonómicos incluyendo los mamíferos. Dada la amplia distribución de estas moléculas en el reino animal, estas proteínas fueron llamadas *panexinas* (proveniente del latín *pan* que significa todo y *nexus* que significa conexión) y se establecieron como una familia que incluye a sus proteínas homólogas de

invertebrados (Panchin et al, 2000). Tanto el genoma humano como el de ratón codifican para tres isoformas de panexinas (Panx's). En mamíferos, la Panx1 es ubicua pero se presenta ampliamente en el SNC en diferentes tipos neuronales como las células piramidales del hipocampo y motoneuronas espinales (Zappala et al, 2006). La Panx2 es un gene específico del cerebro y la Panx3 se expresa principalmente en osteoblastos y fibroblastos sinoviales (Baranova et al, 2004). La principal evidencia de la funcionalidad de las Panx's fue descrita en el 2003 por Bruzzone y colaboradores quienes demostraron que la presencia de Panx1 sola y en combinación con Panx2 induce la formación de canales intercelulares en ovocitos pareados. Sin embargo, aún no es claro si las Panx's comparten funciones con las Cx's en las uniones estrechas o si tienen un papel fisiológico específico.



C

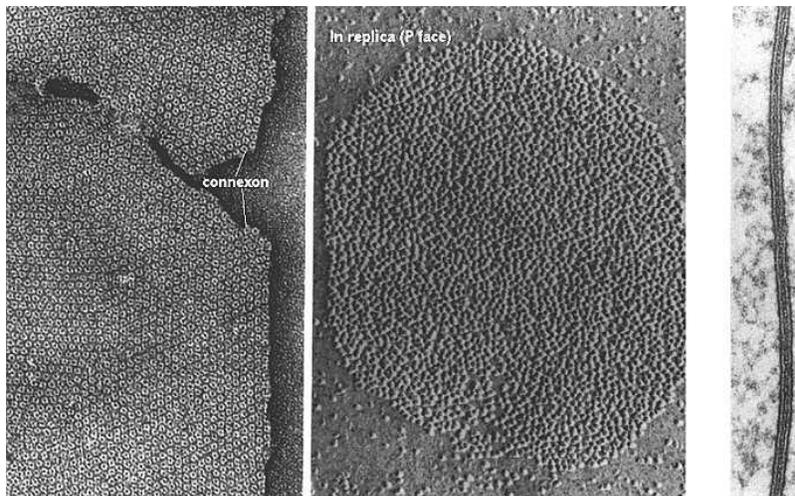


Figura 7. Estructura y organización molecular de las uniones estrechas. A) Las uniones estrechas son regiones especializadas de comunicación intercelular las cuales están formadas por hexámeros denominados conexones. Cada conexón representa un ensamble de seis subunidades proteicas llamadas conexinas. B) Cada conexina contiene cuatro dominios transmembranales, los cuales se conectan por medio de un *loop* citoplasmático y dos *loops* extracelulares caracterizados por la presencia de tres residuos de cisteína. Tanto el C- como el N-terminal residen en el citoplasma. C) Micrografía obtenida por fractura en congelación en donde se observan conexones desde el lado interno de las uniones estrechas (izq), el lado citoplasmático de una placa de uniones estrechas (centro) y dos membranas plasmáticas comunicadas por uniones estrechas (der).

DISTRIBUCIÓN DE CX'S EN EL CEREBRO

La localización de las sinapsis eléctricas en el cerebro ha sido extrapolada a partir de la determinación de los patrones de expresión de las Cx's. Aproximadamente la mitad de las isoformas de Cx's están presentes en el SNC de mamíferos. La Cx26, Cx30 y Cx43 están fuertemente expresadas en astrocitos y la Cx29, Cx32 y Cx47 se han observado en oligodendrocitos, sin embargo las Cx's mencionadas no presentan un patrón de expresión en las neuronas (Rash et al, 2001). La expresión de la Cx26, Cx30 y Cx43 es altamente heterogénea a lo largo del SNC, existen algunas estructuras que presentan abundancia de las tres Cx's (áreas subcorticales) y otras que contienen muy pocos niveles de Cx26 y moderados de Cx30 (corteza cerebral). Incluso, la Cx30 no es detectable en regiones como la comisura anterior y la cápsula interna, lo que indica que los astrocitos de la materia blanca no expresan esta Cx (Nagy et al, 1999). Durante algún tiempo se reconoció que la Cx47 tenía un patrón de expresión neuronal; sin embargo, recientemente se demostró de manera convincente que la Cx47 no es expresada por neuronas pero si por oligodendrocitos. En estas células la distribución es principalmente en el soma, donde aparece colocalizada con la Cx32 y asociada con Cx's astrocíticas derivadas de uniones estrechas entre astrocitos y oligodendrocitos (Li et al, 2003). La identidad de las Cx's expresadas en las neuronas ha sido controversial y persisten las discrepancias respecto a la distribución de varias Cx's. Es un hecho que pocas Cx's han superado estudios más estrictos que han combinado aspectos bioquímicos, moleculares e inmunocitoquímicos con aproximaciones genéticas basadas en la expresión de un gene reportero (por ejemplo el gene LacZ). De acuerdo con estudios realizados

utilizando Northern blot, se ha determinado la presencia de Cx45 en el cerebro adulto de roedores. La inmunofluorescencia de corteza e hipocampo mostró que dicha Cx está asociada con oligodendrocitos. Sin embargo, la utilización de LacZ como índice de expresión del gen, presumiblemente reveló que la Cx45 es abundante en tejidos neuronales neonatales y en animales adultos, principalmente en las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, en las capas II y IV de la corteza cerebral entorrinal, en tálamo y en el cerebelo (Maxeiner et al, 2003).

Por otro lado, la caracterización inicial de la Cx36 reveló que está expresada principalmente en neuronas de diversas estructuras del SNC, además los resultados de un estudio comparativo de expresión indicaron que la distribución de Cx36 en humanos y ratas es muy similar (Condorelli et al, 1998). La Cx36 está ampliamente expresada en neuronas de la médula espinal y de las siguientes regiones del cerebro de la rata: complejo olivar inferior, tallo cerebral, cerebelo, mesencéfalo, hipotálamo, núcleo reticular talámico, núcleo habenular, glándula pineal, ganglio basal, septum, cerebro anterior basal, amígdala, corteza piriforme, corteza cerebral, bulbo olfatorio y retina. La Cx36 también es expresada considerablemente en las células piramidales de la región CA3 y en las interneuronas gabaérgicas localizadas en varias capas de las regiones CA1, CA2 y el giro dentado del hipocampo (Tabla 4) (Condorelli et al, 2000; Rash et al, 2000). De esta forma, la identificación de la Cx36 así como de otros miembros de la familia de las Cx's y la demostración de su expresión preferencial en el cerebro ha marcado el comienzo de una nueva etapa en la investigación acerca del papel fisiológico central de las uniones estrechas en el SNC.

Tabla 4. Principales Cx's expresadas en el sistema nervioso central

Tipo celular	Cx's	Regiones
Neuronas	Cx36	Médula espinal, complejo oliva inferior, tallo cerebral, cerebelo, hipotálamo, núcleo reticular talámico, núcleo habenular, glándula pineal, ganglio basal, septum, cerebro anterior basal, amígdala, corteza cerebral, bulbo olfatorio, locus coeruleus, tegmento pedúnculo pontino, hipocampo, retina
	Cx45	Hipocampo, corteza entorrinal, tálamo, cerebelo
Astroцитos	Cx26, Cx30, Cx43	Todo el cerebro
Oligodendrocitos	Cx29, Cx32, Cx47	Todo el cerebro
Microglia	Cx36, Cx43	Todo el cerebro

Tomada y modificada de Oyamada y cols, 2005

PAPEL DE LA CX36 Y CX43 EN EL SNC

Las oscilaciones rítmicas o los llamados ritmos cerebrales son una propiedad del acoplamiento eléctrico entre varias poblaciones neuronales las cuales de acuerdo a sus características sinápticas tienen la capacidad de sincronizar sus patrones de actividad en alguna frecuencia determinada. Es muy probable que las sinapsis eléctricas sean un mecanismo común para regular la sincronía dentro de redes neuronales en el cerebro. La hipótesis acerca de la señalización eléctrica a través de las uniones estrechas como un mecanismo determinante en la sincronización de la actividad neuronal es reciente y últimamente ha sido objetivo de muchos estudios. Aunque la transmisión química excitatoria e inhibitoria podría ser

suficiente para sincronizar la actividad oscilatoria, se ha establecido que dicha actividad cambia su estructura en ausencia de uniones estrechas (Hormuzdi et al, 2004). Debido a que el tamaño de los poros formado por las Cx's en las uniones estrechas es relativamente grande (16-20 Å de diámetro) estos pueden transmitir corrientes iónicas y el paso de segundos mensajeros como inositol-1,4,5-trifosfato y AMP cíclico. Así, las sinapsis eléctricas al permitir el paso de corrientes iónicas pueden provocar cambios en el potencial de membrana de las neuronas vecinas; si la corriente transmitida es suficiente para despolarizar la membrana se activan canales iónicos cerrados por voltaje lo que lleva a la generación de potenciales de acción. La transmisión eléctrica por medio de las uniones estrechas puede ser bidireccional porque el flujo iónico puede ocurrir libremente entre las dos células. De esta forma, la velocidad y reciprocidad del estímulo a través de las sinapsis eléctricas son ventajas que favorecen la sincronización neuronal y por lo tanto la actividad oscilatoria (Hormuzdi et al, 2004).

La actividad oscilatoria ocurre a diferentes frecuencias y ha sido registrada en varias regiones como el bulbo olfatorio, hipocampo, tálamo, corteza y cerebelo. Las oscilaciones reflejan la sincronización temporal de la actividad de poblaciones neuronales y se ha sugerido que dicha coordinación es un mecanismo involucrado en varios aspectos del aprendizaje, memoria y conducta. Asimismo, la actividad oscilatoria en algunas bandas de frecuencia específica está relacionada con diferentes estados conductuales. Por ejemplo, se ha demostrado que en la formación hipocampal las oscilaciones theta (4-8 Hz) y gamma (20-100 Hz) se presentan durante la vigilia activa principalmente en periodos de exploración y durante el sMOR, mientras que las oscilaciones ultrarrápidas (140-200 Hz) se

observan en periodos de vigilia pasiva (Buzsaki et al, 2003; Steriade, 2003). Algunos estudios han usado modelos de actividad theta inducida por carbacol (agonista colinérgico) en rebanadas de hipocampo y han demostrado que dichas oscilaciones se inhiben completamente con el uso de bloqueadores de uniones estrechas formadas específicamente por Cx36 (Konopacky et al, 2004). La demostración del bloqueo de la actividad theta por medio de bloqueadores de uniones estrechas sugiere puntualmente que el acoplamiento eléctrico es un mecanismo sincronizador necesario para la actividad theta inducida colinérgicamente. Recientemente, otro estudio realizado con gatos en libre movimiento demostró que tanto la administración intraperitoneal como intrahipocampal de quinina disminuye la amplitud y el espectro de potencia de la actividad theta hipocampal (Golebiewski et al, 2006). Gracias al bloqueo de canales formados por Cx36 por medio de quinina, se ha podido evidenciar la contribución de estas proteínas en el acoplamiento eléctrico y en la generación del ritmo theta hipocampal. Por otra parte, Traub et al (2000) utilizaron un modelo de actividad gamma generada en la región CA3 del hipocampo y demostraron que dicha actividad es bloqueada reversiblemente por octanol, otro bloqueador de uniones estrechas. Esto confirmó que las oscilaciones gamma son en parte dependientes de la comunicación por medio de sinapsis eléctricas. La reciente generación de ratones knockout de la principal Cx neuronal, la Cx36, ha permitido un abordaje diferente para analizar la participación de las uniones estrechas en los patrones oscilatorios. Con esta herramienta se determinó la ausencia de acoplamiento eléctrico entre las interneuronas del CA3 y el giro dentado de ratones knockout de Cx36. De igual forma, la deficiencia de Cx36 originó una

disminución del espectro de potencia de la actividad gamma producida por kainato y carbacol en la región CA3 del hipocampo (Figura 8) (Hormuzdi et al, 2001). Estas observaciones en ratones manipulados genéticamente indican que la falta de Cx36 se refleja en la carencia de acoplamiento eléctrico y por lo tanto en la alteración de las oscilaciones gamma. Por otro lado, el núcleo reticular talámico es una delgada capa de neuronas inhibitorias que rodea al núcleo de relevo del tálamo dorsal. Las neuronas de este núcleo reciben sinapsis excitatorias de colaterales talamocorticales y corticotálamicas y sus blancos primarios son las neuronas talámicas de relevo. Toda esta interacción excitatoria e inhibitoria le permite influir en la actividad del sistema talamocortical completo (Ohara, 1988). Los llamados husos de sueño aparecen en el EEG en forma de brotes y con una duración de 1-2 segundos, hace algunos años se determinó que el marcapasos de esta actividad oscilatoria se sitúa en el núcleo reticular talámico. Incluso, se ha demostrado que las neuronas talámicas tienen propiedades electrofisiológicas que generan descargas de potenciales de acción con frecuencia delta (1-4 Hz) y que pueden contribuir a generar el patrón de ondas lentas del EEG (Steriade et al, 1991). Los mecanismos de generación de oscilaciones y sincronización dentro del núcleo reticular talámico aún no están completamente descritos; sin embargo, se ha propuesto que este núcleo puede sincronizar su actividad rítmica mediante sinapsis gabaérgicas y acoplamiento eléctrico. La primera evidencia se describió en un estudio *in vitro* en donde se mostró que la mayoría de las neuronas en este núcleo están eléctricamente acopladas. Mediante el uso de registros pareados, los cuales son útiles para determinar si la actividad de una célula puede influir en el patrón de disparo de otra, se determinó que no existe acoplamiento eléctrico entre

neuronas del núcleo reticular talámico de ratones knockout de la Cx36 (Landisman et al, 2002). Estos resultados sugieren que el acoplamiento eléctrico entre neuronas de este núcleo requiere de uniones estrechas formadas por Cx36. En conclusión, el cerebro se caracteriza por presentar actividad rítmica diversa la cual está relacionada con procesos de percepción, memoria y conciencia. Estos procesos parecen ser el resultado de la sincronización de redes neuronales y existe una gran cantidad de evidencia que apunta hacia las sinapsis eléctricas formadas por Cx36 como un mecanismo regulador de la sincronización dentro de redes neuronales en el cerebro.

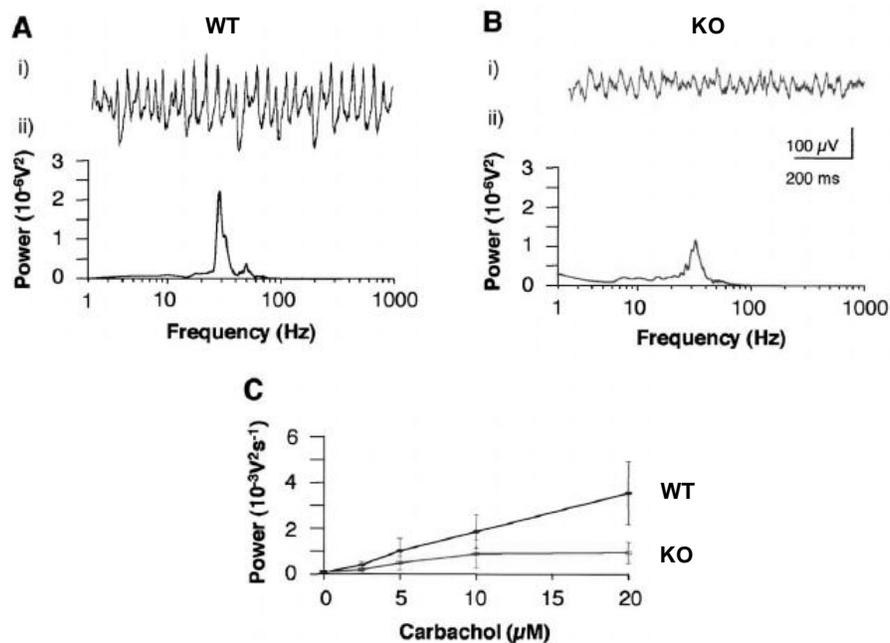


Figura 8. Efectos de la deficiencia de Cx36 en la actividad gamma inducida por carbachol en el hipocampo. A) En los ratones silvestres (WT) el carbachol induce una oscilación persistente en la frecuencia gamma (20-100 Hz), B) el espectro de potencia de la actividad gamma se encuentra disminuido en los ratones knockout para Cx36 (KO). C) Relación entre la concentración de carbachol y el espectro de potencia de la actividad gamma en ratones WT y KO. Tomada y modificada de Hormuzdi y cols, 2001.

Por otra parte, en el SNC el acoplamiento mediante uniones estrechas ocurre entre neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglia y células ependimales. Bajo condiciones fisiológicas las uniones estrechas funcionan en un estado abierto permitiendo la comunicación intercelular, pero si los conexiones de una célula no están acoplados con los conexiones de otra célula son denominados como hemicanales los cuales regularmente se encuentran cerrados al paso de sustancias. Como se mencionó anteriormente existen varias Cx's identificadas en tipos celulares del SNC; de todas estas, la Cx43 se expresa de manera ubicua y se localiza predominantemente en los astrocitos (Nagy y Rash, 2000). En particular los astrocitos están involucrados en el amortiguamiento espacial de los iones de potasio extracelular, glutamato, moléculas de señalización y fuentes de energía así como en la mediación de la señalización de calcio intercelular (Wallraff et al, 2006; Hansson et al, 2000; Deneil y Cruz, 2003). Gracias a todos estos papeles, la red funcional formada por astrocitos comunicados intercelularmente por medio de Cx43 ha sido implicada en el mantenimiento de la homeostasis del medio extracelular de las neuronas. Se ha propuesto que la Cx43 puede ser un mediador importante en el daño al SNC; estudios *in vitro* han confirmado que las uniones estrechas y hemicanales astrocíticos formados por Cx43 pueden permanecer funcionalmente abiertos después de algún daño o lesión, asimismo *in vivo* se han demostrado cambios espaciales y temporales significativos de la expresión proteica de Cx43 en varios modelos de daño al SNC (revisado en Chew et al, 2010). Existe debate acerca de si la comunicación por medio de uniones estrechas y hemicanales formados por Cx43 son mediadores en la neuroprotección o neurodestrucción. Por una parte se ha propuesto que a través

de este tipo de comunicación se podría permitir el paso de factores nocivos, como iones de calcio y glutamato, desde células dañadas hacia células vecinas sanas y de esta forma se favorecería el amortiguamiento de metabolitos tóxicos por las células sanas y por lo tanto la neuroprotección (Farahani et al, 2005). El punto de vista opuesto propone que mediante las uniones estrechas se permite la liberación de ATP y la propagación de toxinas y señales de muerte desde células dañadas hasta otras células vecinas sanas y de esta forma se extiende la zona de daño o neurodestrucción (revisado en Chew et al, 2010). En general, los papeles que juegan las uniones estrechas y por lo tanto las Cx's en la sincronización neuronal y en la homeostasis de los tejidos las proyecta como elementos esenciales para el correcto funcionamiento del SNC.

SUEÑO, SINAPSI ELÉCTRICAS Y CX'S

Desde hace mucho tiempo, uno de los principales temas a elucidar ha sido la regulación del sueño y especialmente el sMOR. Para resolver este problema varios trabajos se han enfocado en el estudio de algunos neurotransmisores, estructuras cerebrales y la interacción recíproca entre varios grupos neuronales activos durante la vigilia y durante el sueño. Los primeros modelos acerca de la regulación del sMOR enfatizaron las interacciones en el tallo cerebral entre neuronas colinérgicas del campo tegmental gigantocelular pontino y neuronas monoaminérgicas del locus coeruleus (LC) y del núcleo del rafé. De esta forma, en 1975 Hobson et al, propusieron un modelo de interacción recíproca basado en la existencia de un circuito generador de sMOR. Este modelo estaba basado en el hecho que durante el sMOR las neuronas colinérgicas (REM-on) incrementan su

tasa de disparo mientras que las neuronas monoaminérgicas (REM-off) prácticamente cesan su actividad. Así, se propuso que cuando el sistema monoaminérgico está tónicamente activo tiene la capacidad de inhibir la actividad del sistema colinérgico y de esta forma impedir la aparición de sMOR. Por el contrario, cuando la actividad del núcleo del rafé y el LC disminuye, se activan los núcleos colinérgicos y se promueve la generación de sMOR (Figura 9A).

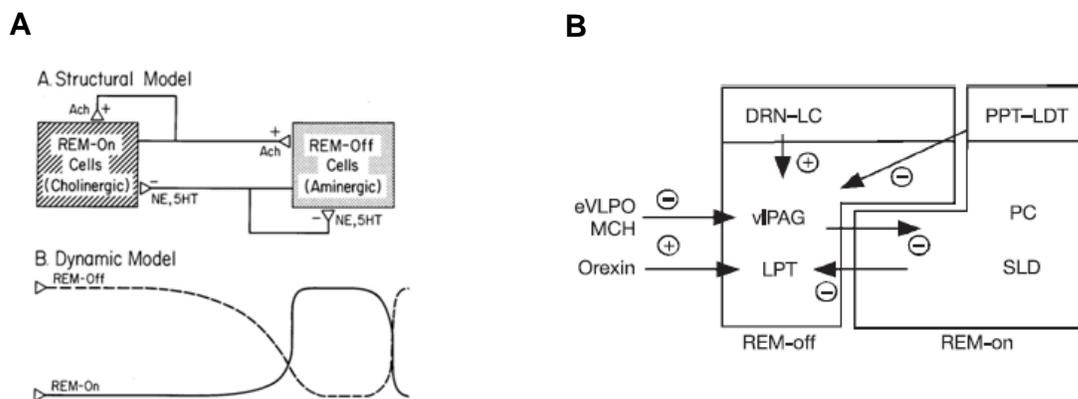


Figura 9. Modelos propuestos para la regulación del sMOR. A) Primer modelo propuesto por Hobson en 1975 en el cual la regulación se basa en la interacción entre grupos neuronales colinérgicos y monoaminérgicos. B) Modelo del interruptor “flip-flop” (Lu, 2006) en donde la región REM-off es identificada por la convergencia de entradas desde las neuronas orexinérgicas y el área preóptica ventrolateral (VLPO). Las neuronas REM-off de la parte ventrolateral de la sustancia gris periacueductal (VIPAG) y del tegmento pontino lateral (LPT) tienen una interacción inhibitoria mutua con neuronas GABAérgicas REM-on del núcleo sublaterodorsal (SLD) y la región precoeruleus (PC). Neuronas colinérgicas del PPT y LTD son REM-on y pueden inhibir la actividad del LPT, por el contrario neuronas serotoninérgicas del rafé dorsal (DRN) y noradrenérgicas del locus coeruleus (LC) pueden activar el circuito REM-off. Tomada y modificada de Hobson et al, 1975; Lu et al, 2006.

En contraste a este primer modelo el cual enfatizaba principalmente interacciones de neuronas monoaminérgicas y colinérgicas, Lu y colaboradores (2006) propusieron un nuevo modelo en donde el principal mecanismo para la generación de sMOR añadía interacciones recíprocas entre poblaciones de neuronas

GABAérgicas REM-on y REM off localizadas en el tegmento mesopontino. Gracias al uso de trazadores anterogrados identificaron regiones REM-off localizadas en la parte ventrolateral de la sustancia gris periacueductal y en el tegmento pontino lateral, así como regiones REM-on situadas en el núcleo sublaterodorsal y en la región precoeruleus (PC). Aunque en este modelo las neuronas colinérgicas del tegmento pedúnculo pontino (PPT) y laterodorsal (LTD) y las monoaminérgicas del LC y el núcleo del raquí no son los elementos centrales, aun conservan un importante papel modulador tanto de las neuronas REM-off como de las REM-on (Figura 9B).

Recientemente se ha propuesto que existe la presencia de sinapsis eléctricas en las neuronas del PPT y el PC. Registros electrofisiológicos pareados de neuronas del PPT y el PC han indicado que dichas neuronas están eléctricamente acopladas. Se ha demostrado que en presencia de tetrodotoxina, para bloquear la transmisión sináptica química, los pulsos hiperpolarizantes aplicados a una neurona inducen una corriente en la otra y viceversa. Incluso, se ha mostrado que el carbacol induce actividad rítmica en el PPT y el PC la cual puede ser eliminada por la aplicación de bloqueadores de uniones estrechas. Por otro lado, el análisis por western blot ha revelado la expresión de Cx36 en el PPT y el PC la cual disminuye durante el desarrollo postnatal temprano pero conservando niveles considerables en el adulto, lo anterior ha llevado a sugerir que dicha proteína puede participar en la regulación postnatal del SMOR y contribuir al control del ciclo sueño-vigilia en el adulto (García-Rill et al, 2007). Otros estudios han evaluado la actividad rítmica en el LC el cual es un núcleo pontino relevante para la regulación de la vigilia y determinaron que existe acoplamiento eléctrico en

neuronas y astrocitos (Alvarez-Maubecin et al, 2000), que la actividad sincrónica de dicho núcleo es resistente a tetrodotoxina y antagonistas noradrenérgicos pero que puede ser inhibida por agentes bloqueadores de uniones estrechas (Ishimatsu y Williams, 1996) y finalmente que existe la presencia abundante de Cx36 y Cx43 en neuronas y glía respectivamente (Van Bockstaele et al, 2004).

Por otra parte, se ha descrito que los astrocitos pueden ser activados por neurotransmisores liberados de sinapsis adyacentes y que estos a su vez pueden modular la actividad sináptica neuronal liberando transmisores químicos mediante un proceso llamado gliotransmisión (Pascual et al, 2005). Una de las sustancias primarias liberadas por los astrocitos es el ATP que posteriormente puede ser convertido a adenosina por acción de ectonucleotidasas en el espacio extracelular. Se ha demostrado que la conversión de tan solo el 1% de ATP puede resultar en un incremento significativo de la concentración de adenosina extracelular (revisado en Dunwiddie y Masino, 2001). De esta forma, la adenosina puede actuar sobre los receptores A1 y/o A2 neuronales para tónicamente inducir una supresión de la transmisión sináptica (Newman, 2003). Esta retroalimentación neurona-glía-neurona origina una atenuación de la excitabilidad neuronal la cual puede ser relevante para el sueño y su regulación, ya que la adenosina es un factor homeostático endógeno que se acumula durante la privación de sueño y que probablemente promueve y regula el sueño que se presenta después de la vigilia prolongada (Porkka-Heiskanen et al, 1997; Basheer et al, 2004). Evidencia obtenida en los últimos años ha mostrado que los hemicanales formados por Cx's exhiben aperturas de corta duración permitiendo una liberación controlada de moléculas citosólicas. Un metabolito importante es el ATP, el cual está presente

en concentraciones milimolares en el citosol y es suficientemente pequeño para permear a través de algunos hemicanales (Bennett et al, 2003). Interesantemente, hace algunos años se propuso que los hemicanales podían estar regulando la liberación de ATP, sin embargo hasta hace poco se observó *in vitro* que el flujo de ATP coincide con las aperturas de hemicanales formados por Cx43 y por el contrario que el flujo desaparece cuando dichos canales están cerrados. Así, estos experimentos han sugerido que los hemicanales formados por Cx43 son permeables a ATP (Kang et al, 2008) y de esta forma este proceso parece relacionar a la Cx43 con la homeostasis del sueño.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque existen muy pocos estudios que abordan directamente el tema, se ha propuesto que la presencia de sinapsis eléctricas en algunos núcleos cerebrales relacionados hasta ahora con la modulación del sueño y la vigilia, podría ser un mecanismo de acción que permita a las neuronas sincronizar su actividad y de esta forma facilitar su participación en la regulación del ciclo sueño-vigilia. Asimismo, parece probable que los hemicanales formados por Cx43 en el cerebro pueden ser determinantes en la liberación de ATP y la consiguiente acumulación de adenosina necesaria para la regulación homeostática del sueño. Bajo estos argumentos se decidió establecer una estrategia metodológica que nos permitiera, en la medida de nuestras posibilidades, acercarnos a responder dos preguntas:

- a) El bloqueo de las sinapsis eléctricas altera la arquitectura del sueño de la rata?
- b) La privación total de sueño y/o el consiguiente rebote de sueño cambian la expresión de las principales Cx's en el cerebro?

HIPÓTESIS

La administración intracerebroventricular (ICV) de quinina bloqueará de manera reversible las sinapsis eléctricas formadas por Cx36 en el SNC y este efecto farmacológico se manifestará con cambios en la arquitectura del sueño de la rata.

La privación total de sueño modificará el patrón de expresión proteica de la Cx36 y Cx43 lo cual probablemente está relacionado con algunos efectos previamente descritos de la privación de sueño como la acumulación extracelular de adenosina.

OBJETIVOS

- 1) Analizar los efectos del bloqueo de las sinapsis eléctricas sobre el ciclo sueño-vigilia de la rata.
- 2) Realizar una curva dosis respuesta utilizando quinina como bloqueador de sinapsis eléctricas para determinar la dosis con mejor efecto sobre los parámetros de sueño de la rata.
- 3) Analizar la expresión proteica de Cx36 y Cx43 en varias regiones del cerebro después de la privación total de sueño y durante la recuperación.

MÉTODOS

a. Animales

Para este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 280-320 gramos. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales bajo condiciones controladas de 12 hr luz-12 hr oscuridad (8:00 am-8:00 pm) y todo el tiempo con libre acceso a comida y agua. Todos los animales fueron tratados con las medidas adecuadas para minimizar el dolor de acuerdo a las normativas especificadas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

b. Implantación de electrodos y cánulas

Los animales fueron anestesiados con ketamina (Laboratorios Pisa) con una dosis de 100 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, inmediatamente después fueron implantados con electrodos bipolares en la corteza frontal para los registros del electroencefalograma (EEG), en los músculos de la nuca para registrar el electromiograma (EMG) y un electrodo fijado con un tornillo (Small Parts Inc) en el cráneo fue utilizado como referencia. Los electrodos fueron hechos de alambre de acero inoxidable cubiertos de teflón (A-M Systems Inc) y con un diámetro de 0.005 pulgadas. Durante este procedimiento y para la administración de los fármacos se implantó estereotáxicamente una cánula guía (23 G) de acero inoxidable posicionada 1mm por encima del ventrículo lateral derecho (0.8 mm posterior a Bregma, 1.4 mm lateral a la línea media y 3.6 mm por debajo de la superficie del cráneo) (Paxinos y Watson, 1998). Posteriormente, los electrodos y la cánula guía fueron fijados al cráneo con acrílico dental y finalmente la incisión fue suturada y

se aplicó gentamicina (40 mg/kg de peso) por vía intramuscular para prevenir posteriores infecciones.

c. Grupos

Las ratas implantadas con electrodos y cánulas guía fueron divididas al azar en los siguientes grupos: control (n=8) el cual fue administrado con vehículo (dimetilsulfoxido al 5% v/v), quinina 0.5 μ M (n=6), quinina 1.0 μ M (n=6) y quinina 2.0 μ M (n=6). Cada uno de los grupos experimentales representaba una dosis diferente de quinina disuelta en dimetilsulfoxido al 5%. Después de un periodo de recuperación de 7 días, las ratas fueron conectadas a un amplificador (Bioscience Vector PSG32) por medio de cables flexibles de tal manera que tuvieran libre movimiento dentro de las cajas de registro. Las cajas de registro fueron equipadas con libre acceso a comida y agua y bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (8:00-20:00 h luz, 20:00-8:00 h oscuridad). Las ratas fueron habituadas durante 48 horas previas al inicio de los registros de sueño. Para la administración ICV del fármaco, la quinina fue disuelta en vehículo (dimetilsulfoxido al 5%) y un volumen total de 5 μ L fue inyectado a través de una cánula de inyección (Sofic) la cual era 1 mm más larga que la cánula guía con el objetivo de alcanzar correctamente el ventrículo lateral. Los animales fueron sujetos suavemente y la infusión de quinina fue realizada mediante una cánula de inyección conectada por tubo de polietileno a una jeringa Hamilton de 25 μ L, la tasa de infusión fue de 1 μ L/min durante 5 minutos.

d. Registros de sueño

Los registros de sueño y la observación conductual comenzó inmediatamente después de la microinyección de quinina (8:00 hr aproximadamente) y se prolongó durante 24 horas. Los registros de sueño fueron observados en un monitor y almacenados en un disco duro de una computadora provista con el software Harmonie desarrollado por Stellate System para el subsecuente análisis de las etapas del ciclo sueño-vigilia. Las cámaras de registro estaban equipadas con una cámara de video para la observación continua de la conducta de las ratas. El archivo de video fue también almacenado en la computadora para ayudar en la posterior determinación de la vigilia y los estados de sueño. Así, los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia fueron ciegamente analizados por el experimentador quien desconocía el tratamiento administrado a la rata correspondiente. Los criterios usados para la determinación de los estados del ciclo sueño-vigilia fueron: vigilia, caracterizada por ondas rápidas y de bajo voltaje en el EEG (35-50 Hz y 40-60 μ V) y acentuada actividad del EMG; SOL, caracterizada por ondas lentas de alto voltaje (0.1-10 Hz y 200-400 μ V) y disminución de actividad en el EMG; sMOR, identificado por desincronización en el EEG (20-40 Hz y 50-80 μ V), presencia de movimientos de extremidades y vibrisas además de pérdida de tono muscular. Después del análisis del registro de sueño las variables analizadas fueron el tiempo total de vigilia, SOL y sMOR las cuales fueron evaluadas cada hora, asimismo se analizaron algunos parámetros del sMOR como el número total y la duración media de los episodios y finalmente la latencia de inicio (intervalo de tiempo entre la infusión de vehículo o quinina y la

aparición del primer episodio de sMOR). Estas variables fueron analizadas tanto en el control como en los grupos experimentales.

Al final de los registros de sueño los animales fueron sometidos a una microinyección ICV de azul de metileno con el objetivo de verificar la correcta implantación de la cánula guía en el ventrículo lateral derecho. Inmediatamente después fueron sacrificados mediante una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico y se les extrajo el cerebro para observar la tinción del sistema ventricular cerebral. Las ratas que no presentaron una correcta implantación en el ventrículo lateral fueron desechadas del estudio.

e. Privación de sueño

Otro lote de ratas fue sometido a privación total de sueño mediante un procedimiento previamente usado (Franken et al, 1991; Martínez-Vargas et al, 2003) denominado manipulación gentil. Este procedimiento consistió en exponer constantemente a las ratas a nuevos objetos, cambiarlas a nuevas cajas y manipularlas suavemente para evitar que presentaran alguna etapa del sueño durante 24 horas. Las ratas asignadas al grupo control permanecieron sin manipulaciones y sin cambios en sus condiciones de alojamiento. El grupo privado de sueño estuvo bajo manipulación durante 24 horas, el periodo comenzó cuando las luces se apagaron (20:00 hr) y las ratas fueron privadas durante un periodo de oscuridad (20:00-08:00 hr) y un periodo de luz (08:00-20:00 hr). Durante el periodo de oscuridad las ratas fueron observadas con ayuda de una cámara de visión nocturna. El último grupo de ratas también fue privado de sueño bajo el mismo esquema durante 24 horas pero se recuperó de la privación al permitirles dormir

sin perturbación durante 4 horas inmediatamente después del término de la privación total de sueño (Cuadro 1). Este método de privación de sueño se utilizó porque se ha demostrado que es un procedimiento que resulta ser menos estresante para los animales, ya que se ha demostrado que la manipulación gentil no incrementa significativamente los niveles de moléculas que regulan la respuesta al estrés como la corticosterona (Palchykova et al, 2006; Fenzl et al, 2007).

Cuadro 1. Esquema de los grupos para el análisis de Cx36 y Cx43 por Western blot

Grupo	Control	Privación	Recuperación
N	6	6	6
Tratamiento	Sin manipulación	Privación total de sueño durante 24 horas	Privación total de sueño durante 24 horas más recuperación de sueño durante 4 horas
Tiempos		20:00-20:00 hr	20:00-20:00 hr privación 20:00-24:00 hr recuperación
Hora sacrificio	20:00 hr	20:00 hr	24:00 hr

f. Disección de las regiones cerebrales

Inmediatamente después de la decapitación, los cerebros fueron extraídos y colocados en solución salina a 4°C para retirar todos los residuos de sangre. La manipulación del cerebro se realizó en frío y las estructuras que se extrajeron fueron el puente, hipotálamo anterior y posterior y corteza frontal. La obtención del puente se realizó basado en una descripción previa (Montes-Rodríguez et al, 2009) la cual especifica que una vez retirado el cerebelo se puede obtener el puente mediante dos cortes coronales localizados en el plano antero-posterior,

uno en la unión del mesencéfalo y el puente y el segundo a nivel de la unión pontomedular. Para diseccionar la corteza frontal retiramos el bulbo olfatorio, realizamos un corte coronal aproximadamente en la coordenada 1.5 (Bregma) del plano antero-posterior y un corte horizontal aproximadamente en 5.0 del plano dorso-ventral para finalmente retirar todas las estructuras subcorticales y obtener únicamente la corteza frontal de ambos hemisferios. La obtención del hipotálamo se llevo a cabo tomando como referencia antero-posterior al quiasma óptico y al mesencéfalo, con estos límites se extrajo una muestra de tejido la cual se dividió para obtener dos bloques correspondientes a la porción anterior y posterior del hipotálamo. En la Figura 10 se pueden observar las regiones diseccionadas en cada una de las ratas sacrificadas.

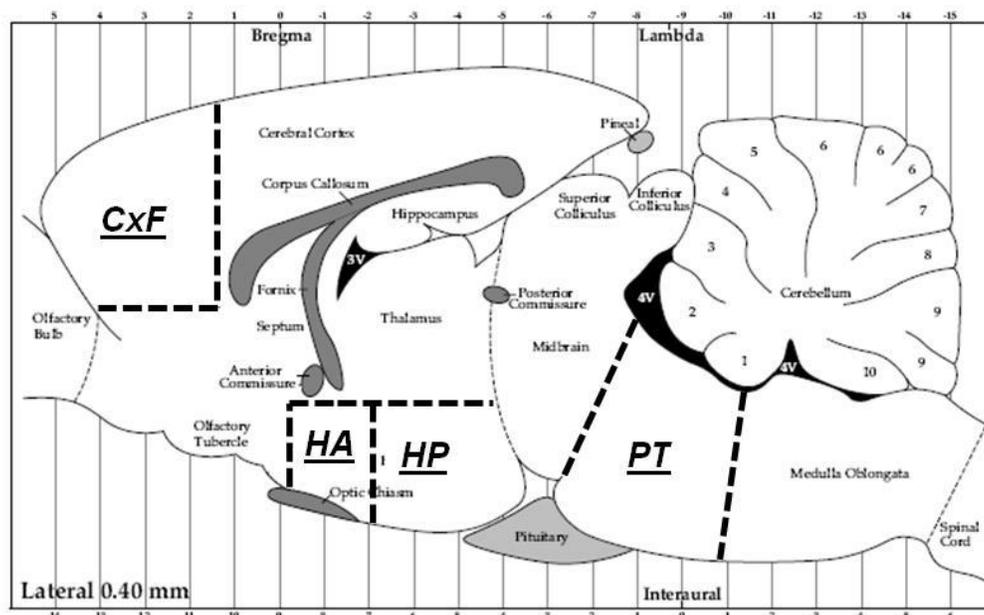


Figura 10. Diagrama sagital del cerebro de ratas en donde se señalan las estructuras que se extrajeron para la realización del análisis de Cx36 y Cx43 mediante Western blot. Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 1998. CxF: corteza frontal, HA: hipotálamo anterior, HP: hipotálamo posterior, PT: puente.

g. Western blot

Todas las muestras de cerebro se mantuvieron en congelación a -70°C hasta el momento de su procesamiento. Posteriormente las muestras se descongelaron, se les adicionó buffer de extracción (buffer de lisis e inhibidores de proteasas) y se maceraron con un polytron durante 30 segundos. El tejido se incubó en hielo durante 30 minutos y durante ese tiempo se sometieron a vórtex 30 segundos cada 5 minutos. Todos los tubos se centrifugaron a 13000 rpm por 15 minutos y a 4°C , el sobrenadante se recolectó en tubos nuevos y se utilizó el kit 2-D Quant (Amersham Biosciences), el cual está diseñado para la determinación precisa de la concentración de proteína en muestras destinadas a técnicas de electroforesis. Para verificar la integridad de las proteínas se hicieron geles SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con azul de coomassie (Figura R-1). Para determinar cuál era la cantidad de proteína ideal para cargar en los geles de electroforesis tanto para la Cx36 como para la Cx43, se realizó una cinética de concentración con células Jurkat como control positivo y de esta forma se cargaron diferentes cantidades de proteína (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μg) (Figura R-2). Las membranas se incubaron con anticuerpo primario para Cx36 (1:300, Abcam, Cambridge MA, USA. Catalogo AB86408) y otras con el anticuerpo primario para Cx43 (1:500, Abcam, Cambridge MA, USA. Catalogo AB11370), el anticuerpo secundario utilizado fue el Anti-rabbit IgG HRP (1:4000, Cell Signaling, Danvers MA, USA. Catalogo 7074S).

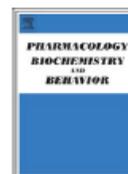
Posteriormente se realizaron geles de poliacrilamida al 15% los cuales se cargaron con 70 μg de proteína para el análisis de la Cx36 y con 30 μg para determinar la Cx43. Las proteínas fueron transferidas en cámara semi-seca a

membranas PVDF (Amersham Biosciences) durante 30 minutos a 25 V. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% diluida en buffer TBST (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20) durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente, después se lavaron 4 veces con TBST durante 10 minutos por cada lavado. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario para Cx36 (1:300, Abcam, Cambridge MA, USA. Catalogo AB86408) y otras con el anticuerpo primario para Cx43 (1:500, Abcam, Cambridge MA, USA. Catalogo AB11370) ambos diluidos en una solución de TBST con BSA al 5% a 4°C con agitación. El anticuerpo unido inespecíficamente se eliminó mediante 4 lavados de 5 minutos cada uno con TBST. A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG HRP (1:4000, Cell Signaling, Danvers MA, USA. Catalogo 7074S) diluido en TBST y después de 40 minutos se lavaron 2 veces con TBST y 2 veces con PBS durante 10 minutos por cada lavado y en agitación constante. La visualización de las bandas de proteína se realizó mediante detección quimioluminiscente en placas de rayos x empleando Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore Corporation, Billerica MA, USA). Las bandas obtenidas fueron analizadas utilizando el software ImageJ 1.44 (National Institutes of Health). El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y seguido por una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls o Dunnett.

RESULTADOS

Los primeros resultados de este trabajo de Tesis se presentan a continuación como artículo original ya que se publicaron en la revista *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2009; 94: 250-254. Este artículo aborda la primera pregunta de esta tesis:

EL BLOQUEO DE LAS SINAPSIS ELÉCTRICAS ALTERA LA ARQUITECTURA DEL SUEÑO DE LA RATA?



Quinine, a selective gap junction blocker, decreases REM sleep in rats

Javier Franco-Pérez^{a,b}, Carlos Paz^{a,*}

^a Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, México, D.F., México

^b Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2009

Received in revised form 24 August 2009

Accepted 1 September 2009

Available online 11 September 2009

Keywords:

Quinine

Gap junctions

Connexins

REM sleep

Slow wave sleep

Wakefulness

ABSTRACT

Electrical synapses are formed by gap junctions that allow the direct communication between neurons, the intercellular transference of ions and small molecules as well as the electrical coupling of the cells. Electrical coupling in neurons is mediated by the gap junction protein connexin36. There are reports about the presence of electrical coupling in the sublaterodorsal nucleus and pedunculopontine nucleus, which have been implicated in the modulation of the rapid eye movement sleep. In the present study, rats were used to examine the possible changes on the sleep–wake states after intracerebroventricular administration of several doses of quinine, a selective blocker of gap junctions formed by connexin36. The results showed that quinine significantly increased the time spent in wakefulness and decreased the time spent in slow wave sleep along the 24 h of polygraphic recording. The three doses used of quinine caused a significant decrease of rapid eye movement sleep along the light phase; however, only one dose extended such effect until the darkness phase. The changes on sleep–wake states of the rat after the blockage of gap junctions formed by connexin36 suggest that electrical synapses could contribute to the regulation of sleep–wake states in concert with the well-known chemical neurotransmission.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Electrical synapses are characterized by a close approximation area (2–4 nm) between the membranes of two neurons. In this approximation area, the cells communicate through gap junctions, which constitute transmembranal channels formed by proteins called connexins (Connors and Long, 2004). These channels provide pathways of intercellular communication through which ions and small molecules pass (Giaume and Venance, 1998; Goldberg et al., 1999; Niessen et al., 2000). Based on some studies, it has been assumed that gap junctions formed by connexin36 (Cx36) mediate the electrical coupling between neurons (Hormuzdi et al., 2001; Christie et al., 2005). Therefore, due to reciprocity, speed and simplicity, gap junction channels can contribute to sharpen neuronal activity by synchronizing large neuronal populations (for references see Hormuzdi et al., 2004; Bennett and Zukin, 2004). The blockade of gap junction communication can be carried out by a number of factors, which include intracellular alkalinization, transjunctional voltage and some compounds like long-chain alcohols, halothane, glycyrrhetic acid derivatives and oleamide and derivatives (Gonzalez-Nieto et al., 2008; Johnston et al., 1980; Davidson et al., 1986; Boger et al., 1998). However, it has been demonstrated that quinine, an antimalarial drug, is capable to block specifically Cx36 gap junctions in a reversible and

concentration-dependent manner, but it does not affect other gap junction types (Srinivas et al., 2001).

The normal patterns of sleep depend on the complex interaction of several neurotransmission systems located throughout the brain. Between the multiple neuronal populations related with sleep–wake states, the pedunculopontine nucleus (PPN) and sublaterodorsal nucleus (SLD), also called subcoeruleus area, have been implicated in the control of rapid eye movement sleep (REMs) (Lu et al., 2006). Recent evidence suggests the presence of electrical synapses in PPN and SLD. Electrophysiological recordings of PPN and SLD neurons revealed that some of these are electrically coupled and the molecular analysis showed gene expression and protein levels of Cx36 in the mesopontine tegmentum, specifically in the PPN and SLD (García-Rill et al., 2007; Heister et al., 2007).

It has been proposed that the presence of electrical coupling in both SLD and PPN could be a novel mechanism of action for the regulation of the sleep–wake states. However, there are no studies that describe the effects of the blockage *in vivo* of electrical synapses on the sleep parameters of the rat. Therefore, the aim of this study was to determine the changes on the sleep–wake states of the rat after intracerebroventricular (icv) administration of quinine, a selective blocker of Cx36 gap junctions.

2. Materials and methods

Male Wistar rats (280–320 g) were used for this study. Animals were maintained under controlled conditions (12–h light: 12–h darkness)

* Corresponding author. Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S., Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269 México D.F., Mexico. Tel.: +52 55 5606 38 22; fax: +52 55 5424 08 08.
E-mail address: paztres@servidor.unam.mx (C. Paz).

and had free access to food and water. All animals were treated with suitable measures to minimize pain or discomfort according to regulations specified by the Animal Care and Use Committee of the National Institute of Neurology and Neurosurgery M.V.S., and according to the standards of the National Institutes of Health of Mexico.

Quinine hydrochloride was obtained from Sigma. Quinine was dissolved in 5% (v/v) dimethylsulfoxide purchased from Sigma.

Animals were anesthetized with ketamine (Laboratorios Pisa) (100 mg/kg, intraperitoneal); afterwards, bipolar electrodes were implanted in the left sensorimotor cortex for the electroencephalographic recordings (EEG), in the neck musculature to record the electromyogram (EMG) and in the external edge of the frontal bone to record eye movements (EOG). The bipolar electrodes were made of stainless-steel Teflon-coated wires (A-M Systems Inc) (0.005 in. diameter) with uncoated tips. An electrode implanted with a screw (Small Parts Inc) in the skull was used as an indifferent source of reference. A stainless-steel guide cannula (Becton Dickinson) was stereotaxically positioned 1 mm above the right lateral ventricle (0.8 mm posterior to Bregma, 1.4 mm lateral to midline, 3.6 mm below the surface of the skull) (Paxinos and Watson, 1998) for drug administration. Next, electrodes and guide cannula were fixed to a rectangular plug which was secured to skull with dental acrylic (Arias). Skin cuts were sutured and gentamicin (Laboratorios Pisa) was applied in a single intramuscular injection (40 mg/kg) to prevent posterior infection.

Rats implanted with electrodes and guide cannulas were randomly divided in the following groups: control ($n=8$) administered with vehicle (dimethylsulfoxide, 5%), quinine 0.5 μM ($n=6$), quinine 1.0 μM ($n=6$) and quinine 2.0 μM ($n=6$). After a 7 day period of recovery, rats were connected to an amplifier (BioScience Vector PSG32) by means of flexible cables so that they could move freely in a soundproof recording cage (12 in. \times 9 in. \times 9 in.). The cages were equipped with free access to food and water and under controlled light–dark conditions (8:00–20:00 h light, 20:00–8:00 h dark). Rats were habituated 48 h to become familiar with these laboratory conditions. For the icv administration, quinine was dissolved in vehicle (dimethylsulfoxide, 5%) and a total volume of 5 μL was injected through an injection cannula (Sofic) 1 mm longer than the guide cannula. Animals were gently hand-restrained and quinine infusions were made using an injection cannula connected by polyethylene tube to a 25 μL Hamilton syringe, the infusion rate was 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Polygraphic recordings and behavioral observation began immediately after the infusion of vehicle or quinine (8:00 h approximately) and continued during 24 h. The polygraphic recordings were observed on a computer monitor and stored in the hard drive of a computer provided with Harmonie software developed by Stellate System for subsequent analysis of the sleep–wake states. The recording cages contained a video camera for continuous observation of the rats' behavior. The video file was also saved in the computer to help in the posterior determination of the sleep–wake states. The different states of the sleep–wake cycle were blindly analyzed by two experimenters who did not know about the drug treatment. The used criteria were those described previously (Franco-Pérez et al., 2006). Briefly: wakefulness (W), characterized by EEG desynchronization and presence of accentuated EMG activity; slow wave sleep (SWS), characterized by slow waves with high voltage and decreased EMG activity and rapid eye movement sleep (REMs) characterized by EEG desynchronization with the presence of rapid eye movements in the EOG and loss of muscle tone. The variables analyzed after the determination of sleep–wake states were the following: total time spent in W, SWS and REMs, as well as REMs parameters like number and mean duration of REMs episodes and latency of REMs onset (time interval between infusion of quinine and appearance of first REMs episode). These variables were analyzed for both control and quinine groups.

For time course of the effects of quinine on W, SWS and REMs we used a two-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test with both groups and time points as factors between subjects. REMs parameters were compared with one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test.

3. Results

The effects of icv administration of three different doses of quinine (0.5, 1 and 2 μM) on sleep–wake states were evaluated. There are controversial reports about the availability of quinine in the brain after systemic administrations. Quinine does not seem to cross the blood–brain barrier in humans (Silamut et al., 1985). However, it has been reported that quinine is able to cross the brain barrier with the help of a blood–brain barrier permeator (Mikov et al., 2004). For this reason, we attempted to eliminate the possibility that quinine could be acting on peripheral systems and avoid in this way nonspecific effects through icv administration of low concentrations. Quinine was infused in rats at the beginning of light period (infusion time 8:00 h) and polygraphic recordings were done during 24 h to determine the effects of quinine across sleep–wake cycle.

In order to determine the time course of the effects of quinine, the duration of W, SWS and REMs in 1 h blocks along 24 h was analyzed. It was observed that quinine (1 μM) increased the duration of W mainly in the first 6 h of light phase; however, the same effect appeared in some points of dark phase, $F(3, 22)=41.25$, $p<0.001$ (Fig. 1). SWS was only altered by 1 μM of quinine, the time course analysis showed a significant decrease at the beginning of light phase and until the sixth hour of recording; a decrease of SWS at the end of dark phase was even observed, $F(3, 22)=31.20$, $p<0.001$ (Fig. 2). The experimental groups administered with quinine 0.5 and 2 μM only showed a slight change in both W and SWS during 2 h after injection of quinine. The most prominent effect caused by quinine was observed on REMs because all evaluated doses caused a significant reduction of this sleep state. Namely, administration of quinine 0.5 μM reduced REMs during the first 7 h of polygraphic recording. Again, the major effect was observed after quinine 1 μM , which dramatically reduced the time spent in REMs mainly during the 12 h of the light phase. On the other hand, quinine 2 μM slightly decreased the time spent in REMs at the beginning of the light phase, $F(3, 22)=41.01$, $p<0.001$ (Fig. 3).

Some REMs parameters like latency, number and mean duration of REMs episodes were also analyzed. All doses of quinine significantly increased the latency of REMs onset, $F(3, 22)=62.56$, $p<0.001$, and reduced the number of REMs episodes observed along 24 h, $F(3, 22)=20.05$, $p<0.001$. The mean duration of REMs episodes only decreased by the administration of 1 μM of quinine, $F(3, 22)=10.93$, $p<0.001$ (Fig. 4).

4. Discussion

It has been described that quinine has pharmacological properties capable to affect neurological functions (Juszczak and Swiergiel, 2009). Recently, it was demonstrated that quinine possesses anticonvulsant effects because intraperitoneal doses between 40 and 60 mg/kg decreased the duration of seizures induced by pentylentetrazole (Nassiri-Asl et al., 2009). Bostanci and Bagirici (2007) established that quinine 1 μM applied to brain ventricle, significantly decreased epileptic discharges induced by penicillin. Importantly, quinine can potentiate the anesthetic effects produced by sodium pentobarbital (Nassiri-Asl et al., 2009). A previous study showed that quinine can cause changes in amplitude and power spectra of hippocampal theta rhythm of the cat (Golebiewski et al., 2006). Theta rhythm can be observed specially on W and REMs; however, there are no studies which describe properly the effects of quinine on sleep–wake pattern of the rat.

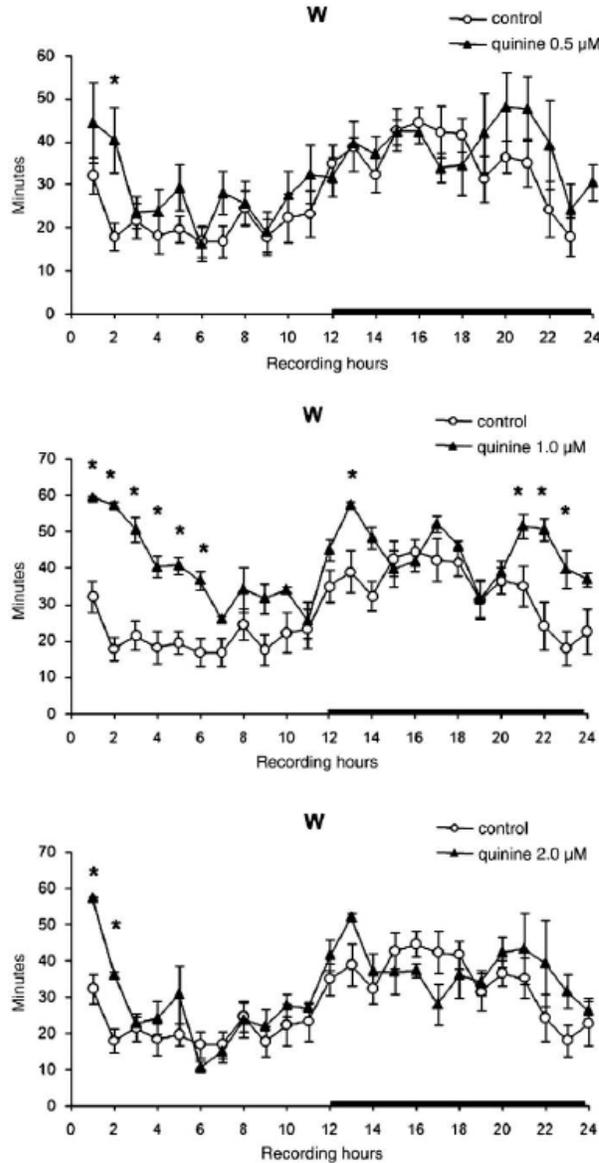


Fig. 1. Effects of icv administration of quinone on W in rats. The duration of W was evaluated hourly throughout one 12 h light:12 h darkness cycle. The results were compared statistically using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test; * $p < 0.001$. The horizontal black bars on the X-axis represent the dark phase of the cycle.

Some data suggest that quinone has indirect effects which could affect the sleep–wake pattern. It is known that intravenous quinone administration decreases the plasmatic glucose concentration and increases plasma insulin levels (Davis et al., 1993). It has been demonstrated that intraperitoneal administration of insulin is capable of decreasing the total time spent in REMs, probably due to changes in monoamine concentrations implicated in REMs regulation (Sangiah et al., 1982). On the other hand, it has been observed that quinone has the ability to block different types of potassium currents (Imai et al., 1999). Compounds which block potassium channels prolong depolarization and cause an increase on the release of neurotransmitter. Consequently, quinone is capable to increase the spontaneous release of glutamate from rat cerebellar slices (Barnes et al., 1989). Recently, it was described that bilateral microinjections of glutamate in the rat

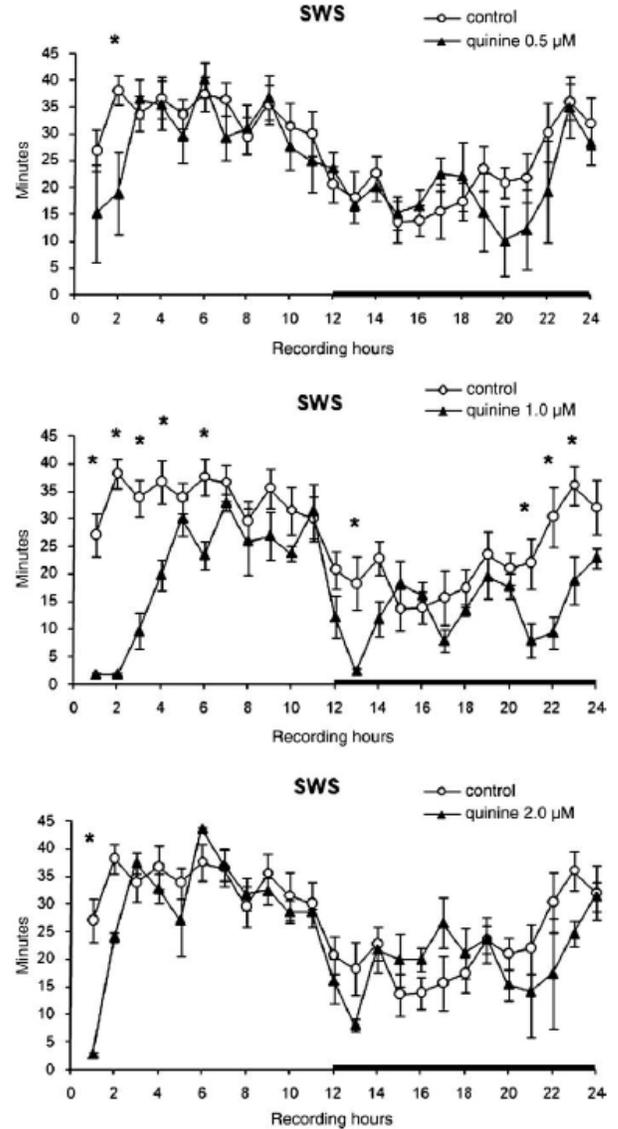


Fig. 2. Effects of icv administration of quinone on SWS in rats. The duration of SWS was evaluated hourly throughout one 12 h light:12 h darkness cycle. The results were compared statistically using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test; * $p < 0.001$. The horizontal black bars on the X-axis represent the dark phase of the cycle.

brain significantly increase the time spent in waking and concomitantly decrease the time spent in SWS and REMs (Alam and Mallick, 2008). Thus, although it is possible that quinone exerts its effects by preventing gap junction-mediated communication between neurons involved in REMs regulation; it is also possible that quinone causes changes on sleep–wake states by another indirect mechanism.

Quinone, a drug used for the treatment of malaria and benign nocturnal leg clamps, closes gap junction channels in a reversible, concentration-dependent and connexin-specific manner. It has been demonstrated that in vitro quinone selectively blocked Cx36 gap junctions and did not have an effect on gap junctions formed by other connexins (Srinivas et al., 2001). Further evidence of the possible involvement of gap junctions on the sleep–wake cycle is described in some reports which indicate that oleamide and anandamide have sleep-inducing properties because icv injection increases SWS and

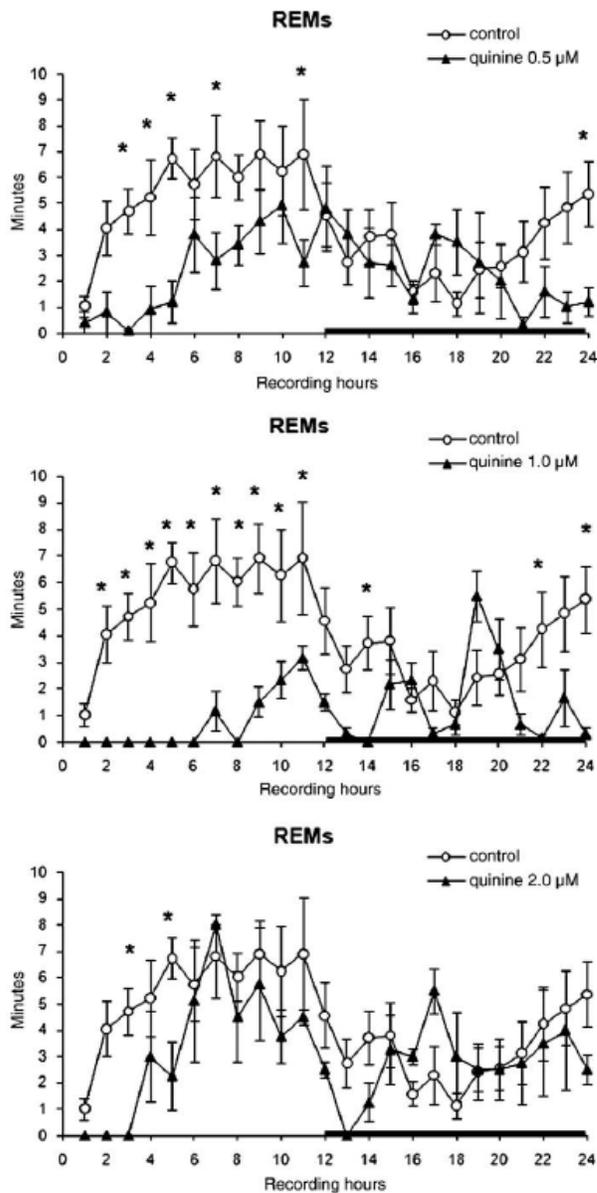


Fig. 3. Time course of the effects of quinine administration on REMs. The duration of REMs was evaluated every hour throughout one 12 h light:12 h darkness cycle. The results were compared statistically using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test; * $p < 0.001$. The horizontal black bars on the X-axis represent the dark phase of the cycle.

REMs at the expense of W (Cravatt et al., 1995; Murillo-Rodríguez et al., 1998). Communication between glial cells is mediated by Cx43 gap junctions and can be blocked by oleamide, an endogenous fatty acid primary amide (Guan et al., 1997) and anandamide, an endogenous arachidonic acid derivative (Venance et al., 1995). So far, participation of gap junctions on sleep-wake states has not yet received enough attention since the research has been focused on chemical neurotransmission and sleep-inducing molecules.

Many neurons in the mammalian central nervous system communicate through electrical synapses which are constituted by membrane-to-membrane appositions called gap junctions (Connors and Long, 2004). Based on some studies, it has been assumed that Cx36 gap junctions mediate the electrical coupling between neurons

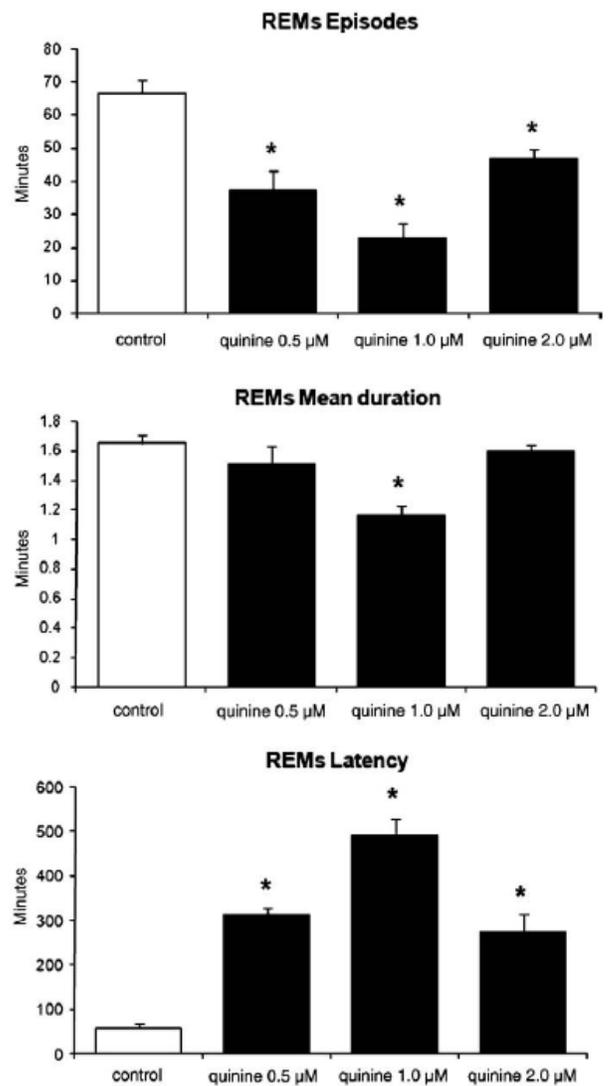


Fig. 4. REMs parameters after icv administration of quinine. Results are expressed as mean \pm SEM of 6–8 animals per group. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA followed by a Tukey's test; * $p < 0.001$.

(Hormuzdi et al., 2001; Christie et al., 2005). Recent data suggest that a significant proportion of SLD and PPN neurons are electrically coupled. Such assertion has been confirmed by electrophysiological recordings of neighboring PPN neurons suspended in a tetrodotoxin medium, in which hyperpolarizing pulses delivered to one cell induced a current in the other cell and vice versa; thus indicating that such neurons were electrically coupled (García-Rill et al., 2007). We used quinine to block gap junction channels and thus lead a dysregulation of electrical coupling in brain regions containing Cx36 gap junctions, principally in neurons of the PPN. Our findings indicate that administration of quinine modifies the architecture of sleep mainly by altering the duration of REMs. Therefore, we can hypothesize that a dysregulation of electrical coupling could originate changes on the sleep-wake states in the rat. Molecular evidence indicates the presence of both Cx36 gene expression and protein in SLD nucleus, which were reduced during the developmental decrease of REMs (Heister et al., 2007). Among the multiple neuronal populations related with sleep-wake states, the PPN and SLD have

been implicated in the control of REMs (Lu et al., 2006). This hypothesis has been supported with reports which indicate that some PPN neurons show increased rates of firing during W and REMs, but such firing rate decreases during SWS (Steriade et al., 1990; Datta and Sywek, 2002). On the other hand, high levels of c-Fos expression in SLD after REMs enhancement have been demonstrated (Lu et al., 2006) and a previous study reported that disinhibition of SLD by bicuculline induced a REMs-like state (Boissard et al., 2002). Thus, it has been proposed that the presence of electrical coupling, mediated by Cx36 gap junctions, in both SLD and PPN could be a novel mechanism of action for the regulation of the sleep–wake states. In the present study, Cx36 gap junctions were specifically blocked by means of icv administration of quinine. According to our findings, quinine significantly decreased total time spent in REMs, which was mainly due to a reduction of REMs episodes. Therefore, results obtained in this study strongly suggest that modification in the activity of gap junctions, caused by the effect of quinine, could be involved in the reduction of the expression of REM sleep.

Modafinil is used for the treatment of narcolepsy, shift work sleep disorder and excessive daytime sleepiness associated with obstructive sleep apnea, because it has the capability to promote W in patients (Kumar, 2008). It has been described that modafinil modifies electrical coupling between neurons of some brain areas (Urbano et al., 2007; Garcia-Rill et al., 2007; Beck et al., 2008). Therefore, this suggests that modifications of electrical coupling in the regions related to modulation of sleep–wake states and enriched with Cx36 gap junctions, can promote changes on sleep–wake states. Nevertheless, mechanisms by which electrical coupling disruption can alter sleep–wake cycle are still not clear. The results shown in this paper provide additional information indicating that selective blockade of Cx36 gap junctions by quinine can modify the normal sleep pattern of the rat. Indeed, these findings support both the participation of Cx36 gap junctions in structures related to sleep regulation and the hypothesis that electrical coupling plays an important role in the modulation of sleep–wake states.

Finally, we can confirm that changes of sleep–wake states of the rat observed after icv administration of quinine are not due to vehicle used (dimethylsulfoxide), because it has been reported that 5% dimethylsulfoxide treatment did not have significant effects on sleep pattern of the rat (Cavas et al., 2005). In conclusion, the results of this study demonstrate that blockage of Cx36 gap junctions produces changes on the sleep–wake states in rats.

Acknowledgements

This study was supported by CONACyT-Mexico Grant 49920-Q to C.P. and the fellowship 49130 for J.F.P.'s Doctoral Dissertation in the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de UNAM.

References

- Alam MA, Mallick BN. Glutamic acid stimulation of the perifornical-lateral hypothalamic area promotes arousal and inhibits non-REM/REM sleep. *Neurosci Lett* 2008;439:281–6.
- Barnes S, Whitham EM, Davies JA. Effects of potassium channel blockage on endogenous glutamate release from cerebellar slices. *Brain Res* 1989;486:89–94.
- Beck P, Odle A, Wallace-Huitt T, Skinner RD, Garcia-Rill E. Modafinil increases arousal determined by P13 potential amplitude an effect blocked by gap junction antagonist. *Sleep* 2008;31:1647–54.
- Bennett MV, Zukin RS. Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. *Neuron* 2004;41:495–511.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi P. The rat pontomedullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 2002;16:1959–73.
- Boger DL, Patterson JE, Guan X, Cravatt BF, Lerner RA, Gilula NB. Chemical requirements for inhibition of gap junction communication by the biologically active lipid oleamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4810–5.
- Bostanci MO, Bagirci F. Anticonvulsive effects on penicillin-induced epileptiform activity: an *in vivo* study. *Seizure* 2007;16:166–72.
- Cavas M, Beltrán D, Navarro JF. Behavioural effects of dimethyl sulfoxide (DMSO): changes in sleep architecture in rats. *Toxicol Lett* 2005;157:221–32.
- Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Momyer H, Westbrook GL. Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron* 2005;46:761–72.
- Connors BW, Long MA. Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:393–418.
- Cravatt BF, Prospero-Garcia O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, et al. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 1995;268:1506–9.
- Datta S, Sywek DF. Single cell activity patterns of pedunculopontine tegmentum neurons across the sleep–wake cycle in the freely moving rats. *J Neurosci Res* 2002;70:611–21.
- Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH. Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;134:29–36.
- Davis TM, Looareesuwan S, Pukrittayakamee S, Levy JC, Nagachinta B, White NJ. Glucose turnover in severe falciparum malaria. *Metabolism* 1993;42:334–40.
- Franco-Pérez J, Padilla M, Paz C. Sleep and brain monoamine changes produced by acute and chronic acetaldehyde administration in rats. *Behav Brain Res* 2006;174:86–92.
- García-Rill E, Heister D, Ye M, Charlesworth A, Hayar A. Electrical coupling: novel mechanism for sleep–wake cycle. *Sleep* 2007;30:1403–12.
- Giaume C, Venance L. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 1998;24:50–64.
- Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol* 1999;1:457–9.
- Golebiewski H, Eckersdorf B, Konopacki J. Electrical coupling underlies theta rhythm in freely moving cats. *Eur J Neurosci* 2006;24:1759–70.
- Gonzalez-Nieto D, Gomez-Hernandez JM, Larrosa B, Gutierrez C, Muñoz MD, Fasciani I, et al. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17169–74.
- Guan X, Cravatt BF, Ehring GR, Hall JE, Boger DL, Lerner RA, et al. The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells. *J Cell Biol* 1997;139:1785–92.
- Heister D, Hayar A, Charlesworth A, Yates C, Zhou Y, Garcia-Rill E. Evidence for electrical coupling in the subcoeruleus (SubC) nucleus. *J Neurophysiol* 2007;97:3142–7.
- Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau F, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, et al. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 2001;31:487–95.
- Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, Momyer H, Bruzzone R. Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim Biophys Acta* 2004;1662:113–37.
- Imai S, Suzuki T, Sato K, Tokimasa T. Effects of quinine on three different types of potassium currents in bullfrog sympathetic neurons. *Neurosci Lett* 1999;275:121–4.
- Johnston MF, Simon SA, Ramon F. Interaction of anesthetics with electrical synapses. *Nature* 1980;286:498–500.
- Juszczak GR, Swiergiel AH. Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:181–98.
- Kumar R. Approved and investigational uses of modafinil: an evidence-based review. *Drugs* 2008;68:1803–39.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper C. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 2006;441:589–94.
- Mikov M, Kevresan S, Kuhajda K, Jakovljevic V, Vasovic V. 3Alpha, 7alpha-dihydroxy-12-oxo-5beta-cholone as blood-brain barrier permeator. *Pol J Pharmacol* 2004;56:367–71.
- Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavez M, Navarro L, Martínez-González D, Drucker-Colin R, Prospero-García O. Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res* 1998;812:270–4.
- Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Torabinejad B. Antiepileptic effects of quinine in the pentylenetetrazole model of seizure. *Seizure* 2009;18:129–32.
- Niessen H, Hart H, Bedner P, Kramer K, Willecke K. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1, 4, 5-triphosphate. *J Cell Sci* 2000;113:1365–72.
- Paxinos G, Watson A. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.
- Sangiah S, Caldwell DF, Villeneuve MJ, Clancy JJ. Sleep: sequential reduction of paradoxical (REM) and elevation of slow wave (NREM) sleep by a non-convulsive dose of insulin in rats. *Life Sci* 1982;31:763–9.
- Silamut K, White NJ, Looareesuwan S, Warrel DA. Binding of quinine to plasma proteins in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:681–6.
- Srinivas M, Hopperstand MG, Spray DC. Quinine blocks specific gap junction channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10942–7.
- Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Currodozzi R. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation process in thalamocortical systems. *J Neurosci* 1990;10:2541–59.
- Urbano FJ, Leznik E, Llinás RR. Modafinil enhances thalamocortical activity by increasing neuronal electrotonic coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12554–9.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signaling in striatal astrocytes. *Nature* 1995;376:590–4.

LA PRIVACIÓN TOTAL DE SUEÑO Y/O EL CONSIGUIENTE REBOTE DE SUEÑO CAMBIAN LA EXPRESIÓN DE LA CX36 Y CX43 EN EL CEREBRO?

a) Estandarización del método de Western blot

El primer paso realizado en esta etapa del proyecto fue monitorear la integridad de las proteínas por medio de la tinción de los geles SDS-PAGE con azul de coomassie. En estos geles se observó ausencia de degradación además de una muy buena nitidez y resolución en las bandas; asimismo, con estos geles se verificó que cantidades equivalentes de proteína habían sido cargadas en cada uno de los pozos y así pudieron tomarse en cuenta como control de carga (Figura R-1).

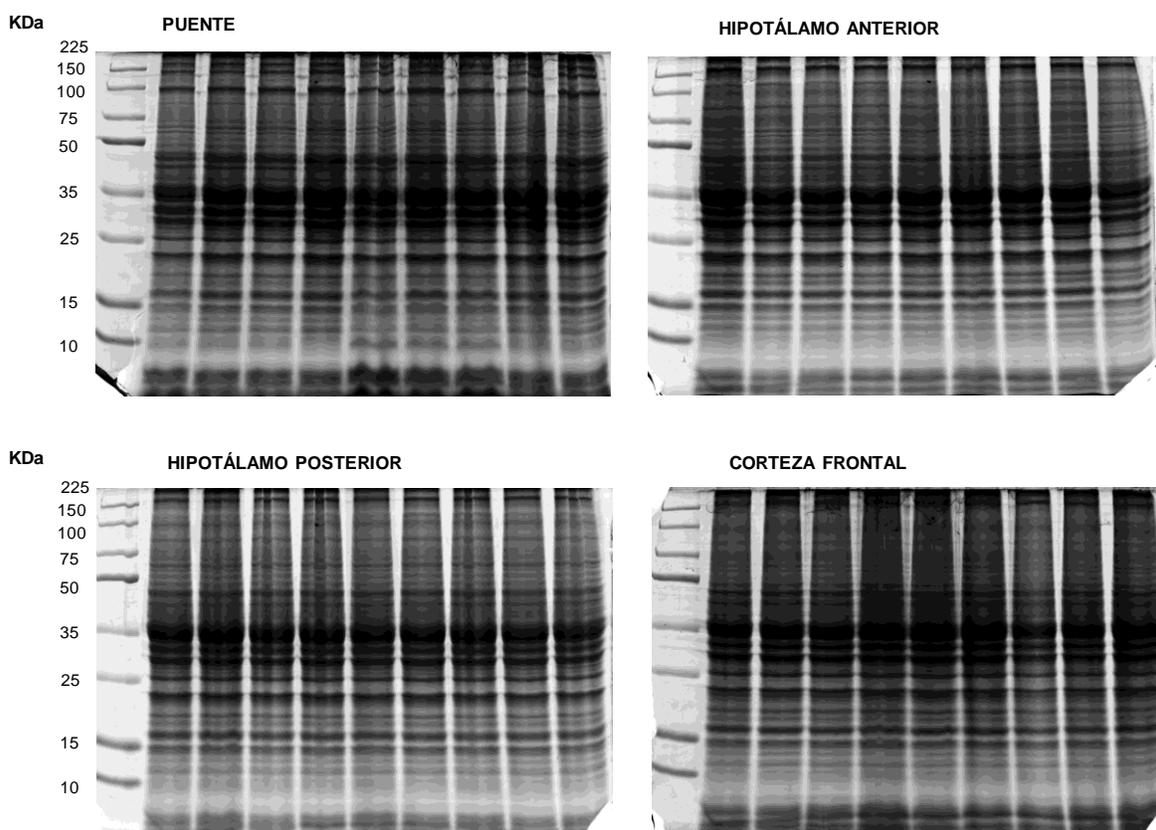


Figura R-1. Geles SDS-PAGE cargados con muestras de diferentes regiones del cerebro y teñidos con azul de coomassie. Se observa la integridad de las proteínas gracias a la nitidez y resolución de las bandas.

Después de varios ensayos fallidos en la detección de la Cx36 y Cx43 se procedió a realizar una curva de concentración proteica con un control positivo para Cx's. Es decir, se utilizaron células Jurkat para encontrar la cantidad de proteína necesaria que pudiera ser revelada por los anticuerpos. Se utilizaron 9 cantidades diferentes de proteína y para la Cx36 se observó que solo podía ser detectada a grandes concentraciones es decir solo con 50, 60 y 70 μg de proteína. Caso contrario sucedió con la Cx43, ya que esta isoforma se detectó ligeramente desde concentraciones tan bajas como 10 μg y la intensidad de la detección quimioluminiscente fue aumentando conforme se incrementó la cantidad de proteína cargada en cada carril (Figura R-2). Gracias a este ensayo se pudo establecer que las concentraciones proteicas ideales para evaluar los grupos experimentales serian 70 y 30 μg para la Cx36 y Cx43 respectivamente.

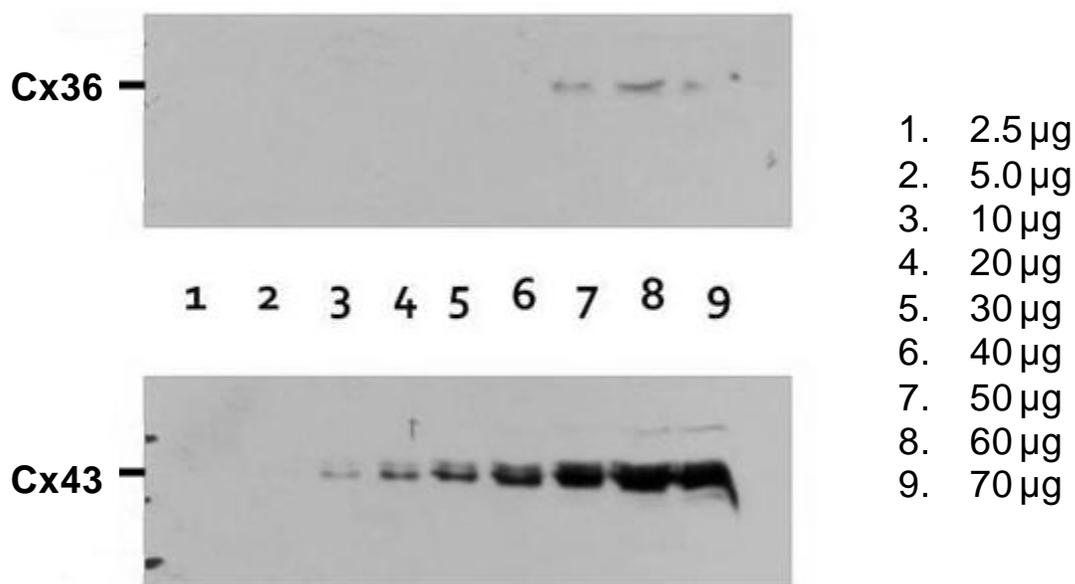


Figura R-2. Curva de concentración proteica en células Jurkat. La membrana superior representa a la Cx36 y la inferior a la Cx43. A la derecha se muestra el número de carril y la cantidad de proteína utilizada en cada caso. Cx36 (1:300, Abcam), Cx43 (1:300, Abcam), anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG HRP (1:4000, Cell Signaling).

b) Niveles basales de Cx36 y Cx43 en diferentes regiones del cerebro

Los niveles proteicos de Cx36 mostraron claras variaciones dependiendo de la región analizada. En la corteza frontal prácticamente no se detectó esta proteína y los niveles más bajos fueron observados en el puente en relación con la expresión registrada en ambas regiones del hipotálamo. De esta forma, estadísticamente se determinó que los niveles tanto en el hipotálamo anterior como posterior son significativamente más altos en comparación con el puente y la corteza frontal (Figura R-3).

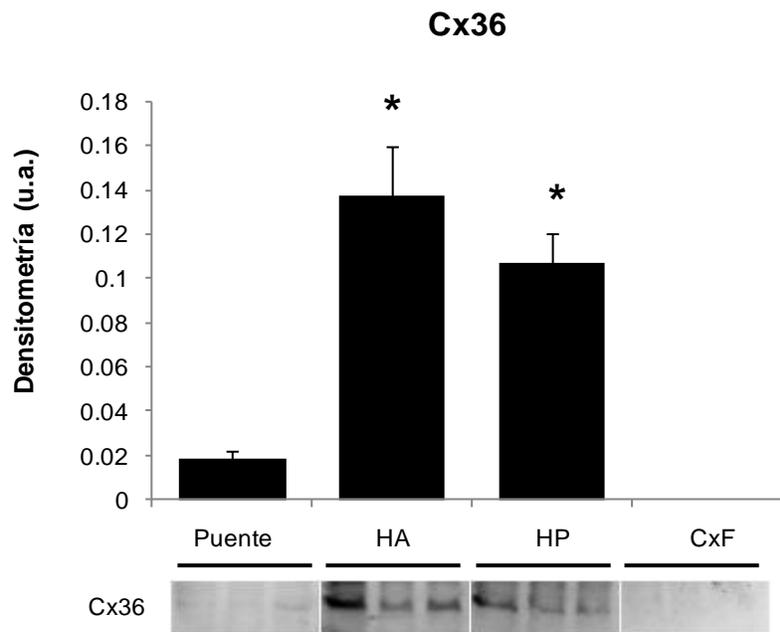


Figura R-3. Variaciones regionales de la expresión de Cx36 en ratas adultas. En la parte inferior se muestran membranas representativas de tres muestras por región obtenidas mediante Western blot. Los datos son presentados como la media \pm eem de las unidades arbitrarias (u.a.) de densitometría. El asterisco indica que son estadísticamente diferentes con respecto al puente y la corteza frontal, Student-Newman-Keuls $P < 0.05$. HA: hipotálamo anterior, HP: hipotálamo posterior, CxF: corteza frontal.

Por otro lado, la expresión de Cx43 fue más homogénea en todas las muestras analizadas y por lo tanto el análisis estadístico no mostró ninguna diferencia significativa entre las regiones (Figura R-4).

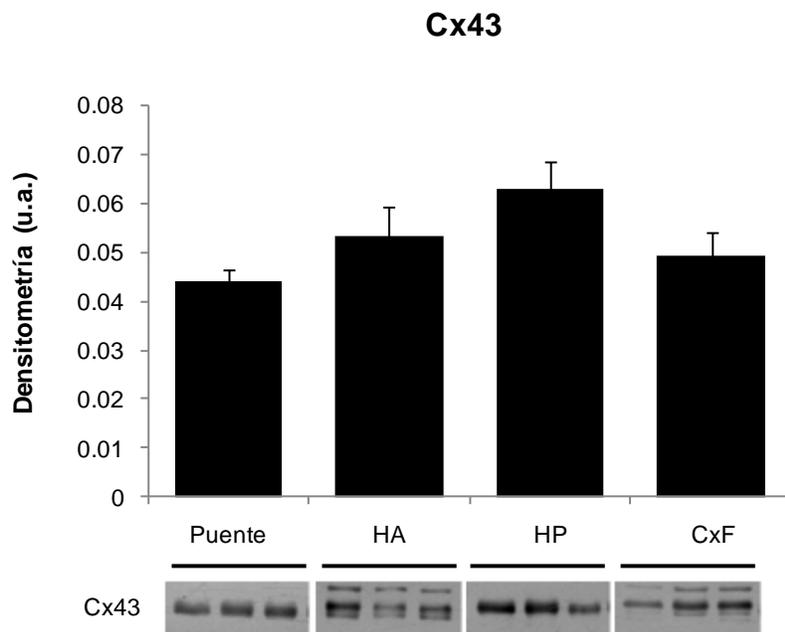
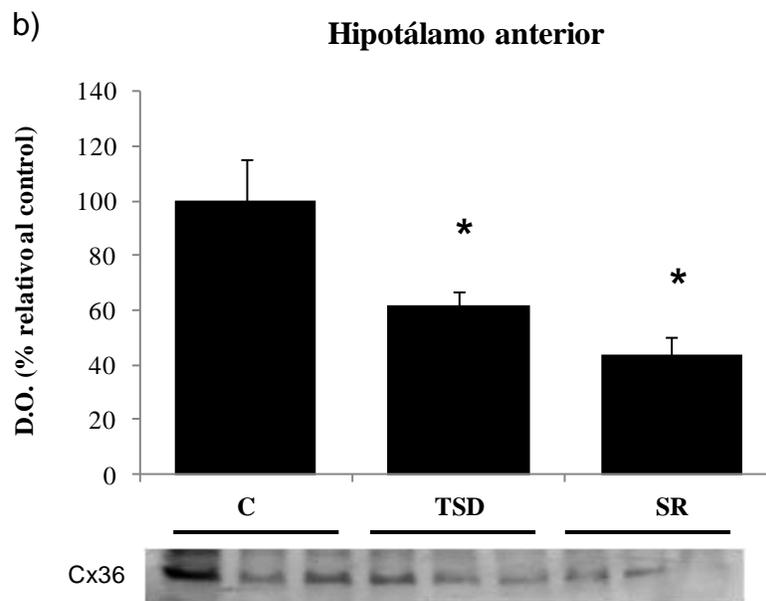
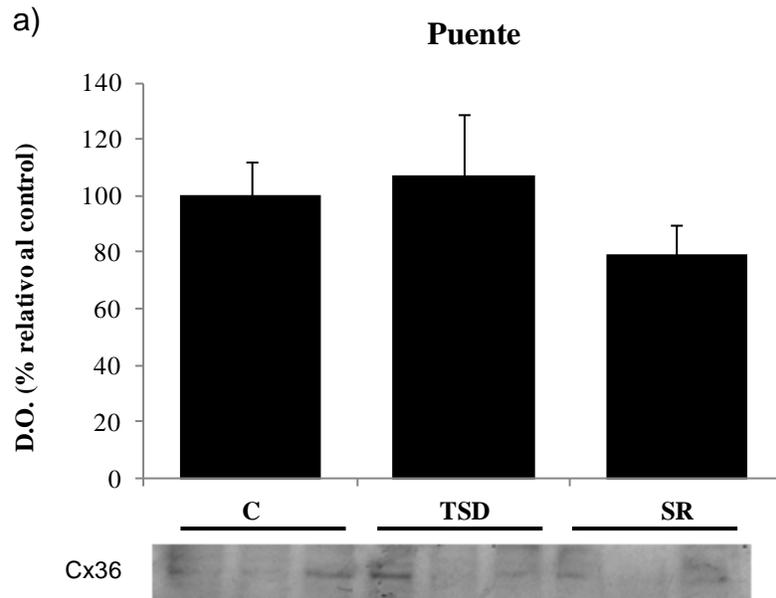


Figura R-4. Variaciones regionales de la expresión de Cx43 en ratas adultas. En la parte inferior se muestran membranas representativas de tres muestras por región obtenidas mediante Western blot. Los datos son presentados como la media \pm eem de las unidades arbitrarias (u.a.) de densitometría. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa alguna. HA: hipotálamo anterior, HP: hipotálamo posterior, CxF: corteza frontal.

b) Niveles de Cx36 y Cx43 después de la privación total de sueño

Aunque los niveles de Cx36 fueron bajos en el puente, la privación total de sueño durante 24 horas no alteró a dicha proteína, sin embargo en el rebote de sueño se observó una ligera disminución no significativa del $21\% \pm 10.6\%$ con respecto al control (Figura R-5a). Interesantemente, en las dos regiones analizadas del hipocampo se notó prácticamente el mismo efecto. En el hipotálamo anterior los niveles de Cx36 disminuyeron significativamente $38\% \pm 5\%$ en el grupo privado de sueño y $56\% \pm 6.3\%$ en las ratas a las cuales se les permitió la recuperación (Figura R-5b). En el hipotálamo posterior la disminución fue más remarcada ya que en los dos grupos experimentales la Cx36 disminuyó significativamente (69%

$\pm 4.4\%$ privación total de sueño; $70\% \pm 4.2\%$ recuperación de sueño) con respecto al control (Figura R-5c).



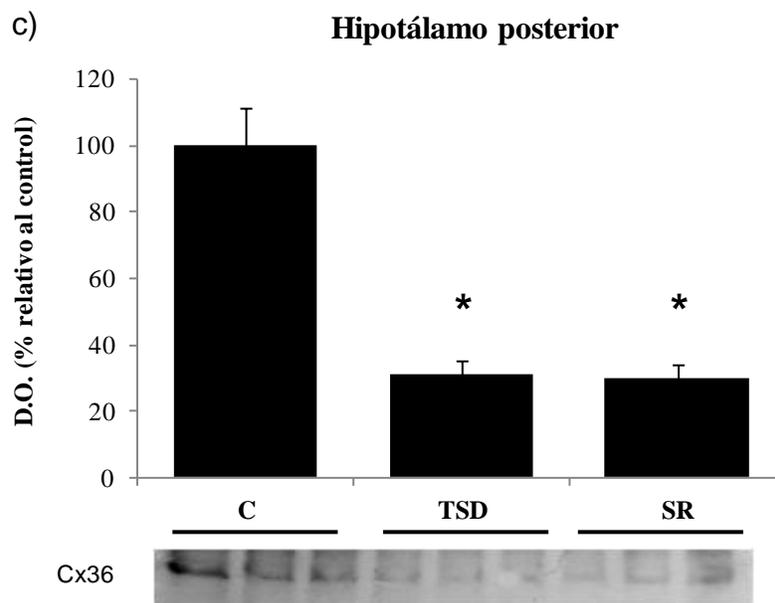
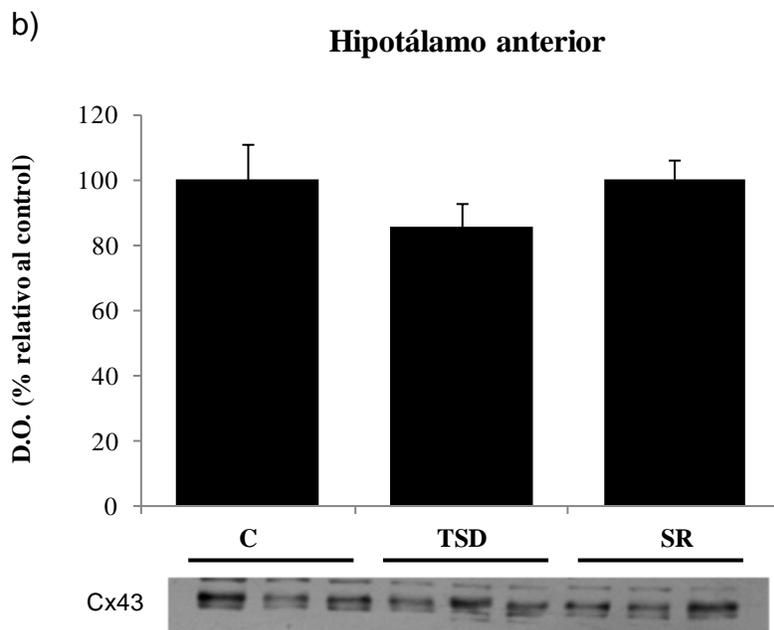
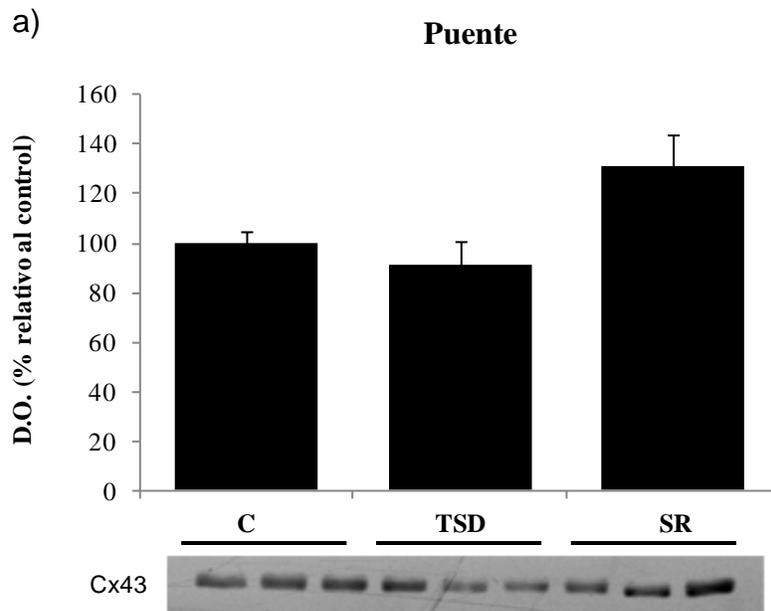


Figura R-5. Efectos de la privación total de sueño y de la recuperación de sueño sobre los niveles proteicos de Cx36 en diferentes regiones del cerebro. En la parte inferior de cada grafico se muestran membranas representativas de tres muestras por grupo obtenidas mediante Western blot. Los datos son presentados como la media \pm eem del porcentaje de densidad óptica (D.O.) relativo al grupo control. El asterisco indica que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al grupo control, Dunnett $P < 0.05$. C: control, TSD: privación total de sueño, SR: rebote de sueño.

El análisis de Cx43 mostró una directriz diferente en comparación con la otra isoforma evaluada. En el puente, no se encontró significancia en el análisis estadístico con respecto al grupo control; sin embargo, el grupo con rebote de sueño presentó un incremento del $31\% \pm 12.5\%$ aunque como se mencionó, no es significativo (Figura R-6a). En el hipotálamo anterior no se encontraron cambios ni alguna tendencia que resaltar (Figura R-6b). Por el contrario, en el hipotálamo posterior se encontraron resultados parecidos a los observados en el puente; sin embargo, el incremento de los niveles proteicos de Cx43 detectado en el grupo con rebote de sueño fue de un $33\% \pm 8.4\%$ el cual resultó ser estadísticamente significativo con respecto al grupo control (Figura R-6c). Finalmente, en la corteza

frontal se observó que en los dos grupos experimentales existen incrementos de la Cx43 ($44\% \pm 10.7$ privación total de sueño; $43\% \pm 18.3$ recuperación de sueño) pero sorpresivamente no fueron estadísticamente significativos según las pruebas no paramétricas utilizadas (Figura R-6d).



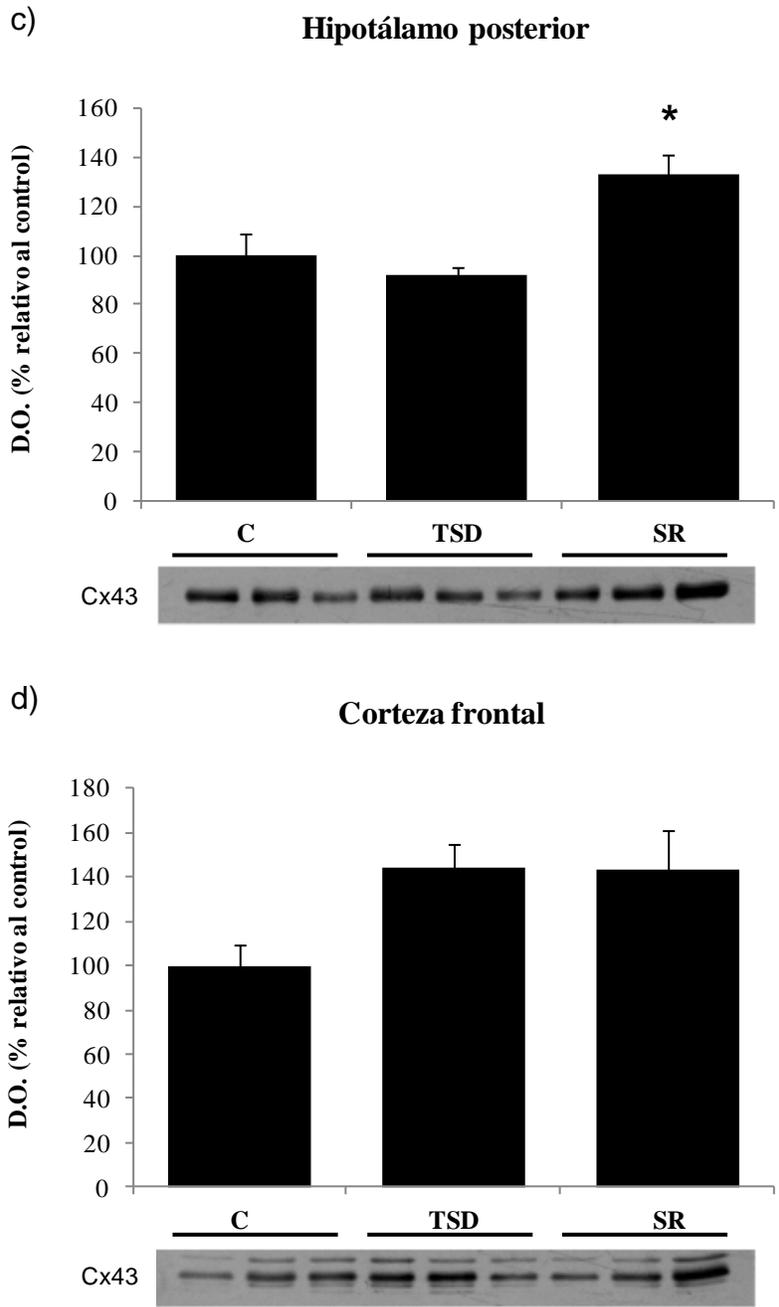


Figura R-6. Efectos de la privación total de sueño y de la recuperación de sueño sobre los niveles proteicos de Cx43 en diferentes regiones del cerebro. En la parte inferior de cada grafico se muestran membranas representativas de tres muestras por grupo obtenidas mediante Western blot. Los datos son presentados como la media \pm eem del porcentaje de densidad óptica (D.O.) relativo al grupo control. El asterisco indica que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al grupo control, Dunnett $P < 0.05$. C: control, TSD: privación total de sueño, SR: rebote de sueño.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

a) El bloqueo de las sinapsis eléctricas cambia la arquitectura del sueño de la rata

A lo largo de muchos años se han realizado una gran cantidad de trabajos para tratar de determinar las estructuras cerebrales y la naturaleza neuroquímica de los sistemas de neurotransmisión involucrados en la regulación de la vigilia y el sueño. Así, el sueño parece ser un fenómeno altamente regulado porque se han propuesto diferentes niveles de control desde genéticos hasta las interacciones reciprocas llevadas a cabo por redes neuronales centrales. Es indudable el papel del sueño en procesos como conservación de energía, función inmune, metabolismo cerebral, aprendizaje, memoria y sinaptogénesis entre otros, por consiguiente es de suma importancia conocer los mecanismos cerebrales que subyacen a que un individuo se mantenga despierto, dormido o que pase de una etapa de sueño a otra.

Este proyecto se propuso analizar la participación de las sinapsis eléctricas como un probable mecanismo subyacente a la regulación del ciclo sueño-vigilia, por lo tanto el primer razonamiento para abordar dicho problema fue evaluar los efectos del bloqueo de las sinapsis eléctricas, mediante la microinyección ICV de quinina, sobre el ciclo sueño-vigilia de la rata.

La quinina es un alcaloide natural con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas. Este compuesto era principalmente empleado en el tratamiento de la malaria hasta que fue sustituido por otros medicamentos sintéticos más eficaces, sin embargo aún se puede utilizar en el tratamiento de la malaria resistente, los calambres nocturnos en las piernas y la artritis. Aunque el mecanismo de acción

de la quinina aún no está completamente determinado, se ha propuesto que involucra la inhibición de la cristalización del grupo hemo libre, lo cual facilita su agregación y acumulación citotóxica llevando a la muerte al parásito causante de la malaria. Asimismo, la quinina parece reducir la frecuencia y severidad de los calambres nocturnos mediante la disminución de la excitabilidad de la placa motora terminal y la reducción de la contractilidad muscular (Mandal et al, 1995).

Interesantemente se ha descrito en humanos que la quinina administrada a dosis altas tiene propiedades farmacológicas capaces de afectar la visión, el oído y ocasionalmente desencadenar psicosis y confusión (Juszczak y Swiergel, 2009).

Además, está demostrado que en modelos animales la quinina posee propiedades anticonvulsivas ya que se ha observado que dosis entre 40-60 mg/kg disminuyen la duración de las crisis inducidas por pentilene-tetrazol (Nassiri-Asl et al, 2009).

Asimismo, Bostanci y Bagirici (2007) establecieron que la quinina aplicada directamente en los ventrículos laterales significativamente inhibe las descargas epilépticas inducidas por penicilina. Por otro lado, se ha señalado que la aplicación experimental de este fármaco puede causar cambios en el EEG, especialmente en el ritmo theta observado durante la vigilia y el sMOR (Golebiewski et al, 2006) y que incluso puede potenciar los efectos anestésicos producidos por el pentobarbital sódico (Nassiri-Asl et al, 2009). Todos estos estudios indican que la quinina puede tener efectos significativos en el SNC, sin embargo aún no se describían específicamente los efectos de la quinina sobre los parámetros del ciclo sueño-vigilia de la rata.

En el presente estudio demostramos principalmente que la quinina incrementa de manera significativa el tiempo total de vigilia y disminuye tanto el SOL como el

sMOR a lo largo de 24 horas. Se ha demostrado que la quinina bloquea las uniones estrechas de una forma reversible, dependiente de la concentración y específica, ya que selectivamente bloquea uniones estrechas formadas por Cx36 y no tiene efecto en los canales formados por otros tipos de Cx's (Srinivas et al, 2001). Aunque el mecanismo de acción de la quinina aún no está completamente determinado, se ha propuesto que este compuesto puede atravesar la membrana celular en su forma no cargada y enlazarse a los canales en su forma cargada después de la adición de un protón en el medio acuoso intracelular. Así, la elevación del pH extracelular incrementa la concentración de la forma no protonada e incrementa la tasa de bloqueo de la quinina mientras que el incremento del pH intracelular reduce la forma catiónica de la quinina en el citoplasma y origina un efecto opuesto. Todo esto sugiere que el sitio de enlace de la quinina está localizado intracelularmente (Srinivas et al, 2001).

Existe evidencia indirecta sobre la posible participación de las uniones estrechas en el ciclo sueño-vigilia, ya que existen reportes los cuales indican que la oleamida y la anandamida tienen propiedades inductoras de sueño porque su microinyección ICV incrementa el SOL y el sMOR a expensas de la vigilia (Cravatt et al, 1995; Murillo-Rodriguez et al, 1998). Se ha determinado que estas moléculas tienen la capacidad de bloquear uniones estrechas formadas por Cx43 las cuales se localizan principalmente en células gliales y son un elemento primordial en la comunicación entre dichas células (Guan et al, 1997; Venance et al, 1995).

Muchas neuronas en el SNC de mamíferos se comunican a través de sinapsis eléctricas, pero a diferencia de las células gliales dichas sinapsis están constituidas por uniones estrechas formadas principalmente por Cx36. Se ha

propuesto que esta proteína regula las sinapsis eléctricas mediante un proceso definido por la capacidad de las neuronas de acoplarse eléctricamente para permitir que los potenciales de acción pasen sin el retraso sináptico que existe en las sinapsis químicas, todo esto gracias al contacto citoplasmático directo mediado por uniones estrechas (Hormuzdi et al, 2001; Christie et al, 2005). El acoplamiento eléctrico también promueve la sincronización del potencial de membrana a través de las células ya que por medio de las uniones estrechas pasa una corriente que es proporcional a la diferencia de potencial y de esta forma tiende a igualar el voltaje entre las células acopladas (Vervaeke et al, 2010). Algunos datos sugieren que una proporción significativa de neuronas del SLD y PPT están eléctricamente acopladas. Tal aseveración ha sido confirmada por registros electrofisiológicos pareados de neuronas vecinas del PPT, las cuales fueron suspendidas en un medio con tetrodotoxina (inhibidor de canales de sodio) para desactivar a las sinapsis químicas y en los cuales se observó que los impulsos hiperpolarizantes aplicados a una célula inducían una corriente hiperpolarizante en la otra célula y viceversa, esto llevo a la conclusión que las neuronas de estos núcleos estaban eléctricamente acopladas (Garcia-Rill et al, 2007). En este estudio utilizamos quinina para bloquear canales de uniones estrechas formados por Cx36 y de esta forma provocar una desregulación del acoplamiento eléctrico en el cerebro principalmente en neuronas del PPT. Los resultados obtenidos indican que la administración de quinina modifica considerablemente la arquitectura del sueño de la rata, principalmente disminuyendo la duración total del sMOR a lo largo de 24 horas. Esto, ha permitido plantear la hipótesis que el acoplamiento eléctrico en las neuronas podría ser un mecanismo que participe en la regulación del ciclo sueño-

vigilia de la rata. Existe evidencia molecular acerca de la expresión génica y proteica de Cx36 en el núcleo SLD. Entre las poblaciones neuronales hasta ahora relacionadas con la regulación del sueño, tanto el PPT como el SLD han sido implicados en la modulación del sMOR (Lu et al, 2006). Esta hipótesis ha sido apoyada por reportes los cuales han demostrado que las neuronas del PPT muestran elevadas tasas de disparo durante la vigilia y el sMOR y dichas tasas disminuyen durante el SOL (Steriade et al, 1990; Datta y Sywek, 2002). Por otra parte, se han observado neuronas inmunoreactivas a c-Fos en el núcleo SLD después del incremento de sMOR originado por la exposición a 3 horas de oscuridad durante la mañana (periodo de luz) (Lu et al, 2006), además otro estudio previo reportó que la desinhibición del SLD por la aplicación de bicuculina, un antagonista GABAérgico, induce con una latencia muy corta un estado similar al sMOR (Boissard et al, 2002). Con estos argumentos, se ha propuesto que la presencia de acoplamiento eléctrico mediado por uniones estrechas formadas por Cx36 en el SLD y PPT, podría ser un mecanismo participativo en la regulación del sMOR, sin embargo este mecanismo aun no ha sido completamente esclarecido. Gracias a los resultados obtenidos en este estudio se puede sugerir que la modificación de la actividad de las uniones estrechas en el SNC originada por la quinina, podría estar fuertemente involucrada en la reducción de la expresión del sMOR en la rata.

El modafinil es un fármaco utilizado para el tratamiento de la narcolepsia, trastorno del sueño por turnos de trabajo y la somnolencia diurna excesiva asociada con apnea obstructiva del sueño gracias a su capacidad para promover la vigilia en los pacientes (Kumar, 2008). Interesantemente se ha descrito que el modafinil

modifica el acoplamiento eléctrico entre neuronas de algunas regiones del cerebro (Urbano et al, 2007; Garcia-Rill et al, 2007; Beck et al, 2008). Así, esto sugiere que los cambios del acoplamiento eléctrico en algunas regiones del SNC podrían promover cambios en los estados del sueño y la vigilia. Aunque los mecanismos por los cuales el desajuste del acoplamiento eléctrico puede alterar la duración y la alternancia entre la vigilia y el sueño aun no están claros, los resultados mostrados en este trabajo pueden proporcionar información básica para el desarrollo de posteriores estudios y también plantea la hipótesis que el acoplamiento eléctrico mediado por Cx36 puede jugar un papel determinante en la modulación del ciclo sueño-vigilia de la rata.

En este trabajo la quinina ejerce los efectos descritos mediante el bloqueo de uniones estrechas formadas por Cx36 en el cerebro gracias a las dosis utilizadas y la vía de administración ICV. Por otro lado, algunos datos sugieren que este fármaco administrado sistémicamente en altas concentraciones podría estar afectando la arquitectura del sueño de la rata. Es conocido que la administración intravenosa de quinina disminuye la concentración de glucosa plasmática y como consecuencia incrementa los niveles plasmáticos de insulina (Davis et al, 1993). En relación, se ha demostrado que una dosis única intraperitoneal de insulina es capaz de disminuir hasta el 44% del tiempo total en sMOR, por el contrario incrementar el SOL y no causar alteración significativa de la vigilia (Sangiah et al, 1982). Estos estudios podrían permitirnos especular que debido a las altas cantidades de quinina administradas, pequeñas concentraciones de dicha sustancia podrían estar alcanzando el cerebro, modificar la comunicación a través de las uniones estrechas y de esta forma alterar el ciclo sueño-vigilia de la rata.

Sin embargo hasta la fecha no se ha podido determinar específicamente si la quinina puede o no atravesar la barrera hematoencefálica.

b) La privación total y el rebote de sueño modifica los niveles proteicos de Cx36 y Cx43 en algunas regiones del cerebro de la rata

Las uniones estrechas son agrupaciones de canales intercelulares que permiten la difusión directa de iones y pequeñas moléculas como metabolitos y segundos mensajeros entre las neuronas adyacentes. Estos canales intercelulares están formados por el acoplamiento de ensamblajes hexaméricos denominados conexones los cuales a su vez están formados por subunidades proteicas llamadas Cx's (Evans y Martin, 2002; Maeda y Tsukihara, 2011). La familia de los genes que codifican para Cx's está formada por 20 genes en el ratón y 21 en el genoma humano. Estas proteínas están expresadas en todos los tejidos excepto el músculo esquelético, eritrocitos y células espermáticas maduras. Una variedad de isoformas de Cx's han sido reportadas en el SNC donde diferentes tipos celulares a menudo expresan diferentes isoformas de Cx's (Nagy y Rash, 2000; Nagy y Rash, 2003; Nagy et al, 2004; Rackauskas et al, 2010). En 1998, Condorelli y colaboradores demostraron por primera vez que la Cx36 se expresa en neuronas del cerebro con un patrón amplio y complejo. El primer análisis de hibridación *in situ* en cerebros de rata demostró que esta Cx se expresa fuertemente en la oliva inferior, bulbo olfatorio, hipocampo y varios núcleos del tallo cerebral tanto en la etapa postnatal como adulta. Asimismo, experimentos con neurotoxinas microinyectadas en el hipocampo o en la oliva inferior

confirmaron la localización neuronal de la Cx36 (Condorelli et al, 1998; Belluardo et al, 2000).

Uno de los primeros objetivos en esta parte del proyecto fue analizar bajo condiciones control los niveles basales de dos isoformas de Cx's en diferentes regiones del cerebro y en general se determinó que los niveles proteicos basales de Cx36 varían considerablemente dependiendo de la región analizada. De esta forma, se observó que los niveles encontrados en el hipotálamo son significativamente más altos cuando se comparan con el puente y la corteza frontal. Estos resultados concuerdan con estudios previos que describieron más detalladamente la distribución de la Cx36 en el SNC y confirmaron que el hipotálamo es una de las áreas cerebrales con una expresión moderada de dicha proteína, porque aunque el porcentaje de neuronas inmunoreactivas a Cx36 y la intensidad de tinción por célula no es homogénea, la vasta mayoría de los grupos neuronales del hipotálamo expresa Cx36 (Condorelli et al, 2000).

Hasta ahora no existen estudios los cuales hayan determinado los niveles de dicha proteína exclusivamente en el puente, la única aproximación que se tiene ha establecido que algunos núcleos del tallo cerebral y mesencéfalo también expresan moderadamente Cx36 (Condorelli et al, 2000). Sin embargo, los niveles que nosotros detectamos mediante western blot en una sección del tallo cerebral (puente) de ratas adultas fueron muy bajos. Esto puede estar relacionado indirectamente con algunos estudios realizados específicamente en algunos núcleos pontinos como el Locus Coeruleus y el SubCoeruleus. Se ha demostrado que los anticuerpos contra Cx36 producen una alta densidad de inmunofluorescencia al día 7 postnatal en el Locus Coeruleus de rata, de tal

manera que las regiones inmunopositivas claramente delimitan la zona rica en cuerpos celulares de dicho núcleo. Por el contrario, en la rata adulta la densidad de tinción es marcadamente reducida en comparación con los primeros días postnatales (Rash et al, 2007). Otro estudio reveló mediante western blot que los niveles proteicos de Cx36 en el SubCoeruleus son significativamente diferentes con la edad, es decir que al día 30 existe una reducción considerable en relación con el día 10 postnatal (Heister y cols, 2007). Esto podría estar explicando los bajos niveles de Cx36 que nosotros detectamos, ya que nuestras muestras del puente fueron obtenidas de cerebros de ratas adultas.

Por otra parte, el método de western blot que utilizamos prácticamente no detectó algún indicio de Cx36 en la corteza frontal. Los primeros estudios de hibridación *in situ* revelaron que existe variación en la densidad de células inmunoreactivas al ARNm de la Cx36 en las diferentes capas corticales, en resumen la reactividad está ausente en las capas superficiales pero muestra su mayor densidad en las capas IV, V y VI y este patrón es similar en las cortezas cingulada y retrosplenial (Condorelli et al, 2000). Estudios más recientes realizados en la corteza somatosensorial primaria de ratas han detectado mayor número de neuronas inmunoteñidas con anticuerpo para Cx36 e inmunoperoxidasa en la capa V durante los primeros días del desarrollo postnatal pero dicha inmunoreactividad se reduce después del día 15 y permanece en niveles muy bajos en individuos adultos (Liu y Jones, 2003; Ma et al, 2011). Aunque dichos hallazgos no han sido propiamente encontrados en la corteza que nosotros aislamos y analizamos, se podría inferir que un fenómeno similar se presenta en la corteza frontal ya que generalmente existe el consenso de que el acoplamiento eléctrico por medio de

uniones estrechas formadas por Cx36 es extenso en la corteza cerebral durante la etapa embrionaria y postnatal primaria pero declina rápidamente durante el desarrollo postnatal tardío y la etapa adulta.

Por muchos años, la única demostración de uniones intercelulares entre la glía de mamíferos había sido limitada a la evidencia descrita por microscopía electrónica la cual identificó placas de uniones estrechas y partículas intramembranales presentes en las uniones astrocíticas y en las uniones entre oligodendrocitos y astrocitos (Dermietzel et al, 1978; Massa y Mugnaini, 1982). Posteriormente, se reportó que los astrocitos están funcionalmente acoplados a otros astrocitos y a oligodendrocitos por medio de uniones estrechas. Esto pudo ser posible gracias a diversas observaciones como la transferencia intercelular de colorantes de bajo peso molecular y electrofisiológicas como la respuesta del potencial de membrana astrocítico después de la inyección de pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes en la célula vecina (Gutnick et al, 1981; Kettenmann and Ransom, 1988; Meme et al, 2009). Estudios de inmunohistoquímica han identificado y localizado a las Cx's expresadas por los astrocitos. Ahora está bien documentado que la Cx43 es expresada principalmente por estas células en el SNC desde el desarrollo temprano y que es la proteína formadora de uniones estrechas más abundante en el cerebro de roedores adultos (Dermietzel et al, 1989; Yamamoto et al, 1990; Giaume et al, 1991; Nagy y Rash, 2000). Lo anterior sustenta los resultados obtenidos en este proyecto respecto a los niveles basales de Cx43 en el cerebro de rata adulta. Es decir, nuestros resultados indican que la Cx43 es fácilmente detectable aún con cantidades relativamente pequeñas de proteína total utilizada en la electroforesis (10 µg comparada con los 50 µg de

proteína necesarios para detectar la Cx36). Más aún, la expresión de Cx43 fue más homogénea en todas las regiones analizadas y por lo tanto el análisis estadístico no mostró ninguna diferencia significativa.

Las Cx's son una familia de proteínas cuya función en el cerebro aun no está totalmente determinada, incluso la participación sobre el ciclo sueño-vigilia ha recibido muy poca atención. Existe el consenso que la función de estas proteínas puede variar dependiendo de la isoforma y del tipo celular en donde se expresa, por esta razón nos enfocamos en describir las variaciones de los niveles proteicos de una isoforma neuronal (Cx36) y otra astrocítica (Cx43). Todo esto con el objetivo de tratar de establecer una posible correlación entre dichas proteínas y la presencia prolongada de vigilia o la recuperación del sueño. Este objetivo está justificado por el estudio previo el cual indicó que el bloqueo de las uniones estrechas formadas por Cx36 suprime el sueño e incrementa significativamente la vigilia, por lo tanto se planteó hipótesis que la Cx36 podría estar participando en la modulación del sueño y que la expresión de dicha proteína podría disminuir con la vigilia prolongada e incrementar durante el rebote de sueño.

Con este fin analizamos varias regiones cerebrales entre ellas el hipotálamo el cual dividimos en una porción anterior la cual incluye a los principales núcleos promotores del SOL localizados en el área preóptica como el área preóptica ventrolateral y el núcleo preóptico medio así como una porción posterior conteniendo al hipotálamo lateral y el núcleo tuberomamilar, ambas aéreas promotoras de vigilia. El presente estudio indica que la expresión proteica de Cx36 en ambas porciones del hipotálamo disminuye su nivel después de la privación total de sueño e incluso dicho nivel se mantiene disminuido con la

recuperación de sueño. Aunque se ha propuesto que los animales adultos expresan relativamente bajos niveles de Cx36, se ha observado que estos pueden ser alterados por diferentes drogas (cocaína, anfetaminas) (McCracken et al, 2005a; McCracken et al, 2005b) y condiciones ambientales experimentales como la exposición a oscuridad total durante 1 y 7 días (Kihara et al, 2006). En la mayoría de los genes para Cx's se han identificado varios sitios de regulación transcripcional, especialmente en el gene de ratón para Cx36 se han identificado sitios de unión para proteínas regulatorias y factores de transcripción como RXR, COUP, NMyC, AP-1, Oct-1 y CREB (Cicirata et al, 2000). Existen muy pocos reportes acerca de los efectos de la manipulación del ciclo sueño-vigilia sobre la expresión de los mencionados factores de transcripción. Interesantemente se ha reportado que los niveles de expresión de CREB disminuyen en el hipocampo después de 8 y 48 horas de privación de sueño (Guzmán-Marín et al, 2006), no obstante otro estudio demostró que no existe variación en el área preóptica después de la privación de sueño pero la expresión de CREB si disminuye durante el periodo de recuperación (Dentico et al, 2009). Esto podría estar explicando parcialmente la disminución de los niveles proteicos de Cx36, sin embargo aunque la regulación a nivel transcripcional es un componente principal y determinante en la expresión génica de las Cx's es indudable que se necesitan más estudios para determinar que otros mecanismos postranscripcionales y postraduccionales pueden también estar influenciando el nivel de expresión durante la privación total de sueño y la recuperación. Tanto en el hipotálamo como en otras regiones del cerebro la presencia de uniones estrechas formadas por Cx36 promueven la sincronización neuronal gracias al acoplamiento eléctrico (Long et al, 2005;

Hormuzdi et al, 2001; Landisman et al, 2002). Así, la disminución de Cx36 en el hipotálamo provocada por la privación total de sueño probablemente esté acompañada por reducciones del acoplamiento eléctrico neuronal, lo que probablemente derivaría de manera global en alteraciones funcionales y específicamente en desincronización de la actividad neuronal en esta área del cerebro.

Por otro lado, nuestros resultados indican que la Cx43 no se ve alterada con la privación de sueño pero sus niveles se incrementan prácticamente en todas las regiones analizadas cuando las ratas presentan un periodo de recuperación. La Cx43 es una de las proteínas constituyentes de uniones estrechas más abundante y ampliamente expresada en el SNC y ha sido el tema principal de muchos estudios debido a que su expresión se encuentra frecuentemente alterada en una gran variedad de condiciones patológicas (para referencias ver Chew et al, 2010). Aunque los mecanismos moleculares específicos de cada tipo celular para regular la transcripción de la Cx43 aún no están del todo entendidos, varios estudios han llevado a una mejor comprensión de la participación de algunas moléculas en la regulación de su expresión. De esta forma, se ha propuesto que existen varios factores de transcripción y sustancias biológicas que regulan la expresión de Cx43 y entre ellos podemos mencionar a Sp1, AP-1, Wnt-11, AMP cíclico, retinoides y angiotensina II entre otros (Ai et al, 2000; Tanmahasamut y Sidell, 2005; Oyamada et al, 2005). Bajo este tópico, Lewis y colaboradores (2006) demostraron que la expresión proteica de Cx43, demostrada mediante western blot, se incrementa en células de la pituitaria anterior después de la incubación por 4 horas con diferentes concentraciones de adenosina. La adenosina en el SNC funciona como un

neuromodulador y sus efectos hipnogénicos son conocidos desde hace mucho tiempo ya que se ha reportado repetidamente que la administración sistémica y central origina efectos sedantes e inductores de sueño (Basheer et al, 2004). Se ha planteado que la adenosina es el mediador clave de la somnolencia que se presenta después de la vigilia prolongada, ya que está ampliamente documentado que la privación total de sueño por periodos largos de tiempo causa un incremento progresivo de la concentración de adenosina en la corteza frontal y el cerebro anterior basal, la cual disminuye lentamente con el periodo de recuperación de sueño (Kalinchuk et al, 2011). Estos estudios podrían estar justificando el incremento en la expresión de Cx43 encontrado en varias regiones del cerebro de rata después de la privación total de sueño. Es decir, que al incrementarse los niveles de adenosina y al ser esta una molécula activadora de la transcripción de Cx43, entonces probablemente podrían verse beneficiados los niveles de expresión de dicha proteína. En el SNC la Cx43 está asociada predominantemente con los astrocitos, estas células gliales se acoplan por medio de dichos canales formando una red funcional la cual proporciona un soporte metabólico y trófico a las neuronas mediante la liberación de ATP y la regulación de las concentraciones extracelulares de glutamato, moléculas de señalización además de iones como potasio, calcio y sodio. Kang y colaboradores (2008) proporcionaron la primera evidencia de que el ATP puede liberarse a través de canales formados por Cx43. Las imágenes de bioluminiscencia del ATP en combinación con registros de canales sencillos mostraron que la liberación de ATP coincide con las aperturas del canal y que está ausente cuando el canal de Cx43 está cerrado. Aunque estas observaciones se realizaron en células C6, este

mismo estudio identificó canales de Cx43 en la membrana de astrocitos hipocámpales con las mismas características que los expresados en las células C6.

En general, la mayoría de las teorías han asumido que el sueño tiene la misma función en todos los animales, es decir sugieren un papel determinante en la conservación de energía y en la recuperación del SNC. Sin embargo, hasta ahora solo existe un reporte el cual ha determinado los niveles de ATP durante el sueño. Este estudio mostró que los niveles de ATP se mantienen en un estado de equilibrio durante el periodo de vigilia pero dichos niveles exhiben un incremento considerable en las horas iniciales de sueño. Asimismo, este incremento es dependiente de la cantidad de sueño y no de la hora del día, ya que la privación total de sueño mediante manipulación gentil bloquea el incremento de ATP mostrado por el grupo control y retarda su aparición hasta el periodo de recuperación de sueño (Dworak et al, 2010). Integrando nuestros resultados con todos estos reportes podemos proponer que el incremento de la expresión de Cx43 observado durante la recuperación del sueño probablemente esté relacionado con el incremento en la liberación de ATP, ya que aunque seguramente existen otros mecanismos, los canales formados por Cx43 podrían ser una de las principales vías de liberación de esta molécula energética.

Todos los datos obtenidos en este estudio sugieren que la alteración de la comunicación por medio de uniones estrechas en las neuronas puede ser un mecanismo por el cual se produzcan cambios importantes en la arquitectura del sueño de la rata.

La privación y recuperación de sueño alteran de manera heterogénea la expresión de dos isoformas de Cx's en el SNC. La privación total de sueño disminuye la expresión de Cx36, dicha disminución podría estar modificando el acoplamiento eléctrico y la sincronización neuronal, lo que se podría estar traduciendo en alteraciones de la memoria, aprendizaje (Bissiere et al, 2011) e incluso cambios en locomoción (Zlomuzika et al, 2011). Por otra parte, la recuperación de sueño incrementa la expresión de Cx43 y este hallazgo podría estar relacionado con el incremento y liberación de ATP reportado durante el sueño.

Todo esto proporciona evidencia de que las sinapsis eléctricas establecidas por uniones estrechas formadas de Cx36 pueden estar facilitando la alternancia de los estados del ciclo sueño-vigilia y que no solo la Cx36 sino también la Cx43 pueden ser modificadas de manera diversa por la alteración de la homeostasis del sueño.

Este trabajo de tesis aporta datos novedosos y abre la posibilidad de realizar nuevos estudios los cuales traten de responder algunas preguntas específicas como el efecto del bloqueo de las uniones estrechas después de la privación total de sueño y el análisis de la expresión de Cx's después de un periodo más prolongado de recuperación de sueño.

BIBLIOGRAFÍA

Ai Z, Fischer A, Spray D, Brown A, Fishman G. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 2000; 105: 161-71.

Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ. Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci*, 2000; 20: 4091-8.

Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*, 1953; 118: 273-4.

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, 2004; 83: 706-16.

Basheer R, Strecker R, Thakkar M, McCarley R. Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol*, 2004; 73: 379-96.

Batini C, Moruzzi G, Palestini G, Rossi F, Zanchetti A. Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science*, 1958; 128: 30-2.

Beck P, Odle A, Wallace-Huitt T, Skinner RD, Garcia-Rill E. Modafinil increases arousal determined by P13 potential amplitude an effect blocked by gap junction antagonist. *Sleep*, 2008; 31: 1647-54.

Belluardo N, Mudo G, Trovato-Salinaro A, Le Gurun S, Charollais A, Serre-Beinier V, et al. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res*, 2000; 865: 121-38.

Bennett MV, Aljure E, Nakajima Y, Pappas G. Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science*, 1963; 141: 262-4.

Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci*, 2003; 26: 610-7.

Beyer E, Paul D, Goodenough D. Connexin family of gap junctions proteins. *J Membr Biol*, 1990; 116: 187-94.

Bissiere S, Zelikowsky M, Ponnusamy R, Jacobs N, Blair H, Fanselow M. Electrical synapses control hippocampal contributions to fear learning and memory. *Science*, 2011; 331: 87-91.

Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi P. The rat pontomedullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci*, 2002; 16: 1959-73.

Bostanci MO, Bagirici F. Anticonvulsive effects of quinine on penicillin-induced epileptiform activity: an in vivo study. *Seizure*, 2007; 16: 166-72.

- Bruzzone R, Hormuzdi S, Barbe M, Herb A, Monyer H.** Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci*, 2003; 100: 13644-9.
- Buzsaki G, Buhl D, Harris K, Csicsvari J, Czeh B, Morozov A.** Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*, 2003; 116: 201-11.
- Carskadon M, Dement W.** Normal human sleep: an overview. En: Kriger M, Roth T, Dement W. (Eds). Principles and practice of sleep medicine. 2005. pp 13-23. Elsevier. Philadelphia, USA.
- Caton R.** Researches of electrical phenomena of cerebral grey matter. *9th Int Cong Med*, 1887; 3: 246.
- Chew S, Johnson C, Green C, Danesh-Meyer H.** Role of connexin43 in central nervous system injury. *Exp Neurol*, 2010; 225: 250-61.
- Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Monyer H, Westbrook GL.** Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron*, 2005; 46: 761–72.
- Cicirata F, Parenti R, Spinella F, Giglio S, Tuorto F, Zuffardi O, Gulisano M.** Genomic organization and chromosomal localization of the mouse Connexin36 (mCx36) gene. *Gene*, 2000; 251: 123-30.
- Condorelli D, Parenti R, Spinella F, Trovato S, Belluardo N, Cardile V, et al.** Cloning of a new gap junction gen (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci*, 1998; 10: 1202-8.
- Condorelli D, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudo G.** Expression of Cx36 in mammalian neurons. *Brain Res Rev*, 2000; 32: 72-85.
- Cooper R, MacGillivray B.** Historical introduction. En: Binnie C, Cooper R, Manguiere F, Osselton J, Prior P, Tedman T. (Eds). Clinical Neurophysiology. 2003. pp 3-8. Elsevier Science. Amsterdam, Netherlands.
- Cravatt BF, Prospero-Garcia O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, et al.** Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*, 1995; 268: 1506–9.
- Datta S, Hobson A.** The rat as an experimental model for sleep neurophysiology. *Behav Neurosci*, 2000; 114: 1239-44.
- Datta S, MacLean R.** Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev*, 2007; 31: 775-824.
- Davis TM, Looareesuwan S, Pukrittayakamee S, Levy JC, Nagachinta B, White NJ.** Glucose turnover in severe falciparum malaria. *Metabolism*, 1993; 42: 334-40.
- Dement W, Kleitman N.** Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 1957; 9: 673-90.

Dement W. The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 1958; 10: 291-6.

Dentico D, Amici R, Baracchi F, Cerri M, Del Sindaco E, Luppi M, et al. c-Fos expression in preoptic nuclei as a marker of sleep rebound in the rat. *Eur J Neurosci*, 2009; 30: 651-61.

Dermietzel R, Schunke D, Leibstein A. The oligodendrocyte junctional complex. *Cell Tissue Res*, 1978; 193: 61-72.

Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, et al. Differential expression of three gap junctions proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86: 10148-52.

Dienel G, Cruz N. Neighborly interactions of metabolically-activated astrocytes in vivo. *Neurochem Int*, 2003; 43: 339-54.

Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 2001; 24: 31-55.

Dworak M, McCarley RW, Kim T, Kalinchuk AV, Basheer R. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *J Neurosci*, 2010; 30: 9007-16.

Evans WH, Martin PEM. Gap junctions: structure and function. *Mol Membr Biol*, 2002; 19: 121-36.

Farahani R, Pina-Benabou MH, Kyrozis A, Siddiq A, Barradas PC, Chiu FC, et al. Alterations in metabolism and gap junction expression may determine the role of astrocytes as “good samaritans” or executioners. *Glia*, 2005; 50: 351–61.

Fenzl T, Romanowski CP, Flachskamm C, Honsberg K, Boll E, Hoehne A, et al. Fully automated sleep deprivation in mice as a tool in sleep research. *J Neurosci Methods*, 2007; 166: 229-35.

Franken P, Dijk D, Tobler I, Borbely A. Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states and cortical temperature. *Am J Physiol*, 1991; 261: R198-208.

Furshpan E, Potter D. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol*, 1959; 145: 289-325.

García-García F, Acosta-Peña E, Venebra-Muñoz A, Murillo-Rodríguez E. Sleep-inducing factors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009; 8: 235-44.

García-García F, Drucker-Colin R. Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Prog Neurobiol*, 58: 297-314.

García-Rill E, Heister D, Ye M, Charlesworth A, Hayar A. Electrical coupling: novel mechanism for sleep-wake control. *Sleep*, 2007; 30: 1403-12.

Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D. Gap junctions in cultured astrocytes: single-channels currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron*, 1991; 6: 133-43.

Golebiewski H, Eckersdorf B, Konopacki J. Electrical coupling underlies theta rhythm in freely moving cats. *Eur J Neurosc*, 2006; 24: 1759-70.

Guan X, Cravatt BF, Ehring GR, Hall JE, Boger DL, Lerner RA, et al. The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells. *J Cell Biol*, 1997; 139: 1785-92.

Gutnick MJ, Connors BW, Ransom BR. Dye-coupling between glial cells in the guinea pig neocortical slice. *Brain Res*, 1981; 213: 486-92.

Guzman-Marin R, Ying Z, Suntsova N, Methippara M, Bashir T, Szymusiak R, et al. Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. *J Physiol*, 2006; 575: 807-19.

Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, et al. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int*, 2000; 37: 317-29.

Heister DS, Hayar A, Charlesworth A, Yates C, Zhou YH, Garcia-Rill E. Evidence of electrical coupling in the subcoeruleus (SubC) nucleus. *J Neurophysiol*, 2007; 94: 3142-7.

Hernández-Peón R, Chavez-Ibarra G, Morgane P, Timo-laria C. Limbic cholinergic pathways involved in sleep and emotional behavior. *Exp Neurol*, 1963; 8: 93-111.

Hernández-Peón R. Sleep induced by localized electrical or chemical stimulation of the forebrain. *EEG Clin Neurophysiol*, 1962; 14: 423-4.

Hobson J, McCarley R, Wyzinsky P. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, 1975; 189: 55-8.

Hormuzdi S, Pais I, LeBeau F, Towers S, Rozov A, Buhl E, et al. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin-36 deficient mice. *Neuron*, 2001; 31: 487-95.

Hormuzdi S, Filippov M, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R. Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1662: 113-37.

Ishimatsu M, Williams JT. Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *J Neurosci*, 1996; 16: 5196-204.

Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science*, 1969; 163: 32-41.

Jouvet M. Paradoxical sleep: a study of its nature and mechanisms. *Prog Brain Res*, 1965; 18: 20-62.

- Juszczak GR, Swiergiel AH.** Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009; 33: 181-98.
- Kalinchuk AV, McCarley RW, Porkka-Heiskanen T, Basheer R.** The time course of adenosine, nitric oxide (NO) and inducible NO synthase changes in the brain with sleep loss and their role in the non-rapid eye movement sleep homeostatic cascade. *J Neurochem*, 2011; 116: 260-72.
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, et al.** Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci*, 2008; 28: 4702-11.
- Kettenmann H, Ransom BR.** Electrical coupling between astrocytes and between oligodendrocytes studied in mammalian cell cultures. *Glia*, 1988; 1: 64-73.
- Kerkhofs M, Lavie P.** Frederic Bremer 1892-1982: a pioneer in sleep research. *Sleep Med Rev*, 2000; 4: 505-14.
- Kihara AH, de Castro LM, Moriscot AS, Hamassaki DE.** Prolonged dark adaptation changes connexin expression in the mouse retina. *J Neurosci Res*, 2006; 83: 1331-41.
- Konopacki J, Kowalczyk T, Golebiewski H.** Electrical coupling underlies theta oscillations recorded in hippocampal formation slices. *Brain Res*, 2004; 1019: 270-4.
- Kumar R.** Approved and investigational uses of modafinil: an evidence-based review. *Drugs*, 2008; 68: 1803-39.
- Landisman C, Long M, Beierlein M, Deans M, Paul D, Connors B.** Electrical synapse in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci*, 2002; 22: 1002-9.
- Lewis BM, Pexa A, Francis K, Verma V, McNicol AM, Scanlon M, et al.** Adenosine stimulates connexin 43 expression and gap junctional communication in pituitary folliculostellate cells. *FASEB J*, 2006; 20: 2585-7.
- Li X, Ionescu A, Lynn B, Lu S, Yasumura T, Kamasawa N, et al.** Cx47, Cx29 and Cx32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience*, 2004; 126: 611-30.
- Liu X, Jones E.** Fine structural localization of connexin-36 immunoreactivity in mouse cerebral cortex and thalamus. *J Comp Neurol*, 2003; 466: 457-67.
- Loewenstein W.** Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channels. *Physiol Rev*, 1981; 61: 829-913.
- Long MA, Jutras MJ, Connors BW, Burwell RD.** Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci*, 2005; 8: 61-6.

Loomis AL, Harvey EN, Hobart GA. Cerebral states during sleep, as studied by human brain potentials. *J Exp Psychol*, 1937; 21: 127-44

Lu J, Sherman D, Devor M, Saper C. A putative flip-flop switch for control on REM sleep. *Nature*, 2006; 441: 589-94.

Ma Y, Hioki H, Konn M, Pan S, Nakamura H, Nakamura K, et al. Expression of gap junction protein connexin36 in multiple subtypes of GABAergic neurons in adult rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex*, 2011; 5 de Abril.

Maeda S, Tsukihara T. Structure of gap junction channel and its implication for its biological function. *Cell Mol Life Sci*, 2011; 68: 1115-29.

Magnes J, Moruzzi G, Pompeiano O. Synchronization of EEG produced by low-frequency electrical stimulation of the region of the solitary tract. *Arch Ital Biol*, 1961; 99: 33-67.

Mandal AK, Abernathy T, Nelluri SN, Stitzel V. Is quinine effective and safe in leg cramps? *J Clin Pharmacol*, 1995; 35: 588-93.

Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, González-Rivera R, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospero-García O, et al. Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience*, 2003; 117: 197-201.

Massa PT, Mugnaini E. Cell junctions and intramembrane particles of astrocytes and oligodendrocytes: A freeze-fracture study. *Neuroscience*, 1982; 7: 523-38.

Maxeiner S, Kruger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience*, 2003; 119: 689-700.

McCracken C, Hamby S, Patel K, Morgan D, Vrana K, Roberts DC. Extended cocaine self-administration and deprivation produces region-specific and time-dependent changes in connexin36 expression in rat brain. *Synapse*, 2005a; 58: 141-50.

McCracken C, Patel K, Vrana K, Paul D, Roberts DC. Amphetamine withdrawal produces region-specific and time-dependent changes in connexin36 expression in rat brain. *Synapse*, 2005b; 56: 39-44.

Meme W, Vandercasteele M, Giaume C, Venance L. Electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices. *Neurosci Res*, 2009; 63: 236-43.

Mignot E. Why we sleep: The temporal organization of recovery. *PLOS Biol*, 2008; 6: 661-9.

Montes-Rodríguez C, Alavez S, Soria-Gómez E, Rueda-Orozco P, Guzmán K, Moran J, et al. BCL-2 and BAX proteins expression throughout the light–dark cycle and modifications induced by sleep deprivation and rebound in adult rat brain. *J Neurosci R*, 2009; 87: 1602-9.

Moruzzi G, Magoun H. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalog Clin Neurophysiol*, 1949; 1: 455-73.

Murillo-Rodríguez E, Sánchez M, Navarro L, Martínez-González D, Drucker R, Prospero-García O. Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res*, 1998; 812: 270-4.

Nagy JI, Patel D, Ochalski P, Stelmack G. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin30 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience*, 1999; 88: 447-68.

Nagy JI, Rash JE. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Rev*, 2000; 32: 29-44.

Nagy JI, Rash JE. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun Adhes*, 2003; 10: 401-6.

Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Torabinejad B. Antiepileptic effects of quinine in the pentylene-tetrazole model of seizure. *Seizure*, 2009; 18: 129-32.

Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci*, 2003; 23: 1659-66.

Ohara P. Synaptic organization of the thalamic reticular nucleus. *J Electron Microscop Tech*, 1988; 10: 283-92.

Orem J, Lovering A, Dunin-Barkowski W, Vidruk E. Tonic activity in the respiratory system in wakefulness, NREM and REM sleep. *Sleep*, 2002; 25: 488-96.

Orem J. Neuronal mechanism of respiration in REM sleep. *Sleep*, 1980; 3: 235-46.

Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1719: 6-23.

Palchykova S, Winsky-Sommerer R, Meerlo P, Durr R, Tobler I. Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2006; 85: 263-71.

Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol*, 2000; 10: R473-4.

Pappenheimer J, Miller T, Goodrich C. Sleep-promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep-deprived goats. *Proc Natl Acad Sci*, 1967; 58: 513-7.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, et al. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, 2005; 310: 113-6.

Paxinos G, Watson A. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.

Phelan P, Bacon J, Davies J, Stebbings L, Todman M, Avery L, et al. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet*, 1998; 14: 348-9.

Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*, 1997; 276: 1265-8.

Rackauskas M, Neverauskas V, Skeverdy V. Diversity and properties of connexin gap junctions channels. *Medicina*, 2010; 46: 1-12.

Rash J, Staines W, Yasumura T, Patel D, Furman C, Stelmack G, et al. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci*, 2000; 97: 7573-8.

Rash J, Yasumura T, Dudek F, Nagy J. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*, 2001; 21: 1983-2000.

Rash J, Olson C, Davidson K, Yasumura T, Kamasawa N, Nagy J. Identification of connexin36 in gap junctions between neurons in rodent locus coeruleus. *Neuroscience*, 2007; 147: 938-56.

Revel J, Karnovsky M. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol*, 1967; 33: C7-C12.

Roth TC, Rattenborg NC, Pravosudov VV. The ecological relevance of sleep: the trade-off between sleep, memory and energy conservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010; 365: 945-59.

Sangiah S, Caldwell DF, Villeneuve MJ, Clancy JJ. Sleep: sequential reduction of paradoxical (REM) and elevation of slow wave (NREM) sleep by a non-convulsive dose of insulin in rats. *Life Sci*, 1982; 31: 763-9.

Saper C, Scamell T, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 2005; 437: 1257-63.

Scemes E, Spray D, Meda P. Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels". *Pflugers Arch*, 2009; 457: 1207-26.

Siegel J. Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*, 2005; 437: 1264-71.

Srinivas M, Hopperstand MG, Spray DC. Quinine blocks specific gap junction channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci*, 2001; 98: 10942-7.

Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Currodossi R. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation process in thalamocortical systems. *J Neurosci*, 1990; 10: 2541-59.

Steriade M, Curro-Dossi R, Nuñez A. Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: Cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. *J Neurosci*, 1991; 11: 3200-17.

Steriade M. The corticothalamic system in sleep. *Front Biosci*, 2003; 8: D878-99.

Sterman M, Clemente C. Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Exp Neurol*, 1962; 6: 103-17.

Tanmahasamut P, Sidell N. Up-regulation of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression by retinoic acid in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90: 4151-6.

Traub R, Bibbig A, Fisahn A, LeBeau F, Whittington M, Buhl E. A model of gamma frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol in vitro. *Eur J Neurosci*, 2000; 12: 4093-106.

Triarhou L. The percipient observations of Constantin von Economo on encephalitis letargica and sleep disruption and their lasting impact on contemporary sleep research. *Brain Res Bull*, 2006; 69: 249-58.

Urbano FJ, Leznik E, Llinás RR. Modafinil enhances thalamocortical activity by increasing neuronal electrotonic coupling. *Proc Natl Acad Sci*, 2007; 104: 12554-9.

Van Bockstaele E, Garcia-Hernandez F, Fox K, Alvarez V, Williams JT. Expression of connexins during development and following manipulation of afferent input in the rat locus coeruleus. *Neurochem Inter*, 2004; 45: 421-8.

Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signaling in striatal astrocytes. *Nature*, 1995; 376: 590-4.

Vervaeke K, Lorincz A, Gleeson P, Farinella M, Nusser Z, Silver R. Rapid desynchronization of an electrically coupled interneuron network with sparse excitatory synaptic input. *Neuron*, 2010; 67: 435-51.

Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci*, 2006; 26: 5438-47.

Yamamoto T, Ochalski A, Hertzberg EL, Nagy JI. On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression. *J Comp Neurol*, 1990; 302: 853-83.

Yeager M, Harris A. Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opinion Cell Biol*, 2007; 19: 521-8.

Zappala A, Cicero D, Serapide M, Paz C, Catania M, Falchi M, et al. Expression of the pannexin1 in the CNS of the adult mouse: cellular localization and effect of 4-aminopyridine-induced seizures. *Neuroscience*, 2006; 141: 167-78.

Zlomuzica A, Viggiano D, Degen J, Binder S, Ruocco LA, Sadile AG, et al. Behavioral alterations and changes in Ca/calmodulin kinase II levels in the striatum of connexin36 deficient mice. *Behav Brain Res*, 2011.

ANEXO 1

<p>Editor en Jefe: Gerardo Gamba</p> <p>Editora Ejecutiva: María Campos</p>	<p>Revista de Investigación Clínica</p> <p>Órgano Oficial de los Institutos Nacionales de Salud</p>	<p>Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan C.P. 14000 México, D.F. Teléfono: (5255) 5487 0900 ext. 2305 Fax: (5255) 5513 0420 e-mail: revista.investigacion@quetzal.innsz.mx</p>
<p>Editores asociados</p> <p> Mara Medeiros</p> <p> Luis A. Herrera</p> <p> Gilberto Vargas</p> <p> Sergio Ponce de León</p> <p> Raúl Sansores</p> <p> Héctor Gutiérrez</p> <p> Jorge Meléndez</p> <p> Camilo Ríos</p> <p> Pedro Gutiérrez</p> <p> Antonio Ramírez</p> <p> Carlos Cruz</p> <p> Carlos Pineda</p> <p> Eduardo Lazcano</p>	<p style="text-align: right;">26 de Julio de 2011</p> <p>Dr. Javier Franco Pérez Departamento de Neurofisiología Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Insurgentes Sur No. 3877 Col. La Fama 14269 México, D. F.</p> <p style="text-align: right;">11-042</p> <p>Estimado Dr. Franco:</p> <p>El Comité Editorial ha decidido aceptar para publicación su manuscrito intitulado: "Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia", el cual aparecerá publicado próximamente. Sin embargo, vamos a necesitar recibir el manuscrito en idioma inglés. A continuación le enviamos una explicación al respecto.</p> <p>La Revista de Investigación Clínica inicia una nueva era a partir del numero 4 de 2009 en que se convierte en el órgano oficial de los Institutos Nacionales de Salud. Con este cambio la Revista tendrá más fuerza e incrementará seguramente el material de alta calidad para publicación. Uno de los cambios que estamos haciendo es que mientras la Revista seguirá publicándose en Español en su forma impresa, la vamos a publicar en inglés por vía electrónica, con el objetivo de que el inglés sea la cara de la Revista hacia el resto del mundo, lo que esperamos repercuta en incrementar la difusión internacional de nuestros artículos y el factor de impacto.</p> <p>Hemos considerado varias opciones logísticas para alcanzar este objetivo. Desafortunadamente, dada la grave crisis por la que atraviesa el país (y el mundo entero), es imposible que la Revista cubra los costos que representaría la traducción de los manuscritos. Aunado a esto, es probable que la traducción hecha por personas ajenas al artículo no resulte de la entera satisfacción de los autores, los cuales tendrían que invertir tiempo en revisiones y correcciones que resulten peor que hacer la traducción directamente. Por este motivo, estamos solicitando la cooperación de los autores como usted que tienen un manuscrito ya aceptado para publicación en idioma Español. El manuscrito se va a publicar como tal, pero le pedimos que haga favor de hacernos llegar el manuscrito en idioma inglés, para su publicación electrónica. Sabemos que esto representa trabajo, pero dado el record de publicaciones que tiene usted en inglés, suponemos que puede hacerlo sin mucho problema. Sin embargo, si prefiere enviarlo a traducir con algún profesional en traducción, nosotros podríamos proporcionarle algunos nombres de personas que pueden hacer esto por un precio razonable.</p> <p>Como el artículo en inglés debe aparecer en la versión electrónica al mismo tiempo que la impresa, no podemos programar el número en que se va a publicar su manuscrito hasta no tener la versión en inglés, por lo que le solicitamos que nos la envíe a la brevedad posible.</p> <p>Gracias por contribuir con <i>La Revista</i>. Esperamos contar nuevamente con su valiosa colaboración. Atentamente,</p> <p></p> <p>Dr. Carlos Cruz Editor Asociado</p>	

**PRINCIPALES NEUROTRANSMISORES INVOLUCRADOS EN LA REGULACION DEL CICLO
SUEÑO-VIGILIA**

Javier Franco-Pérez^{a,b}, Paola Ballesteros-Zebadúa^c, Verónica Custodio^a, Carlos Paz^a

^a*Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.*

^b*Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.*

^c*Unidad de Radioneurocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.*

Javier Franco-Pérez

Departamento de Neurofisiología

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S.

Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269 México D.F., México

Tel: +52 55 5606 38 22 ext. 2021

Fax: +52 55 5424 08 08

E-mail: jfranco@innn.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y al CONACyT por el apoyo otorgado a Javier Franco-Pérez.

CONFLICTOS DE INTERÉS

En este trabajo no existen conflictos de interés.

Resumen

La actividad neuronal en el sistema nervioso central experimenta una gran variedad de cambios electrofisiológicos a lo largo del ciclo sueño-vigilia. Estos cambios son modulados por una compleja interacción entre múltiples sistemas neuroquímicamente distintos localizados a lo largo del cerebro. Dentro del tallo cerebral e hipotálamo existen varias poblaciones neuronales que promueven la vigilia mediante la acción de diferentes neurotransmisores como noradrenalina, serotonina, histamina y orexina. Estos sistemas actúan de manera conjunta en la generación y mantenimiento de la vigilia, sin embargo aunque cada uno contribuye de manera única ninguno de estos parece ser absolutamente necesario, ya que la vigilia no se inhibe completamente en la ausencia de alguno de ellos. En contraste, neuronas localizadas en núcleos específicos del hipotálamo y el tallo cerebral están involucradas en la iniciación y mantenimiento del sueño. Estas neuronas contienen neurotransmisores como acetilcolina y GABA, las cuales proyectan y modulan la actividad de los núcleos involucrados en la regulación de la vigilia. Recientemente se han propuesto modelos que establecen que el sueño es modulado por “interruptores flip-flop”, los cuales constituyen circuitos neuronales con características neuroquímicas diferentes y que interactúan regulando la iniciación y el mantenimiento de los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia. Esta revisión se basa en estudios farmacológicos, electrofisiológicos y neuroquímicos con el objetivo de señalar y analizar los principales neurotransmisores y las estructuras cerebrales hasta ahora involucradas en la regulación de la vigilia y las diferentes etapas del sueño.

PALABRAS CLAVE: Acetilcolina, Adenosina, GABA, Histamina, Noradrenalina, Orexina, Serotonina, Sueño, Vigilia.

Abreviaturas

5-HT- serotonina

ACh - acetilcolina

APVL - área preóptica ventrolateral

CAB - cerebro anterior basal

EEG - electroencefalograma

GABA - ácido gama amino butírico

HIS - histamina

HL - hipotálamo lateral

ICV - intracerebroventricular

LC - locus coeruleus

LDT - núcleo laterodorsal tegmental

NA - noradrenalina

no MOR - sueño de no movimientos oculares rápidos

NPOM - núcleo preóptico medio

NR - núcleos del rafé

NTM - núcleo tuberomamilar

ORX - orexina

PPT - núcleo pedunculopontino tegmental

REM - rapid eye movements

REM-on - neuronas promotoras de sMOR

REM-off - neuronas inhibitoras de sMOR

sMOR - sueño de movimientos oculares rápidos

SNC - sistema nervioso central

SOL - sueño de ondas lentas

Introducción

El sueño es un estado funcional natural caracterizado por una reducción de la actividad motora voluntaria, incremento del umbral de respuesta a estímulos externos y postura estereotípica. Las diferentes etapas del sueño y la vigilia presentan patrones conductuales, bioquímicos y electrofisiológicos específicos. Incluso, a partir de los registros del EEG se pueden diferenciar a las diferentes etapas del sueño gracias a la presencia o ausencia de los llamados ritmos cerebrales, 1) ritmo delta (0.5 - 3.9 Hz), 2) ritmo theta (4 – 7.9 Hz), 3) ritmo alfa (8 – 12.9 Hz), 4) ritmo beta (13 – 19.9 Hz) y 5) ritmo gamma (20 – 100 Hz). El sueño normal en el humano comprende dos estados, el sMOR o también llamado sueño REM y el sueño no MOR convencionalmente subdividido en tres etapas. En la etapa 1 del sueño no MOR, el EEG presenta actividad de bajo voltaje y una frecuencia que combina ritmos alfa y theta. En la etapa 2, la actividad cerebral es predominantemente theta, son característicos de esta fase los husos de sueño (brotes de 0.5 a 2 segundos de actividad beta) y los complejos K (ondas bifásicas de gran amplitud). Finalmente, la etapa 3 se caracteriza por presentar actividad delta de gran voltaje, los investigadores a menudo se refieren a esta etapa como SOL, sueño delta o sueño profundo. Por otra parte, el sueño en modelos experimentales como la rata ha sido dividido solamente en SOL y sMOR. En los registros corticales se ha notado que el SOL esta caracterizado por actividad delta de gran amplitud mientras que en el sMOR se observan ondas rápidas y de bajo voltaje paradójicamente similares a las presentes durante la vigilia (Figura 1). Y como lo describieran por primera vez Aserinsky y Kleitman¹, el sMOR también se distingue por la presencia de movimientos oculares rápidos y la ausencia de tono muscular.

A lo largo de la historia se han realizado una gran cantidad de trabajos para tratar de determinar las estructuras cerebrales y los sistemas de neurotransmisores involucrados en la regulación de la vigilia y el sueño. Incluso, se conocen varias moléculas como péptidos, citocinas y algunas de naturaleza lipídica las cuales modifican el sueño y que se han denominado factores inductores de sueño². Esta revisión tiene el objetivo de señalar y analizar los principales neurotransmisores y las estructuras cerebrales involucradas en la regulación del ciclo sueño-vigilia. Asimismo, se hace una integración de los diferentes neurotransmisores en modelos previamente descritos los cuales

consisten en circuitos neuronales con características neuroquímicas diferentes y que interactúan modulando la generación o la inhibición de los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia.

NA

La demostración histoquímica en los años 60's de la presencia de neuronas noradrenérgicas, específicamente en un núcleo pontino denominado LC, permitió a Jouvet y colaboradores realizar trabajos pioneros en la regulación del sueño y la vigilia. Dichos estudios demostraron que las lesiones electrofíticas del LC podían interrumpir el sMOR e incluso dependiendo de la extensión de la lesión se podía eliminar completamente dicho estado. Estos resultados han sido sujetos de revisión ya que no ha sido posible reproducir tales resultados mediante métodos más finos de lesión del LC. Posteriormente, se determinó que el LC es el sitio principal de proyecciones eferentes a la mayoría de las estructuras del cerebro anterior que son invadidas por neuronas noradrenérgicas^{3,4}. Las neuronas de este núcleo exhiben actividad dependiente del estado, es decir las tasas de disparo más altas se observan durante la vigilia, tasas casi nulas durante el SOL y el cese completo de la tasa de disparo durante el sMOR^{5,6}. Se ha propuesto que las neuronas noradrenérgicas del LC son un elemento principal en la regulación de la vigilia y los despertares. Los estudios farmacológicos que utilizan diversos agentes para manipular la neurotransmisión noradrenérgica han mostrado que la infusión directa de NA así como la de los agonistas fenilefrina, isoproterenol y clenbuterol en regiones invadidas por neuronas noradrenérgicas como el área septal medial y el NPOM, produce incrementos del tiempo total de vigilia^{7,8}. También se ha determinado que las drogas que antagonizan a los receptores noradrenérgicos, como el prazosin, yohimbina y propranolol incrementan la actividad de ondas lentas en el EEG⁹ y el tiempo total de sMOR en ratas¹⁰. Las drogas que estimulan la liberación o bloquean la recaptura de NA incrementan o prolongan la vigilia y son usadas para tratar la hipersomnolencia. De estas, el modafinil es la más usada recientemente ya que es un agente promotor de la vigilia y está autorizada para su uso en pacientes con somnolencia excesiva asociada con narcolepsia, síndrome de apnea obstructiva de sueño y desorden de sueño por turnos de trabajo¹¹. Todos estos estudios han sugerido que la NA juega un papel importante en la regulación de la vigilia.

5-HT

Las neuronas serotoninérgicas están distribuidas principalmente en los NR, los cuales son grupos de neuronas que se extienden a lo largo del tallo cerebral y proyectan a diferentes regiones del cerebro. A finales de los años sesentas este neurotransmisor se involucró en la generación de sueño a partir de los trabajos pioneros de Jouvet¹². Inicialmente se consideró que participaba únicamente en la regulación del SOL debido a que la inhibición de la síntesis de 5-HT y la destrucción de neuronas del NR originaba un estado de insomnio total. Esta apreciación ha cambiado debido a todos los estudios realizados desde entonces en modelos experimentales como gatos y ratas. En ambas especies, la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas y la concentración de 5-HT extracelular en el rafé dorsal es consistentemente más alta durante la vigilia, disminuye progresivamente a lo largo del SOL y alcanza su mínimo nivel durante el sMOR^{13,14}. Se ha propuesto que este sistema participa en el mantenimiento de la vigilia, dicha afirmación ha sido apoyada por estudios farmacológicos en los cuales se observó que la administración sistémica de agonistas del receptor 5-HT (1A) como 8-OH-DPAT y RU-24969, incrementan la vigilia y reducen el SOL y sMOR^{15,16}. Asimismo, la activación de diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos en el rafé dorsal por medio de diferentes agentes como CP-94253, LP-44 y m-CPBG origina predominantemente supresión del sMOR¹⁷⁻¹⁹. Por otra parte, se ha determinado que la reducción en la neurotransmisión serotoninérgica mediante la administración de antagonistas como ritanserina, MDL-100907, RO-4368554 y S-32006 incrementa el SOL y disminuye la vigilia²⁰⁻²². El origen de los cambios en la actividad serotoninérgica en los NR a lo largo del ciclo sueño vigilia aún no está claramente definido. Sin embargo, se ha propuesto que dicha actividad es regulada por mecanismos GABAérgicos que involucran a los receptores 5-HT(2C)²³ y por la acción de neuropéptidos como las orexinas mediante mecanismos excitatorios directos e inhibitorios indirectos²⁴.

ACh

La importancia del sistema colinérgico en la generación del sMOR fue documentada desde la década de los sesentas. Hernández-Peón fue el primero en proponer que el sistema colinérgico estaba implicado en la generación del sueño ya que demostró que la estimulación de diferentes

áreas del cerebro con cristales de ACh originaba secuencias completas de sueño, es decir episodios de SOL seguidos de sMOR. Estudios más recientes han demostrado que existen importantes grupos de neuronas colinérgicas en el CAB y también en el tallo cerebral, estas últimas agrupadas en los núcleos PPT y LDT. Estudios electrofisiológicos en el CAB, PPT y LDT mostraron que las neuronas colinérgicas descargan a tasas significativamente más altas durante la vigilia y el sMOR en comparación con el SOL^{25,26}. Algunos reportes han encontrado mediante microdiálisis que la liberación de ACh en el CAB y en otras regiones como la corteza y el tálamo es más elevada durante la vigilia y el sMOR, es decir durante los estados con mayor activación cortical^{27,28}. También, se ha demostrado que la administración oral de donepezil, el cual inhibe el metabolismo de la ACh, aumenta los niveles de ACh y por consiguiente el tiempo total de vigilia²⁹. Los estudios farmacológicos han permitido determinar que la microinyección de agonistas colinérgicos del tipo muscarínicos (M) como oxotremorina y carbacol o neostigmina, un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, en la formación reticular pontina incrementa el tiempo total de sMOR³⁰⁻³². Asimismo, este efecto puede ser bloqueado por el efecto antagónico de la metocramina sobre los receptores M2 y M4³⁰. El papel de los receptores nicotínicos sobre la generación del sMOR es controversial ya que se ha descrito que la microinyección de nicotina en la formación reticular pontina incrementa el sMOR³³, sin embargo recientemente se determinó que la administración sistémica crónica lleva a la disminución de SOL y sMOR así como al incremento de vigilia³⁴. Durante muchos años se planteó la hipótesis que las neuronas colinérgicas del tallo cerebral tenían un papel primordial sobre la atonía muscular presente en el sMOR³⁵, sin embargo estudios recientes han demostrado que la medula supraolivar la cual contiene neuronas glutamatérgicas que proyectan hacia el asta ventral de la medula espinal es un elemento primordial del circuito regulador de la atonía muscular del sMOR³⁶.

GABA

Desde los trabajos de Krnjevic y colaboradores, es bien conocido que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio y que se localiza ampliamente a lo largo del SNC. Los primeros trabajos que intentaron relacionar al GABA con el sueño fueron realizados a finales de los años sesentas y principios de los setentas y en los cuales mostraron que el incremento central de GABA por medio

de su infusión ICV principalmente aumentaba el SOL e inducía una caída de sMOR. En la actualidad es bien sabido que en el hipotálamo, específicamente en el NPOM y en el APVL, existen neuronas GABAérgicas las cuales exhiben un patrón específico de descarga elevada durante el SOL y sMOR^{37,38}. Estas zonas inervan múltiples regiones promotoras de la vigilia, incluyendo el LC, rafe dorsal, NTM, PPT/LDT y el área perifornical del HL. Se ha planteado que estas neuronas GABAérgicas pueden promover el sueño por medio de la inhibición de los sistemas involucrados en la vigilia y los despertares^{39,40}. Las benzodiazepinas son utilizadas para tratar al insomnio ya que incrementan la señalización GABAérgica y de esta forma promueven un efecto hipnótico caracterizado por disminución de la vigilia, incremento del tiempo total de SOL y disminución de la latencia de aparición del SOL^{41,42}. Aunque estos fármacos han sido ampliamente usados, provocan varios efectos secundarios que incluyen alteraciones en la arquitectura del sueño por la reducción de sMOR, problemas en la memoria y síndrome de abstinencia. Existe un grupo de hipnóticos no-benzodiazepínicos y que se unen al receptor GABA_A como el zolpidem y la zopiclona los cuales han demostrado una eficacia hipnótica⁴³ similar a las benzodiazepinas además de un excelente perfil de seguridad; es decir, estos fármacos generalmente causan menos alteraciones secundarias en la arquitectura normal del sueño y en la memoria⁴⁴. Estudios experimentales han demostrado la acción promotora del GABA sobre el sueño mediante el uso de algunas sustancias agonistas y antagonistas de este neurotransmisor. Lancel y cols⁴⁵ encontraron un incremento de SOL y sMOR después de la aplicación de muscimol. Más recientemente, se describió que la administración intraperitoneal en ratones de un nuevo agonista GABAérgico, el E-6199, promueven un incremento del SOL⁴⁶, este mismo efecto se ha observado después de la infusión directa en el hipotálamo de otro agonista GABAérgico denominado gaboxadol⁴⁷. Por el contrario, el CGP-36742 cuya acción principal es antagonizar a los receptores GABA_B y GABA_C, incrementa el tiempo total de vigilia y disminuye el SOL⁴⁸. Todos estos datos sugieren que la inhibición GABAérgica efectuada principalmente sobre los núcleos promotores de vigilia es un mecanismo determinante que contribuye a la generación de episodios de sueño, principalmente SOL.

HIS

Las neuronas histaminérgicas en el cerebro de mamíferos están localizadas en el área hipotalámica posterior, concentradas particularmente en el NTM y desde esta región mandan sus axones hacia prácticamente todo el sistema nervioso central^{49,50}. De manera similar a las neuronas del LC y del rafé dorsal, las neuronas histaminérgicas del NTM están activas solamente durante la vigilia, cesan el disparo antes de la aparición de ondas lentas en el EEG y permanecen silentes durante el SOL y sMOR^{51,52}. Existen 3 tipos de receptores histaminérgicos expresados en el cerebro y farmacológicamente se ha demostrado que la estimulación de los tipos H1 y H2 favorece la aparición de vigilia a expensas del SOL y sMOR^{53,54}. En contraste, los tratamientos que actúan como antagonistas de los receptores H1 o que inhiben específicamente la acción de la HIS-descarboxilasa originan una disminución significativa de la vigilia y de la latencia al SOL así como un incremento del tiempo total de SOL y sMOR^{55,56}. Se ha determinado que los receptores H3 controlan la actividad de las neuronas histaminérgicas por medio de la autoinhibición presináptica⁵⁰. A causa de que los H3 controlan la síntesis, liberación y recaptura de HIS, se ha propuesto que el mantenimiento de la vigilia podría estar modulado por dichos receptores y sus ligandos⁵⁷. De esta forma, se ha descrito que los antagonistas de los H3, tioperamida y ciproxifano incrementan la vigilia y los ritmos rápidos corticales del EEG. Por el contrario, la administración de un agonista de los receptores H3, como el imetit, aumenta el SOL y atenúa en forma dosis-dependiente el incremento de vigilia originado por el ciproxifano⁵⁸. Estos datos sustentan la hipótesis de que los antagonistas de los H3 incrementan la concentración de HIS sináptica lo que a su vez activa a los receptores postsinápticos H1 promoviendo la vigilia. Todos estos resultados indican que las neuronas histaminérgicas tienen un papel determinante en los mecanismos de mantenimiento de la vigilia.

ORX

Las ORX A y B son moléculas de naturaleza peptídica las cuales fueron recientemente descubiertas y relacionadas con la promoción y mantenimiento de la vigilia. Dichos péptidos fueron descubiertos simultáneamente en 1998 por dos grupos de investigadores^{59,60}, posteriormente se describieron como neuropeptidos sintetizados por un grupo de neuronas principalmente localizadas

en el HL y en menor proporción en el posterior y dorsomedial además del núcleo perifornical⁶¹. Estas neuronas orexinérgicas proyectan y activan núcleos histaminérgicos, noradrenérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos del hipotálamo y tallo cerebral y de esta forma mantienen y consolidan los episodios de vigilia⁶². Recientemente se ha observado en registros electrofisiológicos *in vivo* que las neuronas orexinérgicas exhiben una descarga tónica altamente específica de la vigilia, virtualmente cesan la tasa de disparo en el SOL, durante el sMOR permanecen relativamente silentes e incrementan su disparo antes del final del episodio de sMOR^{63,64}. La primera relación entre las ORX y la narcolepsia, un trastorno del sueño caracterizado por somnolencia excesiva e intrusiones de sMOR durante la vigilia, se originó a partir de un estudio realizado en caninos narcolépticos que reveló una mutación en el gene que codifica para el receptor 2 de la ORX⁶⁵. Posteriormente, se describió que en humanos afectados existe una disminución significativa de la expresión del receptor 1 para ORX⁶⁶, así como una reducción en el número de neuronas orexinérgicas^{67,68}. Se ha demostrado que las neuronas noradrenérgicas del LC reciben una densa inervación orexinérgica y además responden a la aplicación de ORX A incrementando su tasa de disparo⁶⁹, asimismo la administración de ORX A, B o el [Ala11]orexin-B, un agonista selectivo del receptor tipo 2, incrementa significativamente la duración de la vigilia hasta en un 150% y también disminuye la duración del SOL y sMOR^{69,70}. Por el contrario, el almorexanto, un antagonista orexinérgico que se une a ambos receptores, tiene la capacidad de promover el sueño ya que incrementa el SOL y el sMOR a expensas de la vigilia⁷¹.

Adenosina

Aunque no es considerado propiamente como un neurotransmisor, la adenosina funciona como un neuromodulador en el sistema nervioso central ya que tiene la capacidad de inhibir la actividad neuronal y la liberación del neurotransmisor. Se ha descrito que las concentraciones de adenosina en el cerebro incrementan significativamente durante la privación y fragmentación del sueño y dichas concentraciones disminuyen lentamente durante el periodo de recuperación de sueño^{72,73}. Estos datos sugieren que la adenosina es un factor endógeno involucrado en la homeostasis del sueño ya que probablemente promueve la hipersomnolencia presentada después de la vigilia prolongada. Algunos estimulantes como la cafeína, teofilina y paraxantina actúan como

antagonistas de los receptores para adenosina y de esta forma promueven significativamente la vigilia y proporcionalmente reducen el SOL y sMOR^{74,75}. Recientemente se propuso que la adenosina tiene un papel funcional en el control de la activación orexinérgica, ya que la microinyección en el HL del antagonista de los receptores A1, el DPX, produce un incremento significativo de la vigilia con una reducción concomitante del SOL y sMOR⁷⁶. Por otra parte, ha sido descrito que la administración de adenosina o de fármacos agonistas de los receptores para adenosina, originan un aumento de SOL y retraso de sMOR tanto en ratas como en humanos. La perfusión de adenosina en núcleos colinérgicos e histaminérgicos como el LDT y el NTM respectivamente, produce una disminución de la vigilia además de un incremento significativo del SOL y sMOR^{77,78}. Así, estos estudios sugieren que el efecto inductor de sueño de la adenosina podría depender en parte de la inhibición de los sistemas promotores de vigilia en el cerebro.

En general, existen muchas moléculas que tienen la capacidad de modificar el sueño e incluso se ha propuesto que no solo está regulado por sinapsis químicas sino también por sinapsis eléctricas⁷⁹, sin embargo los sustratos químicos y neuronales hasta ahora mencionados y resumidos en la Tabla 1, son los principales blancos de fármacos estimulantes e hipnóticos.

Integración de los sistemas neuroquímicos en modelos “flip-flop” para la regulación del SOL y el sMOR

Para poder entender cómo se regula el sueño es necesario tener en consideración las interacciones recíprocas entre los distintos sistemas de vigilia y los núcleos promotores del sueño. Una serie de grupos neuronales monoaminérgicos los cuales podemos denominar sistemas de vigilia están localizados en el LC (NA), los NR (5-HT) y el NTM (HIS). Las neuronas de dichos núcleos comparten la característica que su tasa de disparo es mayor durante la vigilia, va disminuyendo durante el SOL y prácticamente dejan de descargar durante el sMOR. La alta actividad de los núcleos monoaminérgicos durante la vigilia modula la actividad del NPOM y el APVL, los cuales son regiones GABAérgicas que promueven principalmente el SOL. Por el contrario, durante el SOL estos núcleos descargan rápidamente y dado que su naturaleza es GABAérgica, inhiben a los grupos monoaminérgicos. Saper⁸⁰ denominó a esta interacción recíproca como “interruptor flip-flop”, ya que es un circuito de retroalimentación que genera dos

posibles patrones de descarga. Este interruptor puede ayudar a producir transiciones entre la vigilia y el SOL e incluso se ha propuesto que es estabilizado por las neuronas del HL (ORX) las cuales pueden excitar a los sistemas promotores de vigilia y de esta forma asegurar la prevalencia de la vigilia (Figura 2).

Por otra parte, uno de los principales temas a elucidar ha sido la neuromodulación del sMOR. El primer modelo acerca de la regulación del sMOR enfatizó las interacciones entre neuronas colinérgicas de la formación reticular específicamente del campo tegmental gigantocelular y neuronas monoaminérgicas del LC (NA) y del NR (5-HT). De esta forma, Hobson⁸¹ y colaboradores en 1975 propusieron un modelo de interacción recíproca basado en la existencia de un circuito generador de sMOR. Este modelo estaba sustentado en el hecho que durante el sMOR las neuronas colinérgicas, denominadas REM-on por su capacidad de promover el sMOR, incrementan su tasa de disparo mientras que las neuronas monoaminérgicas, denominadas REM-off por inhibir la aparición del sMOR, prácticamente cesan su actividad. Ciertamente, se propuso que durante la vigilia el sistema monoaminérgico estaba tónicamente activo, de esta forma tenía la capacidad de inhibir la actividad del sistema colinérgico y finalmente impedir la aparición de sMOR. Por el contrario, durante el SOL la inhibición monoaminérgica disminuía permitiendo cierta excitación colinérgica la cual alcanzaba sus picos máximos al comienzo del sMOR. Así, se promovía la generación de sMOR mediante la inactivación del LC y NR y la activación de los núcleos colinérgicos del tallo cerebral (Figura 3A).

En contraste a este primer modelo el cual enfatizaba principalmente interacciones de neuronas monoaminérgicas y colinérgicas, en el 2006 se propuso un nuevo modelo en donde el principal mecanismo para la generación de sMOR añadía interacciones recíprocas entre poblaciones de neuronas GABAérgicas REM-on y REM-off localizadas en el tegmento mesopontino. Gracias al uso de trazadores anterogradados se identificaron regiones REM-off (inhibidoras de sMOR) localizadas en la parte ventrolateral de la sustancia gris periacueductal y en el tegmento pontino lateral, así como regiones REM-on (promotoras de sMOR) situadas en el núcleo sublaterodorsal y en la región precoeruleus. Aunque en este modelo las neuronas colinérgicas del PPT y LDT y las monoaminérgicas del LC y el NR no son los elementos centrales, aun conservan un importante

papel modulador tanto en la generación como inhibición del sMOR respectivamente⁸². En general, este modelo plantea que durante la vigilia las neuronas orexinérgicas del HL están activas y pueden excitar regiones REM-off (GABA, NA, 5-HT) impidiendo así la aparición de sMOR. Durante el SOL, al estar activas regiones GABAérgicas como el APVL se permite la inhibición de las regiones REM-off, al estar inactivas se libera la inhibición de las regiones REM-on (GABA, ACh) y de esta forma se permitiría la generación de un episodio de sMOR (Figura 3B).

Conclusiones

Gracias al descubrimiento del EEG, el cual marco el comienzo de la era científica en la investigación del sueño, se establecieron las bases para la identificación de las diferentes etapas del sueño. A partir de ese hecho, se han conducido una gran cantidad de estudios los cuales han generado un progreso significativo en el conocimiento de los mecanismos neuronales que regulan principalmente a la vigilia, SOL y sMOR. Es ahora aceptado que la modulación de dichos estados involucra a una serie de grupos neuronales neuroquímicamente distintos y localizados a lo largo del cerebro. Básicamente, en el hipotálamo y tallo cerebral existen múltiples sistemas neuronales (NA, 5-HT, HIS, ORX) que se activan para promover y mantener la vigilia. La actividad de estos sistemas promotores de vigilia es regulada por poblaciones de neuronas promotoras de sueño (GABA) localizadas en el hipotálamo y que activamente participan en la iniciación del SOL. A su vez, existe evidencia que indica que ciertos núcleos pontinos (GABA, ACh) interactúan recíprocamente promoviendo el sMOR. Así, podemos decir que las inhibiciones mutuas entre los diferentes sistemas promotores de vigilia y de sueño SOL y sMOR son necesarias para regular el ciclo sueño-vigilia. Finalmente, el sueño parece ser un fenómeno altamente regulado ya que se han propuesto diferentes niveles de control desde genéticos hasta los procesos mencionados en esta revisión y que son llevados a cabo por redes neuronales centrales. Es indudable el papel del sueño en procesos como conservación de energía, función inmune, metabolismo cerebral, aprendizaje, memoria y sinaptogénesis entre otros, por consiguiente creemos que es de suma importancia conocer los mecanismos cerebrales que subyacen a que un individuo se mantenga despierto, dormido o que pase de una etapa de sueño a otra.

Bibliografía

1. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 1953; 118: 273-4.
2. García-García F, Acosta-Peña E, Venebra-Muñoz A, Murillo-Rodríguez E. Sleep-inducing factors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; 8: 235-44.
3. Lee SB, Beak SK, Park SH, Waterhouse BD, Lee HS. Collateral projection from the locus coeruleus to whisker-related sensory and motor brain regions of the rat. *J Comp Neurol* 2009; 514: 387-402.
4. Sharma Y, Xu T, Graf WM, Fobbs A, Sherwood CC, Hof PR, et al. Comparative anatomy of the locus coeruleus in humans and nonhuman primates. *J Comp Neurol* 2010; 518: 963-71.
5. Aston-Jones G, Bloom F. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1981; 1: 876-86.
6. Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K. Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience* 2010; 169: 1115-26.
7. Berridge CW, Stellick R, Schmeichel B. Wake-promoting actions of medial basal forebrain beta2 receptor stimulation. *Behav Neurosci* 2005; 119: 743-51.
8. Berridge CW. Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev* 2008; 58: 1-17.
9. Berridge CW, España R. Synergistic sedative effects of noradrenergic alpha (1) and beta-receptor blockade on forebrain electroencephalographic and behavioral indices. *Neuroscience* 2000; 99: 495-505.
10. Pal D, Mallick BN. Role of noradrenergic and GABA-ergic inputs in pedunculo pontine tegmentum for regulation of rapid eye movement sleep in rats. *Neuropharmacology* 2006; 51: 1-11.
11. Kumar R. Approved and investigational uses of modafinil: an evidence-based review. *Drugs* 2008; 68: 1803-39.
12. Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 1969; 163: 32-41.
13. Urbain N, Creamer K, Debonnel G. Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. *J Physiol* 2006; 573: 679-95.
14. Monti JM. The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep Med Rev* 2010; 14: 319-27.
15. Dzoljic M, Ukponmwan O, Saxena P. 5-HT1-like receptor agonists enhance wakefulness. *Neuropharmacology* 1992; 31: 623-33.
16. Tejada S, Rial RV, Gamundí A, Esteban S. Effects of serotonergic drugs on locomotor activity and vigilance states in ring doves. *Behav Brain Res* 2011; 216: 238-46.
17. Monti JM, Jantos H, Lagos P. Activation of serotonin 5-HT(1B) receptor in the dorsal raphe nucleus affects REM sleep in the rat. *Behav Brain Res* 2010; 206: 8-16.
18. Monti JM, Leopoldo M, Jantos H. The serotonin 5-HT7 receptor agonist LP-44 microinjected into the dorsal raphe nucleus suppresses REM sleep in the rat. *Behav Brain Res* 2008; 191: 184-9.

19. Monti JM, Jantos H. Activation of the serotonin 5-HT₃ receptor in the dorsal raphe nucleus suppresses REM sleep in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32: 940-7.
20. Kantor S, Jakus S, Bodizs R, Halasz P, Bagdy G. Acute and long-term effects of the 5-HT₂ receptor antagonist ritanserin on EEG power spectra, motor activity and sleep: changes at the light-dark phase shift. *Brain Res* 2002; 943: 105-11.
21. Morairty SR, Hedley L, Flores J, Martin R, Kilduff TS. Selective 5HT_{2A} and 5HT₆ receptor antagonists promote sleep in rats. *Sleep* 2008; 31: 34-44.
22. Descamps A, Rousset C, Millan MJ, Spedding M, Delagrance P, Cespuglio R. Influence of the novel antidepressant and melatonin agonist/serotonin_{2C} receptor antagonist, agomelatine, on the rat sleep-wake cycle architecture. *Psychopharmacology* 2009; 205: 93-106.
23. Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E, Sharp T. In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 861-9.
24. Liu R, van den Pol AN, Aghajanian G. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 2002; 22: 9453-64.
25. Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro R. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 1990; 10: 2541-59.
26. Hassani OK, Lee MG, Henny P, Jones BE. Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *J Neurosci* 2009; 29: 11828-40.
27. Marrosu F, Portas C, Mascia M, Casu M, Fa M, Giagheddu M, et al. Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* 1995; 671: 329-32.
28. Vazquez J, Baghdoyan HA. Basal forebrain acetylcholine release during REM sleep is significantly greater than during waking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R598-601.
29. Ishida T, Kamei C. Characteristic effects of anti-dementia drugs on rat sleep patterns. *J Pharmacol Sci* 2009; 109: 449-55.
30. Coleman C, Lydic R, Baghdoyan H. M₂ muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation. *Neuroscience* 2004; 126: 821-30.
31. Marks G, Birabil C. Carbachol induction of REM sleep in the rat is more effective at lights-out than lights-on. *Brain Res* 2007; 1142: 127-34.
32. Fenik VB, Kubin L. Differential localization of carbachol- and bicuculline-sensitive pontine sites for eliciting REM sleep-like effects in anesthetized rats. *J Sleep Res* 2008; 18: 99-112.
33. Velazquez-Moctezuma J, Shalauta MD, Gillin JC, Shiromani PJ. Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicits REM sleep. *Neurosci Lett* 1990; 115: 265-8.
34. Vázquez-Palacios G, Hernández-González M, Guevara Pérez MA, Bonilla-Jaime H. Nicotine and fluoxetine induce arousing effects on sleep-wake cycle in antidepressive doses: a possible mechanism of antidepressant-like effects of nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 94: 503-9.
35. Fuller PM, Saper CB, Lu J. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol* 2007; 584: 735-41.

36. Vetrivelan R, Fuller PM, Tong Q, Lu J. Medullary circuitry regulating rapid eye movement sleep and motor atonia. *J Neurosci* 2009; 29: 9361-9.
37. Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D. Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 1998; 803: 178–88.
38. Suntsova N, Szymusiak R, Alam MN, Guzman-Marin R, McGinty D. Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol* 2002; 543: 665–77.
39. Suntsova N, Guzman-Marin R, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D. The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *J Neurosci* 2007; 27: 1616-30.
40. Szymusiak R, McGinty D. Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1129: 275-86.
41. Hirase M, Ishida T, Kamei C. Rebound insomnia induced by abrupt withdrawal of hypnotics in sleep-disturbed rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 597: 46-50.
42. Passarella S, Doung MT. Diagnosis and treatment of insomnia. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65: 927-34.
43. Xi M, Chase MH. Effects of eszopiclone and zolpidem on sleep and waking states in the adult guinea pig. *Sleep* 2008; 31: 1043-51.
44. Nutt DJ, Stahl SM. Searching for perfect sleep: the continuing evolution of GABAA receptor modulators as hypnotics. *J Psychopharmacol* 2010; 24: 1601-12.
45. Lancel M, Grönlein T, Faulhaber J. Role of GABAA receptors in sleep regulation. Differential effects of muscimol and midazolam on sleep in rats. *Neuropsychopharmacology* 1996; 15: 63-74.
46. Alexandre C, Dordal A, Aixendri R, Guzman A, Hamon M, Adrien J. Sleep-stabilizing effects of E-6199, compared to zopiclone, zolpidem and THIP in mice. *Sleep* 2008; 31: 259-70.
47. Thakkar MM, Winston S, McCarley RW. Effect of microdialysis perfusion of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo-[5,4-c]pyridine-3-ol in the perifornical hypothalamus on sleep-wakefulness: role of delta-subunit containing extrasynaptic GABAA receptors. *Neuroscience* 2008; 153: 551-5.
48. Deschaux O, Froestl W, Gottesmann C. Influence of a GABA(B) and GABA(C) receptor antagonist on sleep-waking cycle in the rat. *Eur J Pharmacol* 2006; 535: 177-81.
49. Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, et al. Distribution of histaminergic system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res* 1984; 295: 13-25.
50. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 2008; 88: 1183-241.
51. Takahashi K, Lin JS, Sakai K. Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 2006; 26: 10292-8.
52. Sakai K, Takahashi K, Anaclet C, Lin JS. Sleep-waking discharge of ventral tuberomammillary neurons in wild-type and histidine decarboxylase knock-out mice. *Front Behav Neurosci* 2010; 4: 53.

53. Monti J, Pellejero T, Jantos H. Effects of H1- and H2-histamine receptor agonists and antagonists on sleep and wakefulness in the rat. *J Neural Transm* 1986; 66: 1-11.
54. Ramesh V, Thakkar M, Strecker R, Basheer R, McCarley R. Wakefulness-inducing effects of histamine in the basal forebrain of freely moving rats. *Behav Brain Res* 2004; 152: 271-8.
55. Tokunaga S, Takeda Y, Shinomiya K, Hirase M, Kamei C. Effects of Some H1-Antagonists on the Sleep-Wake Cycle in Sleep-Disturbed Rats. *J Pharmacol Sci* 2007; 103: 201-6.
56. Tokunaga S, Tsutsui R, Obara Y, Ishida T, Kamei C. Effects of histamine H1-antagonists on sleep-awake state in rats placed on a grid suspended over water or on sawdust. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 51-4.
57. Lin JS, Sergeeva OA, Haas HL. Histamine H3 receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 17-23.
58. Parmentier R, Anaclet C, Guhenec C, Brousseau E, Bricout D, Giboulot T, et al. The brain H3-receptor as a novel therapeutic target for vigilance and sleep-wake disorders. *Biochem Pharmacol* 2007; 73:1157-71.
59. De Lecea L, Kilduff T, Peyron C, Gao X, Foye P, Danielson P. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *PNAS* 1998; 95: 322-7.
60. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli R, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-85.
61. Stoyanova I, Rutten WL, le Feber J. Orexin-A and orexin-B during the postnatal development of the rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 81-9.
62. Ohno K, Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 70-87.
63. Lee M, Hassani O, Jones B. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 2005; 25: 6716-20.
64. Takahashi K, Lin JS, Sakai K. Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. *Neuroscience* 2008; 153: 860-70.
65. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999; 98: 365-76.
66. Mishima K, Fujiki N, Yoshida Y, Sakurai T, Honda M, Mignot E, et al. Hypocretin receptor expression in canine and murine narcolepsy models and in hypocretin-ligand deficient human narcolepsy. *Sleep* 2008; 31: 1119-26.
67. Thannickal T, Moore R, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000; 27: 469-74.
68. Thannickal T, Nienhuis R, Siegel J. Localized loss of hypocretin (orexin) cells in narcolepsy without cataplexy. *Sleep* 2009; 32:993-8.
69. Hagan J, Leslie R, Patel S, Evans M, Wattam T, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *PNAS* 1999; 96: 10911-6.

70. Akanmu M, Honda K. Selective stimulation of orexin receptor type 2 promotes wakefulness in freely behaving rats. *Brain Res* 2005; 1048: 135-45.
71. Brisbare-Roch C, Dingemans J, Koberstein R, Hoeber P, Aissaoui H, Flores S, et al. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs, and humans. *Nat Med* 2007; 13: 150-5.
72. Porkka-Heiskanen T, Strecker R, McCarley R. Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 2000; 99: 507-17.
73. McKenna J, Tartar J, Ward C, Thakkar M, Cordeira J, McCarley R, et al. Sleep fragmentation elevates behavioral, electrographic and neurochemical measures of sleepiness. *Neuroscience* 2007; 146: 1462-73.
74. Schwierin B, Borbély A, Tobler I. Effects of N-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996; 300: 163-71.
75. Okuro M, Fujiki N, Kotorii N, Ishimaru Y, Sokoloff P, Nishino S. Effects of paraxanthine and caffeine on sleep, locomotor activity, and body temperature in orexin/ataxin-3 transgenic narcoleptic mice. *Sleep* 2010; 33: 930-42.
76. Thakkar M, Engemann S, Walsh K, Sahota P. Adenosine and the homeostatic control of sleep: effects of A1 receptor blockade in the perifornical lateral hypothalamus on sleep-wakefulness. *Neuroscience* 2008; 153: 875-80.
77. Portas C, Thakkar M, Rainnie D, Greene R, McCarley R. Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 1997; 79: 225-35.
78. Oishi Y, Huang Z, Fredholm B, Urade Y, Hayaishi O. Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A1 receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *PNAS* 2008; 105: 19992-7.
79. Franco-Pérez J, Paz C. Quinine, a selective gap junction blocker, decreases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 94: 250-4.
80. Saper C, Fuller P, Pedersen N, Lu J, Scammell T. Sleep state switching. *Neuron* 2010; 68: 1023-42.
81. Hobson J, McCarley R, Wyzinsky P. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 1975; 189: 55-8.
82. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper C. A putative flip-flop switch for control on REM sleep. *Nature* 2006; 441: 589-94.

PIES DE FIGURAS

Figura 1. Registro poligráfico de rata adulta en el cual se muestran la actividad cortical (EEG), del músculo del cuello (EMG) y movimientos oculares (EOG), así como la postura típica de la rata en cada etapa. Durante la vigilia el EEG muestra predominantemente actividad de bajo voltaje (40-60 μ V) y alta frecuencia (30-50 Hz). Durante el SOL se presentan ondas de baja frecuencia (0.1-10 Hz) y gran amplitud (200-400 μ V). En el sMOR el EEG consiste de ondas de alta frecuencia (20-40 Hz) baja amplitud (50-80 μ V). Tomada de los registros de nuestro laboratorio.

Figura 2. Regulación de la vigilia y el SOL mediante un modelo propuesto previamente por Saper⁸⁰. A) La vigilia es generada por el incremento en la actividad de los núcleos monoaminérgicos (NA, 5-HT, HIS) que a su vez modulan la actividad GABAérgica del APVL y NPOM. En esta fase las neuronas orexinérgicas del HL (ORX) sirven para estimular la actividad monoaminérgica y asegurar la prevalencia de la vigilia. B) Por el contrario, durante el sueño las neuronas GABAérgicas del APVL y NPOM inhiben a los núcleos monoaminérgicos y a las neuronas orexinérgicas promoviendo la aparición del SOL. Rellenos en gris: núcleos activos, rellenos en blanco: núcleos inactivos. (-) inhibición, (+) estimulación. APVL: área preóptica ventrolateral, NPOM: núcleo preóptico medio, HL: hipotálamo lateral, LC: locus coeruleus, NR: núcleos del rafé, NTM: núcleo tuberomamilar.

Figura 3. Principales modelos para la regulación del sMOR. A) Primer modelo propuesto por Hobson y cols⁸¹ en 1975 en el cual la generación del sMOR se basa únicamente en la interacción recíproca autoregulatoria entre grupos neuronales colinérgicos (REM-on) y monoaminérgicos (REM-off). B) Modelo propuesto en 2006 por Lu y cols⁸². Las regiones REM-off fueron identificadas por la convergencia de entradas desde las neuronas orexinérgicas del HL y GABAérgicas del APVL. Las neuronas REM-off tienen una interacción inhibitoria mutua con neuronas REM-on, es decir que cuando se inactivan las regiones REM-off se libera la inhibición de los grupos REM-on y de esta forma se genera un episodio de sMOR. NR: núcleos del rafé, LC: locus coeruleus, FR: formación reticular, HL: hipotálamo lateral, APVL: área preóptica ventrolateral, SGPvl: porción ventrolateral de la sustancia gris periacueductal, TPL: tegmento pontino lateral, PPT: núcleo

pedúnculo pontino tegmental, LDT: núcleo laterodorsal tegmental, SLD: núcleo sublaterodorsal, PC: núcleo precoeruleus.

Tabla 1. Principales neurotransmisores que participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia y el efecto de algunos agonistas y antagonistas. ↑↑↑ Aumento, ↓↓↓ disminución y ⊙ mínima o casi nula tasa de disparo en dichas neuronas en cada etapa de sueño. ⬆ Simboliza un aumento y ⬇ un decremento del tiempo transcurrido en dicha etapa de sueño como respuesta a la aplicación de la sustancia mencionada. LC: locus coeruleus, NR: núcleos del rafé, NTM: núcleo tuberomamilar, HL: hipotálamo lateral, PPT: núcleo pedunculo pontino tegmental, LDT: núcleo laterodorsal tegmental, CAB: cerebro anterior basal, APVL: área preóptica ventrolateral, NPOM: núcleo preóptico medio.

Figura 1

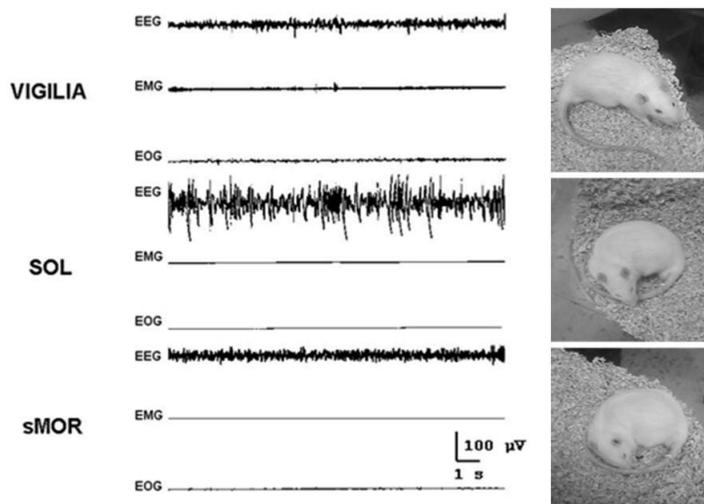


Figura 2

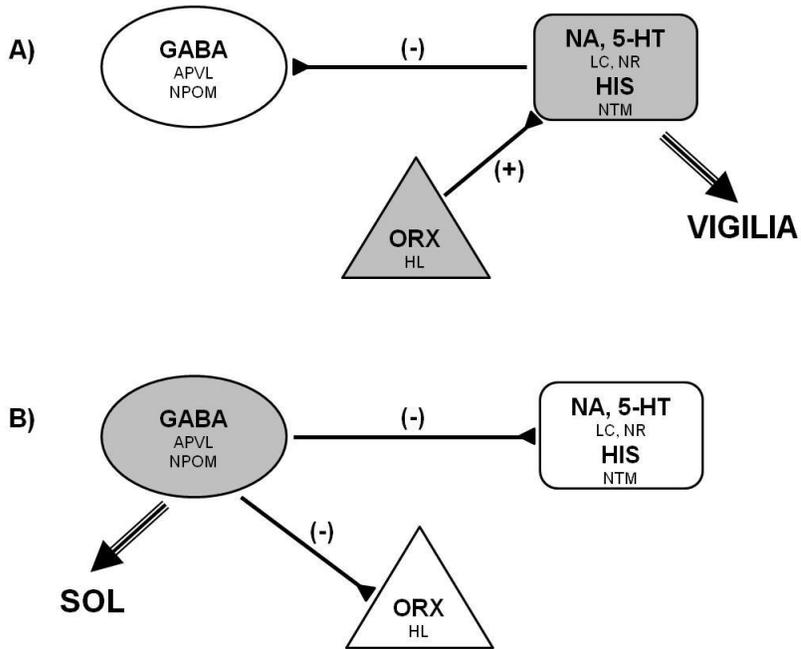


Figura 3

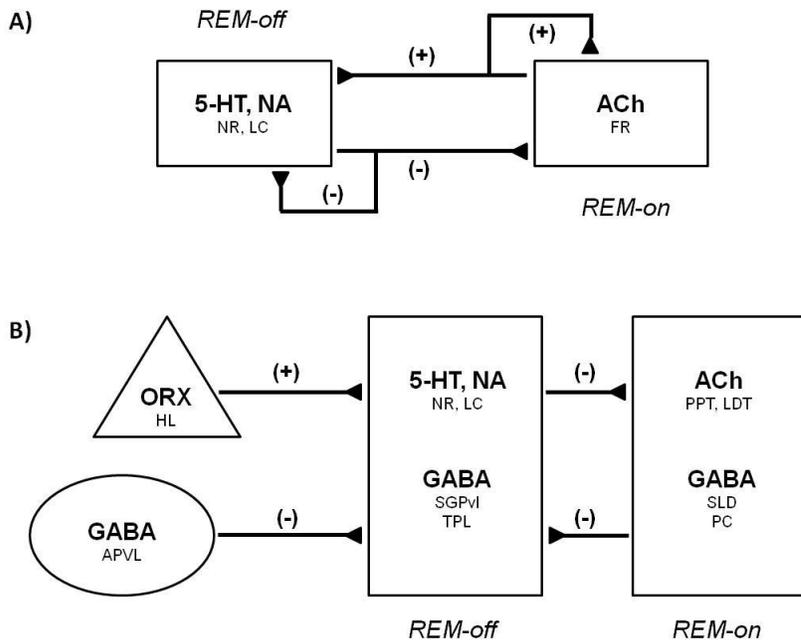


Tabla 1

Neurotransmisor	Tasa de Disparo	Agonistas	Antagonistas	Referencias
<p>NA Ubicación: LC Receptores: Adrenérgicos α, β</p>	<p>↑↑↑↑ Vigilia ↓↓↓↓ SOL ⊖ sMOR</p>	<p>Fenilefrina, ↑ Vigilia Isoproterenol, ↓ SOL Clenbuterol, ↓ sMOR Modafinil ↓ sMOR</p>	<p>Prazosin, ↓ Vigilia Yohimbina, ↑ SOL Propranolol, ↑ sMOR</p>	7-11
<p>5-HT Ubicación: NR Receptores: 5-HT_{1,7}</p>	<p>↑↑↑↑ Vigilia ↓↓↓↓ SOL ↓↓↓↓ sMOR</p>	<p>8-OHDPAT, ↑ Vigilia RU24969, ↓ SOL CP-94253, ↓ sMOR CP-44, ↓ sMOR m-CPBG ↓ sMOR</p>	<p>Ritanserina, ↓ Vigilia MDL-100907, ↓ SOL RO-4368554, ↑ SOL S-32006, ↑ sMOR</p>	15-22
<p>HIS Ubicación: NTM Receptores: H₂, H₂, H₃</p>	<p>↑↑↑↑ Vigilia ↓↓↓↓ SOL ⊖ sMOR</p>	<p>2-TEA ↑ Vigilia Histamina ↓ SOL ↓ sMOR</p>	<p>Pirilamina, ↓ Vigilia Difenidramina, ↑ SOL Ciproheptadina, ↑ sMOR</p>	53-58
<p>ORX Ubicación: HL Receptores: HCRTR1, HCRTR2</p>	<p>↑↑↑↑ Vigilia ↓↓↓↓ SOL ⊖ sMOR</p>	<p>[Ala11]orexin-B ↑ Vigilia ↓ SOL ↓ sMOR</p>	<p>Almorexanto ↓ Vigilia ↑ SOL ↑ sMOR</p>	69-71
<p>ACh Ubicación: PPT/LTD/CAB Receptores: nicotínicos – nAChR muscarínicos – mAChR</p>	<p>↑↑↑↑ Vigilia ↓↓↓↓ SOL ↑↑↑↑ sMOR</p>	<p>Nicotina, ↑ Vigilia Oxotremorina, ↓ SOL carbacol, ↑ sMOR neostigmina ↑ sMOR</p>	<p>Metocitramina ↑ Vigilia ↓ SOL ↓ sMOR</p>	30-32
<p>GABA Ubicación: APVL/NPOM Receptores: GABA_A, GABA_B, GABA_C</p>	<p>↓↓↓↓ Vigilia ↑↑↑↑ SOL ↑↑↑↑ sMOR</p>	<p>Benzodiazepinas, ↓ Vigilia Zolpidem, ↑ SOL Zopiclona, ↓ sMOR Muscimol, ↓ sMOR Gaboxadol, ↓ sMOR E-6199 ↓ sMOR</p>	<p>Bicuculina, ↑ Vigilia CGP 36742, ↓ SOL ↓ sMOR</p>	41-48
<p>Adenosina Ubicación: En todo el cerebro Receptores: A1, A2a, A2b, A3</p>		<p>CPA, ↓ Vigilia Adenosina, ↑ SOL ↑ sMOR</p>	<p>Cafeína, ↑ Vigilia Paraxantina, ↓ SOL DPX, ↓ sMOR Teofilina ↓ sMOR</p>	74-78