



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

“Mecanismos involucrados en el incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica después de la restricción crónica de sueño de movimientos oculares rápidos”

T E S I S

Q U E P R E S E N T A

GABRIELA HURTADO ALVARADO

Matrícula 2113801355

Para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental

Comité Tutorial:

Director: **Dr. Javier Velázquez Moctezuma**

Miembros del Jurado

Dra. Beatriz Gómez González

Dr. Lenin Pavón Romero

Dr. Emilio Domínguez Salazar

Dra. Janet Murbartián Aguilar

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Iztapalapa, Distrito Federal

Agosto del 2013

El presente trabajo fue realizado principalmente en el Área de Neurociencias del Departamento de Biología de la Reproducción en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 266049 CVU: 420918

Miembros del Jurado**Dra. Beatriz Gómez González**

Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.

Dr. Lenin Pavón Romero

Departamento de Psicoimmunología, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente". México D. F. México.

Dr. Emilio Domínguez Salazar

Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.

Dra. Janet Murbartián Aguilar.

Departamento de Farmacología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Sede Sur.

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.

Miembros del Comité Tutorial

Director: Dr. Javier Velázquez Moctezuma

*Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.*

Asesor interno: Dra. Beatriz Gómez González

*Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.*

Asesor externo: Dr. Lenin Pavón Romero

*Departamento de Psicoimmunología, Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la
Fuente”. México D. F. México.*

A toda mi familia, en especial a mis padres Estela y Gustavo, a mis hermanos
Alexandra, Gustavo, Citlalli y Bryan.

A las nuevas generaciones Bryan Francisco, Erick Fernando, José Arturo, Diana
Celic, Tristhan, Sayuri, Taili, Salvador y Daniel.

*A los que piensan que el conocimiento adquiere su verdadero valor cuando se
comparte.*

Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto titulado: Regulación funcional y estructural de la barrera hematoencefálica dependiente del ciclo sueño/vigilia, financiado por CONACyT (Número de convenio CB-2012-01 180792) a cargo de la Dra. Beatriz Gómez González.

A la Dra. Beatriz Gómez por su invaluable aportación a mi desarrollo profesional y personal, por inspirar con el ejemplo la pasión por la investigación científica, por asesorarme ardua y acertadamente en el tema que más me apasiona, la barrera hematoencefálica.

Al Dr. Javier Velázquez Moctezuma por su valiosa contribución a mi desarrollo académico y por compartir su gran experiencia en el área de Neurociencias, particularmente en el estudio de Sueño.

Al Dr. Lenin Pavón Romero por su invaluable contribución a mi formación académica durante un año de rigurosas y productivas asesorías en el área de la inmunología.

Al Dr. Emilio Domínguez Salazar, cuyos comentarios, sugerencias y enseñanzas en el área de biología molecular y conducta sexual contribuyeron significativamente a mejorar mi desarrollo académico y personal.

A la Dra. Janet Murbartián Aguilar por su valiosa ayuda en la realización de la técnica de Western blot y por proveer gentilmente las instalaciones de su laboratorio en el departamento de Farmacología del Cinvestav Sede Sur.

A José Sepúlveda y Jorge Sepúlveda por su valiosa ayuda técnica en el procesamiento de tejidos para microscopia electrónica de transmisión en el laboratorio de microscopia de la UAM-I.

A Fernando García Hernández por proveer el acceso al laboratorio de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Al Dr. José Ángel Rojas Zamorano, al Mtro. Rafael Santana y al Lic. Enrique Esqueda por su valioso apoyo en la realización de cirugías para el implante de electrodos, registro polisomnográfico y calificación de registros polisomnográficos en ratas.

Al profesor Joaquín Herrera Muñoz por su invaluable contribución a mi formación académica, por su ejemplo de investigador, docente y gran amigo.

Al profesor Carlos Kerbel Lifshitz por sus valiosos consejos a nivel profesional y personal.

Al Maestro Francisco Javier Olvera Ramírez por su apoyo moral y amistad.

A mi familia por siempre confiar en mí y entender las ausencias constantes.

A mi familia de laboratorio: Hishan, Emma, Lety, Phany, Isra, Anabel, Andrea y Fede por el cariño y porque de cada uno aprendo cosas muy valiosas. En especial a Adrián Cabañas por su amistad, por todo lo vivido y por compartir la pasión por la ciencia conmigo.

A Guillermo Cordero García y Adrián Zepeda por su amistad e incondicional apoyo, por los momentos de desestrés y porque este es su momento.

A mis compañeros de maestría Luis Maciel, Rebeca Martínez, Prisca Bustamante y Marcela Domínguez por el apoyo académico y por brindarme su amistad.

A Joana, Julio y Rodrigo por ser claro ejemplo de las cosas que realmente valen la pena.

A mis amigos Nelly, Brisa, Manuel, Erick, Miguel, Verónica, Antonio y Margarita por su comprensión en toda esta etapa.

Tabla de Contenido

	Página
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
La barrera hematoencefálica.....	14
Las células endoteliales.....	19
Cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	23
La pérdida de sueño.....	24
ANTECEDENTES.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	28
OBJETIVOS.....	29
HIPÓTESIS.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
Animales experimentales.....	30
Restricción de sueño.....	30
Estudio de la ultraestructura de la barrera hematoencefálica.....	32
Determinación de la expresión de proteínas características de la unión ocluyente de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.....	33
Registro polisomnográfico.....	37
Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	53

CONCLUSIÓN..... 59

REFERENCIAS..... 60

RESUMEN

La barrera hematoencefálica es un sistema constituido de células endoteliales, astrocitos, pericitos y microglia que mantienen la homeostasis del sistema nervioso central. Todos los elementos de la barrera hematoencefálica son importantes para el funcionamiento del sistema pero las células endoteliales le confieren las propiedades físicas y químicas de barrera. Las células endoteliales no presentan fenestraciones y exhiben bajo tráfico de vesículas pinocíticas. Asimismo, el paso de moléculas solubles de la sangre hacia el cerebro por la vía paracelular está restringido debido a la presencia de uniones ocluyentes. La ruptura de la barrera hematoencefálica promueve la entrada masiva de moléculas potencialmente neurotóxicas de la sangre hacia el cerebro, las cuales pueden ocasionar muerte neuronal y subsecuentemente alteraciones cognitivas. Estudios previos mostraron que la restricción selectiva de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) durante 10 días incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en todo el cerebro y, breves periodos de oportunidad para dormir (40-120min) restablecen la permeabilidad normal de la barrera en la mayoría de las regiones cerebrales. El hipocampo es una región cerebral que no recupera la permeabilidad normal de la barrera hematoencefálica después de los periodos de recuperación de sueño; sin embargo se desconoce el mecanismo por el que la pérdida de sueño induce ruptura de la barrera hematoencefálica. Así, el objetivo del presente trabajo fue dilucidar los mecanismos inespecíficos por los cuales la restricción de sueño MOR incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el hipocampo de la rata. Se evaluó la ultraestructura de las

células endoteliales del hipocampo por microscopía electrónica de transmisión y se determinó la expresión de proteínas de la unión ocluyente (Claudina-5, ocludina y ZO-1) por Western blot. La restricción de sueño MOR incrementó el número de vesículas pinocíticas (3 veces más en comparación con los controles) y promovió que las uniones ocluyentes de las células endoteliales del hipocampo sean menos complejas con respecto a las uniones ocluyentes de los grupos control, incluso después de periodos de recuperación de sueño. Concomitante a la reducción de la complejidad de las uniones ocluyentes, la restricción de sueño MOR disminuyó la expresión de proteínas de la unión ocluyente, particularmente Claudina-5. La restricción de sueño MOR altera los mecanismos de transporte inespecífico promoviendo la ruptura de la barrera hematoencefálica. Los resultados sugieren que el sueño MOR es crucial para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica. Las disfunciones asociadas a la pérdida de sueño pueden ser explicadas por cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

ABSTRACT

The blood-brain barrier is a complex system that maintains central nervous system homeostasis. Brain endothelial cells, pericytes, astrocytes, and microglia comprise the blood-brain barrier. All components are crucial for blood-brain barrier development and maintenance; however endothelial cells confer the physical and chemical barrier properties. Brain endothelial cells exhibit low pinocytotic trafficking and express tight junction proteins. Under pathological conditions, blood-brain barrier disruption promotes massive entrance of potential neurotoxic molecules from blood to brain, which may cause cognitive deficits. Recently, we reported that selective rapid eye movement (REM) sleep restriction during 10 days increased blood-brain barrier permeability to an unspecific vital dye Evans blue in the whole brain, and that brief sleep periods (40-120 min) restored normal blood-brain barrier permeability in almost all brain regions. Hippocampus is unable to recover the blood-brain barrier integrity after REM sleep restriction even with sleep opportunity periods, but the mechanism of blood-brain barrier breakdown is unknown. Therefore, the aim of this work was to elucidate the mechanism involved in the hippocampal hyperpermeability after REM sleep restriction and sleep opportunity periods. We evaluated the ultrastructure of endothelial cells by transmission electron microscopy and tight junction protein expression (Claudin-5, occludin and ZO-1) by western blot. REM sleep restriction increases the pinocytotic vesicle number (3-fold higher than intact controls) and promotes reduction in tight junction complexity. Concomitant to tight junction complexity, REM sleep restriction diminishes tight junction protein expression, mainly Claudin-5. REM sleep

restriction impairs unspecific transport systems, promoting blood-brain barrier disruption. Our data suggests that REM sleep is crucial to maintain the blood-brain barrier integrity. Impairments associated to sleep loss may be explained by blood-brain barrier hiperpermeability.

INTRODUCCIÓN

“Brain must respond to many blood-borne signals but has not direct access to them”

Clifford B. Saper

El sistema nervioso central, constituido por la médula espinal y el encéfalo, lleva a cabo procesos cognitivos y autonómicos vitales para el organismo. Cada región encefálica recibe y procesa estímulos externos y propios promoviendo así el reconocimiento del entorno y de su medio interno para la ejecución de conductas adaptativas. Al igual que otros órganos, el encéfalo es un conjunto de diversos tipos celulares que funcionan de manera dinámica y coordinada. El encéfalo es el órgano maestro que controla procesos básicos como la respiración o la frecuencia cardíaca y orquesta respuestas motoras y sensoriales. Además, el encéfalo es responsable de una serie de procesos cognitivos complejos como la memoria, el aprendizaje y el raciocinio; por ende, la demanda energética del sistema nervioso central es alta y el encéfalo tiene prioridad para recibir un continuo e idóneo aporte de nutrientes; sin embargo, dado que el encéfalo debe tener mecanismos estrictos de protección, el parénquima cerebral está aislado de la circulación sanguínea.

La barrera hematoencefálica

En 1885 el científico alemán Paul Ehrlich descubrió que la administración intracardiaca de un colorante vital en animales resulta en la coloración de todo el cuerpo con excepción del encéfalo, la médula espinal, la retina y las gónadas. En

un principio, Ehrlich atribuyó estos hallazgos a la falta de afinidad de los tejidos al colorante (Ehrlich, 1885). Casi treinta años después Edwin Goldmann, alumno de Ehrlich, presentó datos contundentes de que la administración de azul tripano por vía intratecal (directamente en el líquido cefalorraquídeo) tiene el efecto contrario, el encéfalo y la médula espinal se tiñen mientras que el resto de cuerpo no, sugiriendo así la presencia de una barrera física entre la sangre y el sistema nervioso central (Goldmann, 1913). Lewandowsky en el año de 1900 estudió el límite de permeación del ferrocianato de potasio en el encéfalo, observó que este compuesto no se localizaba en el parénquima cerebral pero si se observaba en la región luminal de los capilares. En base a sus observaciones Lewandowsky acuñó el término de “barrera hematoencefálica” (Lewandowsky, 1900). El uso de la microscopia electrónica de transmisión permitió determinar la localización de la barrera hematoencefálica al administrar por vía intracardiaca peroxidasa de rábano o nitrato de plata. Los hallazgos describen que estos trazadores se depositan en la región luminal de los capilares y en una muy baja cantidad dentro de vesículas pinocíticas pero no dentro del parénquima cerebral, atribuyendo la ubicación de la barrera hematoencefálica a la microvasculatura cerebral (Dempsey & Wislocki, 1955; Reese & Karnovsky, 1967).

El término de “barrera” indica dos connotaciones importantes: como barrera “física” tiene la propiedad de evitar el paso al encéfalo de moléculas hidrosolubles potencialmente tóxicas que están circulantes en la sangre, y como barrera “química” presenta una permeabilidad baja y pasiva para los nutrientes solubles en agua que requiere el tejido nervioso (e. g. oxígeno, aminoácidos y glucosa)

(Oldendorf, 1973; Davson, 1976; Abbott et al., 2005; Abbott et al., 2010), manteniendo así la homeostasis del sistema nervioso central (Abbott et al., 2005; Persidsky et al., 2006; Ueno, 2007). En el encéfalo, las únicas regiones que carecen de barrera hematoencefálica son el plexo coroideo y los órganos circunventriculares (e. g. la glándula pineal, la hipófisis, la eminencia media y el área postrema), dado que regulan el intercambio hormonal o se consideran regiones quimiorreceptoras (Abbott, 2005).

A los estudios clásicos que ubicaban a la barrera hematoencefálica en la microvasculatura encefálica, se sumaron investigaciones que definían a la barrera hematoencefálica como un sistema complejo constituido de diversos tipos celulares: células endoteliales, astrocitos, pericitos y microglia, así como sus derivados de matriz extracelular: lámina basal y glicocalix (Abbott et al., 2010; Lourenço et al., 2010) (Figura 1). Todos los elementos de la barrera hematoencefálica forman parte de la denominada unidad neurovascular junto con las neuronas, de tal modo que las neuronas y la glía pueden regular la función de los vasos sanguíneos en respuesta a requerimientos metabólicos (Persidsky et al., 2006). Todos los componentes de la barrera hematoencefálica son necesarios para mantener el desarrollo y la integridad del sistema (Hawkins & Davis, 2005; Lourenço et al., 2010).

Los astrocitos son células gliales que se asocian a los capilares encefálicos mediante prolongaciones citoplasmáticas denominadas pies perivasculares, además de remover aminoácidos excitatorios del espacio intersticial, los astrocitos contribuyen al mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica

mediante la liberación a la lámina basal de señales químicas que modulan la permeabilidad de las células endoteliales, por ejemplo citocinas proinflamatorias, purinas (ATP) y óxido nítrico (NO) (Abbott, 2002).

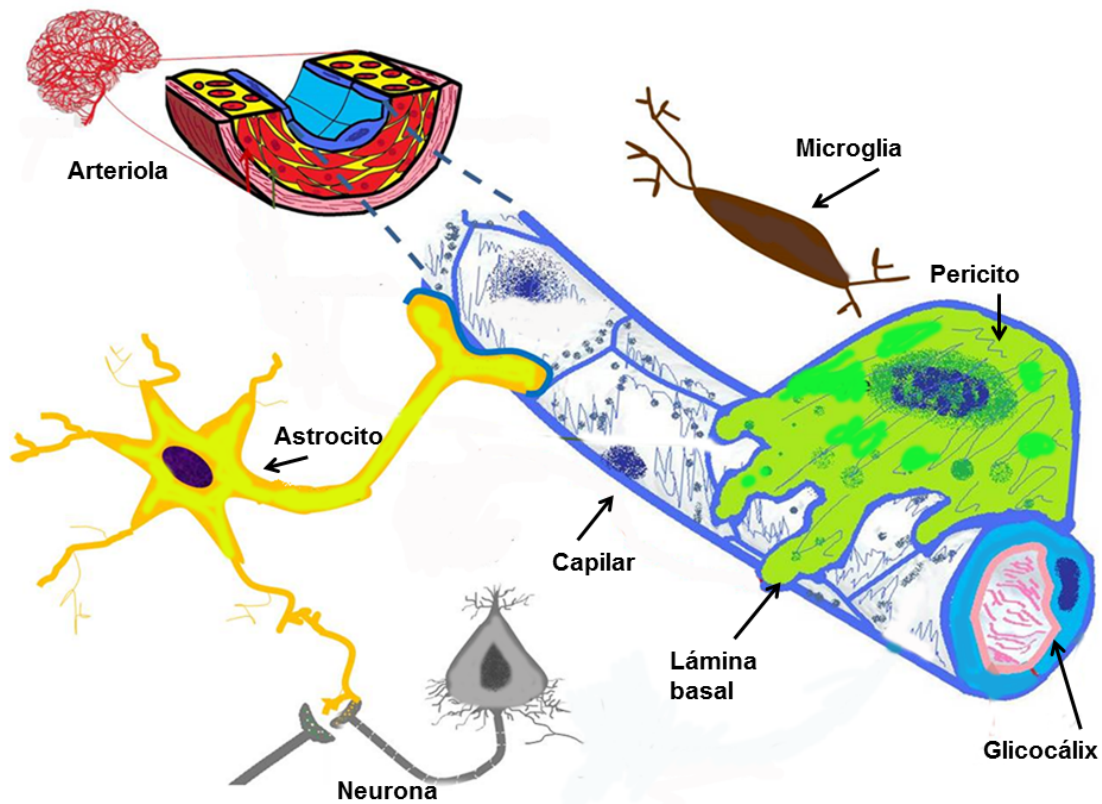


Figura 1. Componentes de la barrera hematoencefálica que junto con las neuronas constituyen la unidad neurovascular. Modificado de Gómez-González et al. (2012).

Los pericitos son células de origen mesodérmico que se adosan a los capilares encefálicos mediante un gran número de procesos citoplasmáticos y que están embebidos completamente en la lámina basal. Al igual que los astrocitos, los pericitos son importantes para el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y

tienen un papel crucial en el desarrollo embrionario de la misma. Los pericitos regulan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debido a sus propiedades vasoconstrictoras y a su capacidad de presentar antígenos y producir mediadores inflamatorios (Guillemin et al., 2004; Armulik et al., 2005; Kovac et al., 2011).

A diferencia de los astrocitos y los pericitos, la microglia no presenta una estrecha proximidad a las células endoteliales; sin embargo se considera la primera línea de defensa, ya que son macrófagos residentes del sistema nervioso central. La microglia media la respuesta inmunológica del sistema nervioso central, puede presentar antígenos y su fenotipo se modifica en respuesta a cambios en el microambiente cerebral, adquiriendo propiedades fagocíticas para la remoción de fuentes tóxicas (Persidsky et al., 2006; Zlokovic, 2008).

Además de las interacciones célula-célula, los componentes de la barrera hematoencefálica se comunican a través de mediadores químicos. Las moléculas secretadas por las células endoteliales, pericitos, microglia y astrocitos (incluso por neuronas) regulan el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (e. g. neurotransmisores, hormonas, citocinas, NO y purinas) (Abbott, 2002; Ballabh et al., 2004; Zlokovic, 2008). Los cambios neuroquímicos regulan el fenotipo de la barrera hematoencefálica en función de la actividad neuronal y sistémica, dependientes de condiciones fisiológicas o patológicas (e. g. concentraciones elevadas de neurotransmisores excitatorios o respuesta inflamatoria mediada por citocinas) (Ballabh et al., 2004; Persidsky et al., 2006; Zlokovic, 2008). La contribución de mediadores solubles provenientes de los componentes de la barrera hematoencefálica es crucial para mantener la comunicación e integridad

del sistema, la deficiencia de uno o varios elementos conlleva a cambios en la permeabilidad de solutos hacia el microambiente nervioso que pueden perjudicar la óptima función neuronal (Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010; Lourenço et al., 2010). Si bien no se puede prescindir de ningún componente de la barrera hematoencefálica, la propiedad de barrera físico-química del sistema se atribuye primordialmente a las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, en particular a la compleja y estrecha relación entre el bajo transporte de vesículas pinocíticas y la presencia de uniones ocluyentes (Reese & Karnovsky, 1967).

Las células endoteliales

El encéfalo exhibe una gran red de capilares dada la alta demanda energética. La superficie de capilares empleados para el transporte molecular en el encéfalo de un humano es de aproximadamente 20m² (Begley & Brightman, 2003). Los capilares encefálicos están compuestos de una monocapa de células endoteliales, y tienen un diámetro aproximado de 10µm de diámetro (Peters et al., 1991).

La célula endotelial cerebral presenta paredes continuas y delgadas (500nm de grosor) que se elongan en la región del núcleo con espesor de entre 200 y 300nm (Zlokovic, 2008). La lámina basal que rodea a la célula endotelial también es continua y presenta un espesor de entre 30 y 40nm (Dempsey & Wislocki, 1955). El núcleo puede observarse más bien aplanado y con un arreglo de cromatina homogéneo; la heterocromatina se localiza principalmente en la periferia mientras que la eucromatina tiende a estar en el centro del núcleo. El aparato de Golgi se encuentra cerca del núcleo en posición paralela a la membrana plasmática. La célula endotelial tiene un alto número de mitocondrias en comparación con el

endotelio no neural y, éstas se localizan adyacentes al núcleo aunque ocasionalmente pueden presentarse distribuidas en el citoplasma. La presencia de filamentos de actina puede estar relacionada con la apariencia granular del citoplasma de la célula endotelial. Los ribosomas no son prominentes en la célula endotelial de los capilares encefálicos y el retículo endoplásmico rugoso se distingue en la membrana nuclear externa. La presencia de vesículas pinocíticas en las células endoteliales cerebrales es de aproximadamente 5 vesículas/ μm^2 , es decir son hasta 20 veces menos que en los capilares de otros órganos (e. g. El endotelio cardiaco) (Dempsey & Wislocki, 1955; Peters, Palay & Webster, 1991). La baja actividad pinocítica junto con la carencia de fenestraciones son propiedades que limitan el tráfico transcelular en el endotelio encefálico. La presencia de vesículas pinocíticas en diversos tejidos, incluyendo el endotelio, se identificó hace más de 50 años mediante microscopia electrónica (Palade, 1953). Las vesículas pinocíticas se pueden clasificar en dos tipos: cubiertas de clatrina o sin cubierta, asociadas a caveolina. Las vesículas con cubierta de clatrina se descubrieron primero, se observan con una alta densidad electrónica dada la presencia de depósitos de calcio y ATPasas (Rothberg et al., 1992); estas vesículas internalizan moléculas acopladas a su receptor (e. g. albumina, insulina, leptina, interleucinas, factor de necrosis tumoral α). Después se encontraron vesículas con menor densidad electrónica que las vesículas cubiertas de clatrina y con un diámetro de entre 50 y 100nm que se denominaron caveolas y que están involucradas en el transporte transcelular inespecífico por ejemplo de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Palade, 1953; Yamada, 1955; Lisanti et al., 1994a; Razani & Lisanti, 2002). Las caveolas endoteliales están involucradas en procesos

de internalización de moléculas de la sangre hacia el intersticio cerebral (endocitosis) o en dirección contraria del cerebro hacia la circulación sanguínea (trancitosis) (Simionescu, 1991). El movimiento transcelular de las caveolas esta facilitado por la asociación con proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina como la miosina y la distrofina (Razani & Lisanti, 2002).

La formación de caveolas se observa como un collar en la región luminal o abluminal de la célula endotelial y se ha descrito que la caveolina-1, la principal molécula involucrada en la formación caveolar, se localiza en regiones denominadas balsas lipídicas, ricas en colesterol y esfingolípidos. De manera importante se reconoce un amplio número de proteínas asociadas con las caveolas y su función, como la glicoproteína P, el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-R), metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y -9), fosfocinasa C (PKC), la cinasa de inositol 3-fosfato (PI3-K), cinasas de tirosina (Src) y la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Lisanti et al., 1994a: Lisanti et al., 1994b; Shaul et al., 1996). Todas esas moléculas están involucradas en vías de señalización implicadas en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica en condiciones normales y en respuesta a cambios aversivos. La hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica asociada a un incremento de caveolas también puede relacionarse con la posibilidad de fusión de las caveolas y de formación de canales transcelulares (Mehta & Malik, 2006).

Si bien el transporte trans- y paracelular es limitado, las demandas metabólicas del parénquima encefálico son altas y requieren de sistemas de transporte específicos que promueven la entrada al sistema nervioso central de nutrientes (e. g. transportador de glucosa GLUT1, transportadores de aminoácidos) o la salida de

metabolitos tóxicos y/o lipofílicos hacia la circulación sanguínea (e. g. glicoproteína p) (Abbott, 2005; Engelhardt, 2003; Persidsky et al., 2006; Ueno, 2007).

El paso de moléculas entre las células endoteliales está restringido por la presencia de uniones ocluyentes (también conocidas como uniones estrechas). Las uniones ocluyentes dejan un espacio entre las células endoteliales de 12 Å y se caracterizan ultraestructuralmente por la aparente fusión de las membranas en puntos específicos denominados “kiss-points” presentes en la región apical de la célula endotelial, determinando así la polaridad de la misma (Dempsey & Wislocki, 1955; Ueno, 2007) (Figura 2). La complejidad de una unión ocluyente tiene una relación inversamente proporcional con la permeabilidad de moléculas; entre más inmadura es una unión el paso de moléculas se incrementa (Huang et al., 2001) (Figura 2). Las uniones ocluyentes están formadas por proteínas transmembranales que se asocian a sus homólogas en la membrana de la célula endotelial adyacente: en la barrera hematoencefálica se reconocen dos proteínas características de las uniones ocluyentes, Claudina-5 (relacionada con la permeabilidad de cationes y aniones) y la Ocludina (importante para el mantenimiento de la unión pero no crucial para la permeabilidad). Ambas proteínas se asocian con una familia de proteínas citoplasmáticas ancladas al citoesqueleto de actina denominadas *Zonula occludens* (ZO) (Wittchen et al., 1999). ZO-1 es la más relacionada con cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que implican disrupción en las uniones ocluyentes e incremento en el tráfico de vesículas pinocíticas (Fanning et al., 2007) (Figura 2). Las proteínas características de las uniones ocluyentes están directamente asociadas a la dinámica del citoesqueleto de la célula endotelial, ya que interactúan con

proteínas importantes en diversas vías de señalización como cinasas (e. g. PKC) que pueden desencadenar cascadas de señalización que inducen hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica (Anderson & Itallie, 2006).

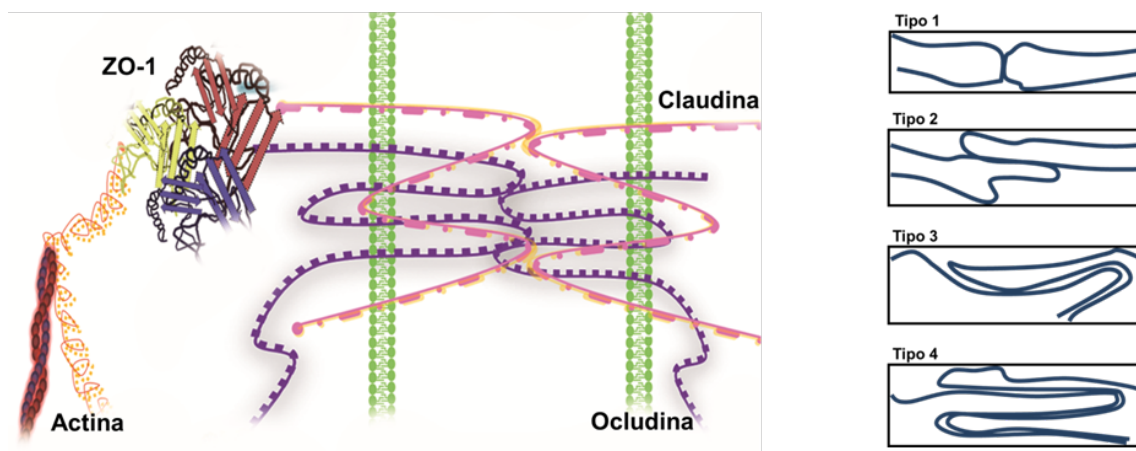


Figura 2. La unión ocluyente en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Proteínas componentes de la unión ocluyente (izquierda) y clasificación de los tipos de unión ocluyente dependiendo de su complejidad: tipo 1 (fin-fin), tipo 2 (traslape simple), tipo 3 (tipo mortero) y tipo 4 (unión compleja). Modificado de Huang et al. (2001)

Cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Las alteraciones en la integridad estructural de las uniones ocluyentes o el incremento en el transporte mediado por vesículas pinocíticas ocasionan disrupción de la barrera hematoencefálica. Los mecanismos involucrados en la desregulación de la integridad de la barrera hematoencefálica son poco conocidos. La hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica promueve la entrada de

moléculas potencialmente neurotóxicas y la infiltración de células del sistema inmune, ambos factores son capaces de inducir muerte neuronal. En diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple o diabetes se observa una disrupción estructural y funcional de la barrera hematoencefálica (Huber et al., 2001; Kumar et al., 2009). Asimismo, el incremento en la permeabilidad de moléculas circulantes hacia el parénquima cerebral se ha reportado en infecciones (e. g. VIH), procesos inflamatorios, hipertermia, estrés y restricción crónica de sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR) (Banks et al., 1995; Bleys & Cowen, 2001; Sharma, 2004; Gómez-González & Escobar, 2009; Kiyatkin & Sharma, 2009; Gómez-Gonzalez et al., 2013).

La pérdida de sueño

Las demandas laborales y el estilo de vida en la sociedad actual están altamente relacionados con la reducción en la cantidad de horas de sueño por día. El sueño es un fenómeno fisiológico que se asocia con la reparación y la recuperación del organismo después del periodo de vigilia (Siegel, 2010); sin embargo los mecanismos por los cuales el sueño promueve la óptima función cerebral siguen siendo un enigma. El sueño está caracterizado por presentar patrones cíclicos de actividad eléctrica cerebral. El sueño implica la disminución significativa de las conductas de vigilia y el aumento en el umbral de respuesta ante estimulación ambiental diversa; por lo que se considera un fenómeno rítmico y reversible (Siegel, 2010). El sueño se divide en dos estadios bien diferenciados, el sueño de ondas lentas (no-MOR) y el sueño paradójico o de movimientos oculares rápidos

(MOR). Durante el sueño no-MOR, la actividad electroencefalográfica (EEG) disminuye presentando un patrón de ondas lentas mientras que el sueño MOR se caracteriza por presentar una actividad EEG parecida a la vigilia, movimientos oculares rápidos y pérdida de tono muscular. Ambas fases, MOR y no-MOR, alternan durante el periodo total de sueño. Entre los factores endógenos involucrados en la promoción y el mantenimiento del sueño se encuentran neurotransmisores (e.g. GABA, acetilcolina), péptidos neuromoduladores (e.g. prostaglandinas), hormonas (e.g. melatonina, hormona de crecimiento, cortisol), citocinas (e.g. IL-1 β , TNF α , IL-6), adenosina y NO (Krueger et al., 2008).

Uno de los medios más empleados y potentes para conocer la función del sueño es someter a los sujetos o animales experimentales a un periodo de privación de sueño (Rechtschaffen et al., 1989). La privación total de sueño en humanos induce déficits cognitivos y motores (Mills et al., 2007). Se ha reportado también que la privación prolongada de sueño en roedores y gatos (15-20 días) provoca cambios de comportamiento y finalmente la muerte. En particular, la privación selectiva de sueño MOR se relaciona con déficits de memoria y aprendizaje, disminución en la neurogénesis hipocámpica, muerte neuronal en regiones del tallo cerebral, hipertermia cerebral, incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en plasma (e. g. IL-1, TNF α , IL-17) y cambios neuroquímicos en el sistema nervioso central (Rechtschaffen et al., 1989; Rechtschaffen et al., 2002; Biswas et al., 2006; Davisa et al., 2006; Jaiswal et al., 2009; Yehuda et al., 2009; Poe et al., 2010). Un modelo en roedores de privación selectiva de sueño MOR implica la pérdida completa y continúa de esta fase de sueño: sin embargo, es complicado extrapolar

los resultados a lo que ocurre en humanos. Los estudios realizados con humanos para determinar el efecto de la pérdida de sueño sobre distintos sistemas en el organismo, generan controversia principalmente por el paradigma empleado para disminuir el periodo de sueño. Se habla entonces de privación de sueño (un periodo de tiempo consecutivo sin dormir), fragmentación de sueño (alteración de la ciclicidad de los estadios de sueño) y la restricción de sueño. En modelos animales la restricción crónica de sueño MOR implica la reducción de horas de oportunidad para dormir, y se ha reportado que tiene prácticamente los mismos efectos que la privación de sueño MOR a nivel cognitivo, aunque los animales exhiben un deterioro a largo plazo y se presentan alteraciones neuroquímicas diferenciales que sugieren una desregulación en la red neuroinmunoendocrina, por ejemplo la resistencia a la corticosterona y a la insulina (Meerlo et al., 2008).

ANTECEDENTES

Muchos cambios asociados a la hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica en condiciones experimentales y patologías se observan de manera independiente en sujetos con deficiencia de sueño MOR. Por ejemplo, se sabe que las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-17A y TNF- α se incrementan durante la privación total de sueño MOR; de igual forma la privación crónica de sueño MOR induce hipertermia, y por separado, ambos factores (citocinas proinflamatorias e hipertermia) incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Bleys & Cowen, 2001; Sharma, 2004; Kiyatkin & Sharma, 2009; Yehuda et al., 2009). De hecho, las patologías neurodegenerativas y metabólicas tienen en común cuadros inflamatorios, un correlato de alteraciones en la

integridad de la barrera hematoencefálica y desordenes de sueño (Tasali et al., 2009; Mills et al., 2007; Reynolds et al., 2012; Gómez-González et al., 2013).

Nuestro grupo de trabajo realizó el primer estudio para dilucidar los efectos de la restricción de sueño MOR sobre la integridad de la barrera hematoencefálica en ratas. La restricción crónica de sueño MOR durante 10 días incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en casi todo el cerebro en comparación con los controles empleados (Gómez-González et al., 2013, Anexo 1). Una vez en circulación, el azul de Evans se conjuga con la albúmina, que normalmente no atraviesa la barrera hematoencefálica; por lo que la tinción azul del cerebro indica disrupción de la barrera hematoencefálica. Los efectos de la restricción crónica de sueño MOR sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica son reversibles. La mayoría de las regiones cerebrales estudiadas recuperan la integridad de la barrera hematoencefálica con sólo 40 minutos de oportunidad para dormir; mientras que en regiones como la corteza frontal, los ganglios basales y el tálamo, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica se recupera por completo después de 120 minutos de oportunidad para dormir. En el vermis del cerebelo se mantiene la hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica aun después de periodos de oportunidad para dormir. En cambio en el hipocampo el transporte de azul de Evans disminuye progresivamente aunque nunca alcanza los niveles observados en animales control que durmieron normalmente (Gómez-González et al., 2013). La hiperpermeabilidad constante de la barrera hematoencefálica después de la restricción de sueño MOR en el hipocampo podría explicar las alteraciones

neuroquímicas e histológicas en esta región, lo cual se ha relacionado ampliamente con los déficits en la memoria y aprendizaje en animales y humanos secundarios a la privación/restricción de sueño (Rechtschaffen et al., 1989; Rechtschaffen et al., 2002; Biswas et al., 2006; Davisa et al., 2006; Jaiswal et al., 2009; Yehuda et al., 2009; Poe et al., 2010).

JUSTIFICACIÓN

La restricción de sueño es un problema de salud en la sociedad actual debido a las demandas laborales y al acceso ilimitado a medios electrónicos de comunicación. Un gran número de reportes sustentan que la deficiencia de sueño se considera un factor de riesgo importante para desarrollar obesidad, trastornos metabólicos, enfermedades cardiovasculares, patologías neurodegenerativas y todos los déficits cognitivos asociados a estos padecimientos (Tasali et al., 2009; Mills et al., 2007; Reynolds et al., 2012). Conocer los mecanismos involucrados en el incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica causada por la restricción de sueño MOR y su rápida recuperación permitirá entender como el sueño mantiene la homeostasis del organismo y proponer posibles mediadores moleculares capaces de modular la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la restricción de sueño. Por otro lado, conocer el mecanismo que incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debido a la restricción de sueño también aporta un modelo de apertura de la barrera hematoencefálica con una ventana temporal relativamente corta y de alta selectividad regional para la entrada de fármacos al sistema nervioso central, lo cual puede ser considerado en ensayos farmacológicos para el tratamiento de diversas neuropatologías.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los cambios estructurales-funcionales de la barrera hematoencefálica durante la restricción crónica de sueño MOR y los periodos de oportunidad para dormir?

OBJETIVO GENERAL

Conocer los cambios estructurales-funcionales de la barrera hematoencefálica en ratas restringidas de sueño MOR y en los periodos de oportunidad para dormir.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los cambios ultraestructurales de las células endoteliales cerebrales del hipocampo después de la restricción crónica de sueño MOR y periodos de recuperación de sueño MOR.
2. Evaluar los cambios en la expresión de las proteínas características de las uniones ocluyentes en la barrera hematoencefálica: ZO-1, claudina-5 y ocludina en el hipocampo de la rata.
3. Validar el método empleado para la restricción de sueño MOR mediante el registro polisomnográfico en ratas durante el periodo de 20 horas de privación y 4 horas de oportunidad para dormir.

HIPÓTESIS

Las células endoteliales cerebrales del hipocampo presentaran cambios a nivel de los principales mecanismos de transporte inespecífico (uniones ocluyentes y vesículas pinocíticas) después de la restricción crónica de sueño MOR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (>3 meses) entre 250 y 500 gr. Se asignó al azar a los sujetos a una de las siguientes condiciones experimentales: restricción de sueño MOR (T0), restricción de sueño MOR con 40 minutos de oportunidad para dormir (T1), restricción de sueño MOR más 120 minutos de oportunidad para dormir (T2), controles de plataforma grande y controles intactos. Los animales experimentales estuvieron alojados en grupos de 5 sujetos por jaula habitación, en una sala con ciclo invertido de 12 horas de luz/oscuridad (luces encendidas a las 11pm) a temperatura ambiente entre 20-25°C, con agua y comida *ad libitum*.

Restricción de sueño MOR

El modelo propuesto para la restricción de sueño MOR consiste en un paradigma de 20 horas de privación selectiva de sueño MOR y 4 horas de oportunidad para dormir en un periodo de 10 días consecutivos. La privación selectiva de sueño MOR se realizó con la técnica modificada de plataforma múltiple (Figura 3), fundamentada en la pérdida del tono muscular característica del sueño MOR, en

donde se atenúan los efectos del estrés por aislamiento social e inmovilización reportados con otros métodos debido a que varios animales son privados de sueño de manera simultánea (Mendelson et al., 1974; Borges et al., 2004; Machado et al., 2004). Las ratas se colocaron en una caja de acrílico de 82cm x 59cm x 48cm con 3-5cm agua, sobre 3-5 plataformas de 7cm diámetro y 10 cm de alto. Los animales pueden moverse y tener libre acceso al alimento y agua; esta técnica suprime por completo el sueño MOR desde las primeras 24 horas (Borges et al., 2004; Borges et al., 2006) (Figura 3C). Para descartar la influencia de factores ambientales estresantes sobre la integridad de la barrera hematoencefálica, se empleó el control de plataforma grande, el cual se encuentra bajo las mismas condiciones que las ratas privadas de sueño pero las plataformas empleadas son de aproximadamente 15 cm, permitiendo que las ratas duerman (Figura 3B). Se empleó también un grupo control intacto, las ratas estuvieron en su caja habitación sin ningún procedimiento experimental (Figura 3A). Al término de cada periodo establecido se sacrificó a las ratas con una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal (0.8-1 mL). Las ratas del grupo de restricción de sueño MOR T0 se sacrificaron inmediatamente al final de las 20 horas de privación de sueño MOR en el día 10; las ratas restringidas de sueño MOR T1 se sacrificaron después de 40 minutos de oportunidad para dormir y las restringidas de sueño MOR T2 después de 120 minutos de oportunidad para dormir. Las ratas del grupo control de plataforma grande se sacrificaron inmediatamente después de las 20 horas en la caja de acrílico y los controles intactos se tomaron de su caja habitación y se sacrificaron inmediatamente. El sacrificio se realizó entre las 8am y las 11am.

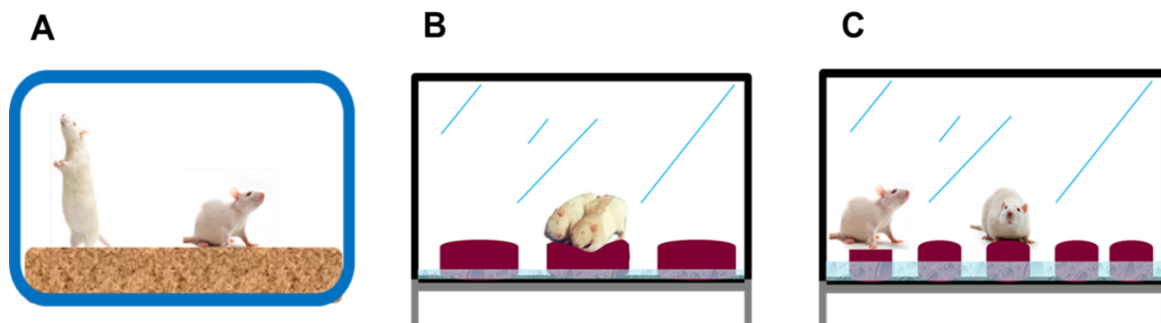


Figura 3. Grupos experimentales. Control intacto (A), Control de plataforma grande (B) y Restricción de sueño MOR por el método modificado de plataformas múltiples (C).

Estudio de la ultraestructura de la barrera hematoencefálica

En el día del sacrificio ocho ratas (dos por grupo: control intacto, restricción de sueño MOR T0, restricción de sueño MOR T1 y restricción de sueño MOR T2) se perfundieron con solución salina 0.9% durante 10 minutos y después con una solución de glutaraldehído 2%/paraformaldehído 4% durante 10 minutos. Se disectó el cerebro y se obtuvieron cubos de 1mm³ de la región CA3 de hipocampo. Las muestras se post-fijaron por inmersión en fijador de glutaraldehído 2%/paraformaldehído 4% durante una hora, se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos-salina (PBS) y se colocaron en el mismo amortiguador durante 24 horas a 4°C. Las muestras se procesaron para microscopia electrónica de transmisión (TEM). Los bloques del sector CA3 del hipocampo se post-fijaron en tetra-óxido de osmio durante 2 horas a 4°C, se deshidrataron progresivamente en alcoholes hasta llegar a acetonitrilo y se incluyeron en Epon. La resina se

polimerizó durante 48 horas a 60°C. Se obtuvieron cortes semifinos de 1µm y ultrafinos en un ultramicrotomo (LEICA ULTRACUT, UCT); los cortes ultrafinos se tiñeron con metales pesados y se observaron en un microscopio JEOL (1200EXII) a 60,000 kV a 2500 y 7000 aumentos (X2500, X7500). Las microelectrografías se adquirieron con una CCD (GATAN, JEOL) en formato TIFF.

Se tomaron microelectrografías de vasos sanguíneos hipocámpicos (10-20 microelectrografías por rata). La ultraestructura de las células endoteliales se analizó en cada microelectrografía determinando el área citoplasmática, la cantidad de vesículas pinocíticas (que tuvieran membrana definida y fueran menores de 100nm de diámetro) y las características de las uniones ocluyentes con el programa ImageJ. Se identificaron entre 5 y 16 uniones ocluyentes por grupo experimental y se determinó el tipo de unión ocluyente (tipo 1, tipo 2, tipo 3 o tipo 4) dependiendo de la complejidad de la unión, se cuantificó la longitud de la unión ocluyente, el tamaño y longitud de hendiduras en la unión ocluyente con el uso del programa ImageJ.

Determinación de la expresión de proteínas características de la unión ocluyente de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica

En el día del sacrificio se decapitaron tres ratas por grupo (control intacto, plataforma grande, MOR T0, MOR T1 y MOR T2) y se obtuvo el cerebro en frío (4°C) para disecar el hipocampo. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Obtención de proteínas totales del cerebro de rata

El hipocampo se homogenizó a bajo poder en 200 μ l de buffer RIPA adicionado con inhibidores de proteasas (1 mM EDTA, 150 mM NaCl, NP40 al 1%, SDS al 0.1%, 6.8 μ g/mL aprotinina, 4.0 μ g/mL leupeptina, 24.0 μ g/mL pepstatina-A, 2 mM PMSF); el homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se obtuvieron los sobrenadantes. El pellet fue resuspendido con 200 μ l de buffer RIPA+Tritonx10/0.1% para obtener proteínas transmembranales, se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm a 4°C y los sobrenadantes se mezclaron. Las muestras de proteínas totales se almacenaron a -80°C hasta el momento de llevar a cabo la cuantificación de proteínas.

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de las proteínas totales presentes en los sobrenadantes se realizó mediante el método de Bradford (BioRad cat. 500-0006). Se realizó una curva patrón de γ -globulina de bovino a concentraciones conocidas de 0.2, 0.6, 1.0 y 1.39 mg/mL, utilizando como solución blanco el amortiguador RIPA en el que se homogenizaron las muestras. Las muestras de proteínas de hipocampo se diluyeron en una proporción 1:20 con amortiguador RIPA y se agregó 1 mL de agente colorante, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm. Los valores de concentración fueron extrapolados con el ajuste lineal de la curva estándar obtenida para determinar el volumen de la muestra que se debía tomar para cargar una concentración de 100 μ g/ml. Las

proteínas totales se llevaron a un volumen final de 20 μ L con buffer RIPA, y se añadieron 20 μ L de buffer de muestra 2x (62.5 mM de Tris-HCl, 25% de glicerol, 2% de SDS, 5% de β -mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol, pH 6.8) para obtener un volumen de final de 40 μ L.

Western Blot

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) para la separación de proteínas totales, para ello, se preparó un gel separador de poliacrilamida al 10% (41% de ddH₂O, 25% Tris-HCl 1.5 M, 33% de acrilamida/bis-acrilamida, 1% de SDS, 0.5% de persulfato de amonio y 0.05% de TEMED; pH de 8.8) sobre una base de vidrio y se esperó hasta que el gel solidificó, se preparó sobre éste el gel concentrador de poliacrilamida al 5% (57% de ddH₂O, 25% Tris-HCl 0.5 M, 17% de acrilamida/bis-acrilamida, 1% de SDS, 0.5% de persulfato de amonio y 0.05% de TEMED; pH de 6.8).

Las muestras se hirvieron en baño María durante 1 minuto y se enfriaron a temperatura ambiente por 5 minutos, finalmente se cargaron en los pozos del gel; en el primer carril del gel se colocaron 12 μ L de marcador de peso molecular (Fermentas). El gel de poliacrilamida con las muestras ya cargadas en los respectivos pozos se colocó en la cámara electroforética con amortiguador de corrida frío (25 mM de tris, 190 mM glicina y 0.1% de SDS, pH 8.3). La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 60V (gel resolvedor) hasta que el frente de corrida llegó a la base del gel separador y el voltaje se cambió a

120V durante 1 hora; las proteínas embebidas dentro del gel separador se electrotransfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en un cartucho de transferencia, el cual se colocó de la siguiente manera: cátodo-cartucho-esponja-filtro-gel-membrana-filtro-esponja-cartucho-ánodo.

La electrotransferencia se llevó a cabo a 70V durante 2 horas en amortiguador de transferencia (25 mM de tris, 190 mM de glicina, 0.01% de SDS y 20% de metanol, pH 8.3). Al término de la electrotransferencia, la membrana se bloqueó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4 (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄, y 2 mM de KH₂PO₄) más 0.1% de tween 20 y 5% de leche descremada durante 1 hora con agitación constante. Una vez concluido el período de bloqueo, la membrana se colocó dentro de una bolsa de plástico y se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-ZO-1 (Invitrogen cat. 40-2200, 1:1000), anti Claudina-5 (Abcam cat. Ab53765, 1:1000), anti-occludina (Invitrogen cat. 40-4700, 1:1000), anti-Neuronal nuclei NeuN (Millipore cat. MAB77, 1:1000) y anti-actina (Abcam cat. Ab3280, 1:2000). Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS-T (PBS más 0.1% de tween 20); posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo (1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación constante. Transcurrido el periodo la membrana se lavó con PBS-T y se reveló mediante quimioluminiscencia con el uso del kit ECL plus (Amersham, RPN2232) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La membrana se expuso a una película radiográfica (Kodak) durante períodos variables (1 a 20 minutos) con el fin de obtener una exposición óptima. Las mismas membranas se emplearon

para detectar la señal de actina y NeuN. Las placas fotográficas se escanearon y la cuantificación de los blots se llevó a cabo con el uso del programa ImageJ.

Registro polisomnográfico

Para el implante de electrodos para el registro electroencefalográfico las ratas se anestesiaron intraperitonealmente con un coctel de ketamina (288.35 mg/mL), xilacina (10 mg/mL) y propiopromazina (0.5g/100mL), en una dosis de 1 mL/kg de peso corporal. Cuatro electrodos de acero inoxidable se colocaron bilateralmente en el hueso parietal anterior y posterior y uno en el hueso frontal para registrar la actividad EEG. Dos pares de electrodos de plata flexible se suturaron en el músculo dorsal de la nuca para el registro electromiográfico. Los electrodos se soldaron a un conector que se adosó al cráneo con acrílico dental. Después de la cirugía, se administró una dosis de antibiótico (penicilina g procaínica, 800 000 U, una sola dosis de 0.3 mL) por vía intramuscular y se dejó recuperar a las ratas durante 15 días en su caja habitación.

La señal electrofisiológica se registró en un polígrafo digital (Alice sleepware® Phillips, México). Los registros se analizaron en épocas de 30 segundos en la pantalla de la computadora y cada época se clasificó visualmente como vigilia, sueño no-MOR y sueño MOR. Tres días antes del registro EEG, los animales se habituaron a los cables empleados para el registro polisomnográfico, después de esto se realizó un registro EEG basal de 24 horas. Los grupos registrados fueron: control de plataforma grande (n=4) y ratas restringidas de sueño MOR (n=4). Se analizaron registros EEG de 24 horas en el primer día y en el día 10 de la

restricción de sueño MOR. Todos los grupos se registraron durante las 20 horas en la caja de plataformas múltiples y durante las 4 horas de oportunidad para dormir en su caja habitación. Se evaluaron los principales parámetros de sueño: período total de vigilia, período total de sueño, duración de sueño MOR, duración de sueño no-MOR, episodios de sueño MOR, latencia de sueño total, latencia de sueño no-MOR y latencia de sueño MOR.

Análisis estadístico

En el estudio polisomnográfico los datos cumplieron con los supuestos de normalidad, por lo que se realizó estadística paramétrica. Se empleó ANOVA de una vía para comparar los parámetros de sueño en los distintos grupos (basal, control de plataforma grande y restricción de sueño MOR) y una prueba de códigos de contraste ortogonales para comparar las diferencias específicas entre cada grupo. Debido al tamaño de muestra reducido en los experimentos de microscopía electrónica de transmisión no se realizaron análisis estadísticos de los datos.

RESULTADOS

Descripción de la ultraestructura de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica después de la restricción de sueño MOR

Los resultados de microscopía electrónica de transmisión muestran que los sujetos restringidos de sueño MOR tienen cambios importantes en la ultraestructura de las células endoteliales del hipocampo. El número de vesículas pinocíticas por área en las células endoteliales hipocámpicas de las ratas sin manipulación experimental fue de ≈ 5 vesículas/ μm^2 (Tabla 1, Figura 4). En las ratas restringidas de sueño MOR en T0 el número de vesículas pinocíticas por área en las células endoteliales del sector CA3 del hipocampo se incrementó hasta 300% y se mantuvo elevado en los animales con oportunidad para dormir de 40 y 120 minutos (Tabla 1, Figura 4). Como se observa en la Figura 4, los animales con restricción de sueño presentan numerosas vesículas pinocíticas con forma de Ω en la membrana luminal de la célula endotelial, así como caveolas cercanas a la membrana abluminal.

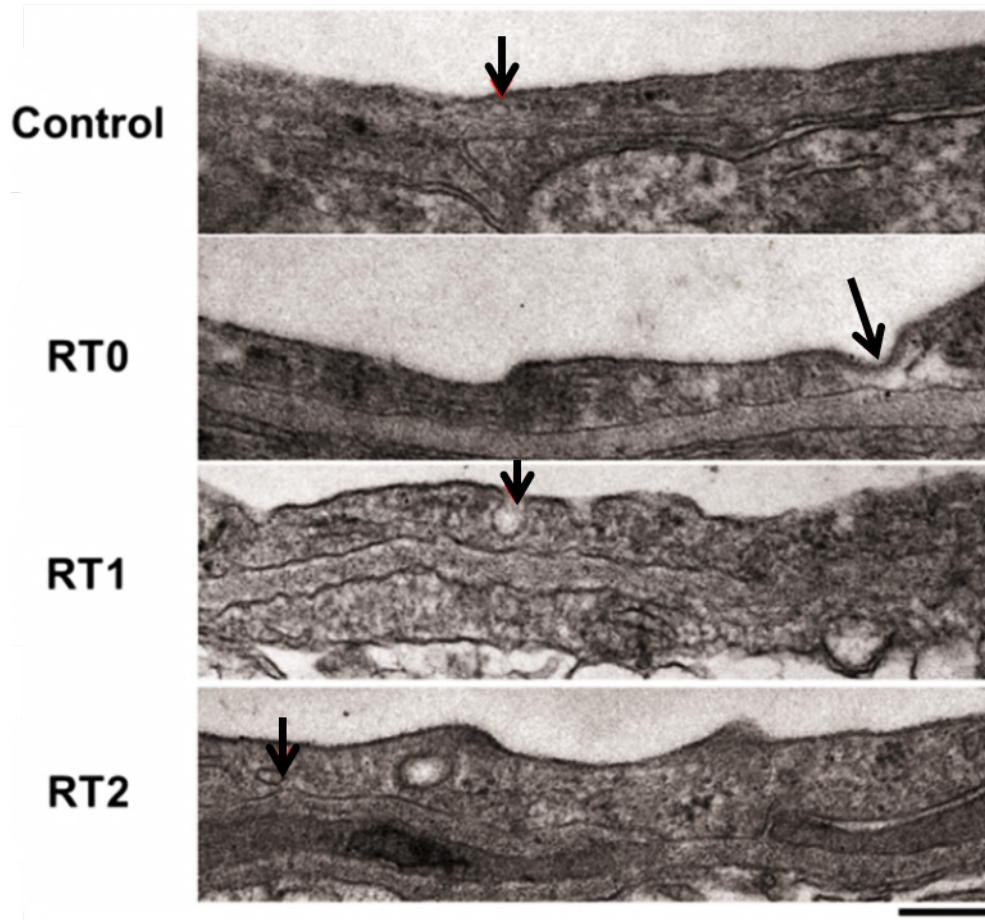


Figura 4. La restricción de sueño MOR incrementa el número de vesículas pinocíticas en las células endoteliales del hipocampo. Las flechas señalan vesículas pinocíticas en el citoplasma (control & RT2) y con forma de Ω , pegadas a la membrana luminal (RT0 & RT1). Abreviaturas: RT0, restricción de sueño MOR 10 días; RT1, restricción de sueño MOR 10 días más 40 minutos de oportunidad para dormir; RT2, restricción de sueño MOR 10 días más 120 minutos de oportunidad para dormir. Barra de escala 250nm, aumento X7500.

Adicionalmente, como se observa en la Tabla 1 y en la Figura 5, la ultraestructura general de la barrera hematoencefálica en el hipocampo de las ratas restringidas de sueño MOR estuvo evidentemente alterada. Los animales restringidos de sueño MOR presentaron aumento en el espesor de la lámina basal, aunque la pared endotelial se mantuvo sin cambios; adicionalmente, se observaron numerosas prolongaciones citoplasmáticas extendidas hacia el lumen de los capilares hipocámpicos de los animales restringidos de sueño en todos los tiempos estudiados (T0, T1, y T2) en comparación con las ratas control (Tabla 1). Las prolongaciones citoplasmáticas tienen una longitud promedio de 300nm y se observan en la cercanía de las uniones ocluyentes y en los sitios de formación de vesículas pinocíticas. Aunado a lo anterior, se observó la presencia de edema en la región perivascular de los animales restringidos de sueño MOR, especialmente con mayor magnitud en los animales con oportunidad para dormir de 40 y 120 minutos (Figura 5).

Tabla 1. Características ultraestructurales de las células endoteliales del hipocampo en ratas control y restringidas de sueño.

Condición experimental	Espesor CE μm	Espesor LB μm	No. de vesículas/μm^2	No. de PC/μm^2
Control intacto (n=20)	0.16 \pm 0.20	0.046 \pm 0.002	5.79 \pm 0.61	0.02 \pm 0.02
T0 (n=19)	0.15 \pm 0.10	0.057 \pm 0.002	21.62 \pm 3.08	1.49 \pm 0.43
T1 (n=15)	0.11 \pm 0.01	0.71 \pm 0.005	17.63 \pm 9.85	1.84 \pm 0.06
T2 (n=12)	0.16 \pm 0.03	0.046 \pm 0.005	20.39 \pm 3.50	0.33 \pm 0.41

Abreviaturas: CE, célula endotelial; LB, lámina basal; PC, Prolongación citoplasmática.

Media \pm error estándar.

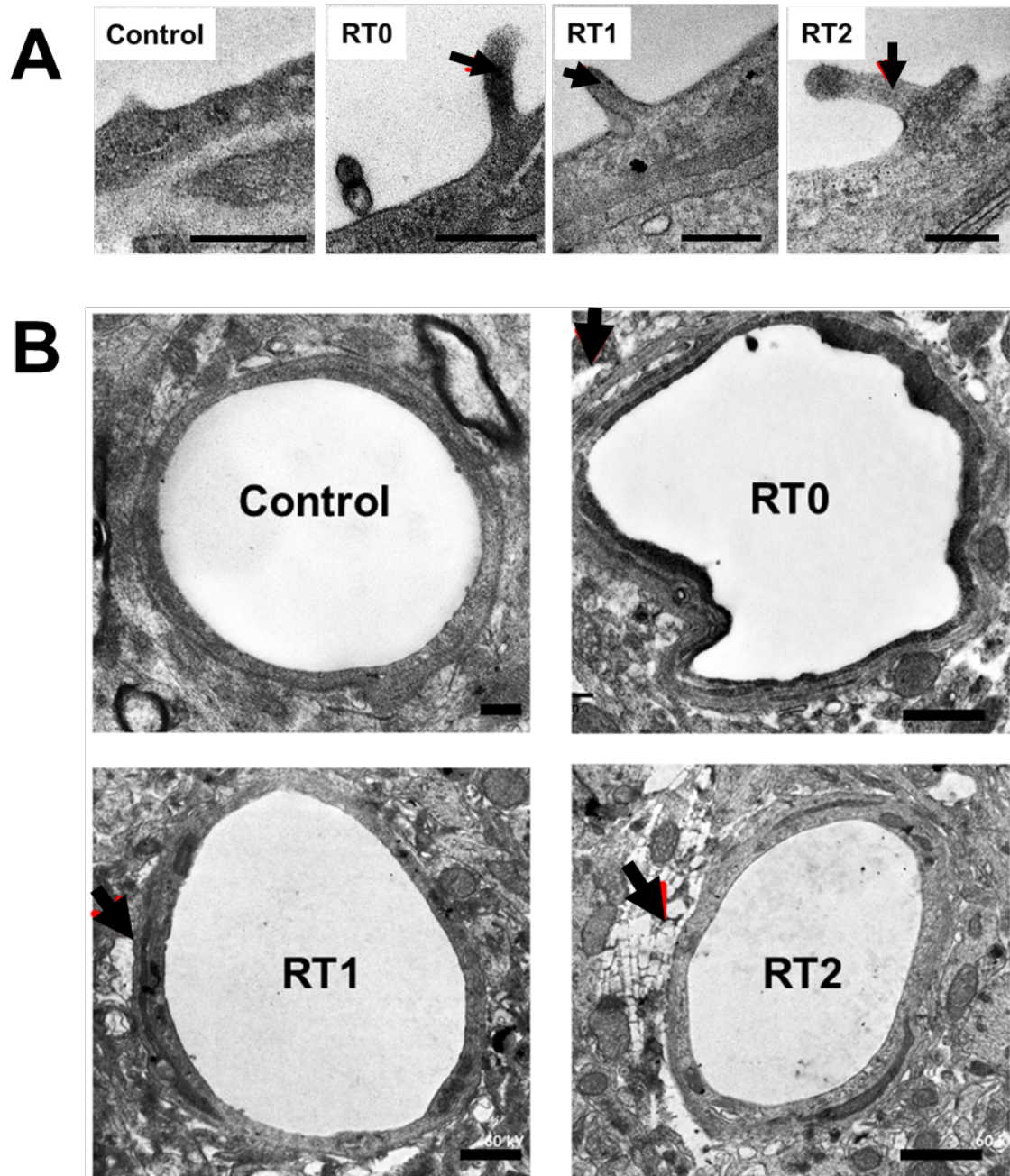


Figura 5. La restricción de sueño altera la ultraestructura general de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica en el hipocampo de la rata. La restricción de sueño MOR promueve la formación de prolongaciones citoplasmáticas (flechas en A) en las células endoteliales del hipocampo. (A) Barra de escala: 250nm, X7500. En B obsérvese el edema en la región circundante de la

célula endotelial en los animales restringidos de sueño (puntas de flecha) (B) Barra de escala: 1 μ m. X2500. Abreviaturas: RT0, restricción de sueño MOR 10 días; RT1, restricción de sueño MOR 10 días más 40 minutos de oportunidad para dormir; RT2, restricción de sueño MOR 10 días más 120 minutos de oportunidad para dormir.

Las uniones ocluyentes presentan cambios en su organización, siendo menos complejas en las células endoteliales del hipocampo de ratas restringidas de sueño MOR, aun con oportunidad de dormir, en comparación con los animales control (Tabla 2, Figura 6). Como se muestra en la Tabla 2, durante la restricción de sueño MOR y los períodos de oportunidad para dormir desaparecen las uniones ocluyentes complejas y predominan las uniones ocluyentes de tipo 1 y 2. Asimismo, la longitud de las uniones ocluyentes en las células endoteliales hipocámpicas después de la restricción de sueño MOR es menor en comparación con el grupo control, prevalece disminuida durante el período de 40 minutos de oportunidad para dormir (T1) y tiende a recuperarse después de 2 horas de oportunidad para dormir (Tabla 3). Aunque con los períodos de oportunidad para dormir (T1 y T2) las uniones ocluyentes tienden a recuperar su complejidad y longitud, las uniones ocluyentes presentan hendiduras que son de mayor espesor y longitud que las que pueden encontrarse ocasionalmente en uniones ocluyentes complejas de los animales del grupo control (Tabla 3, Figura 6).

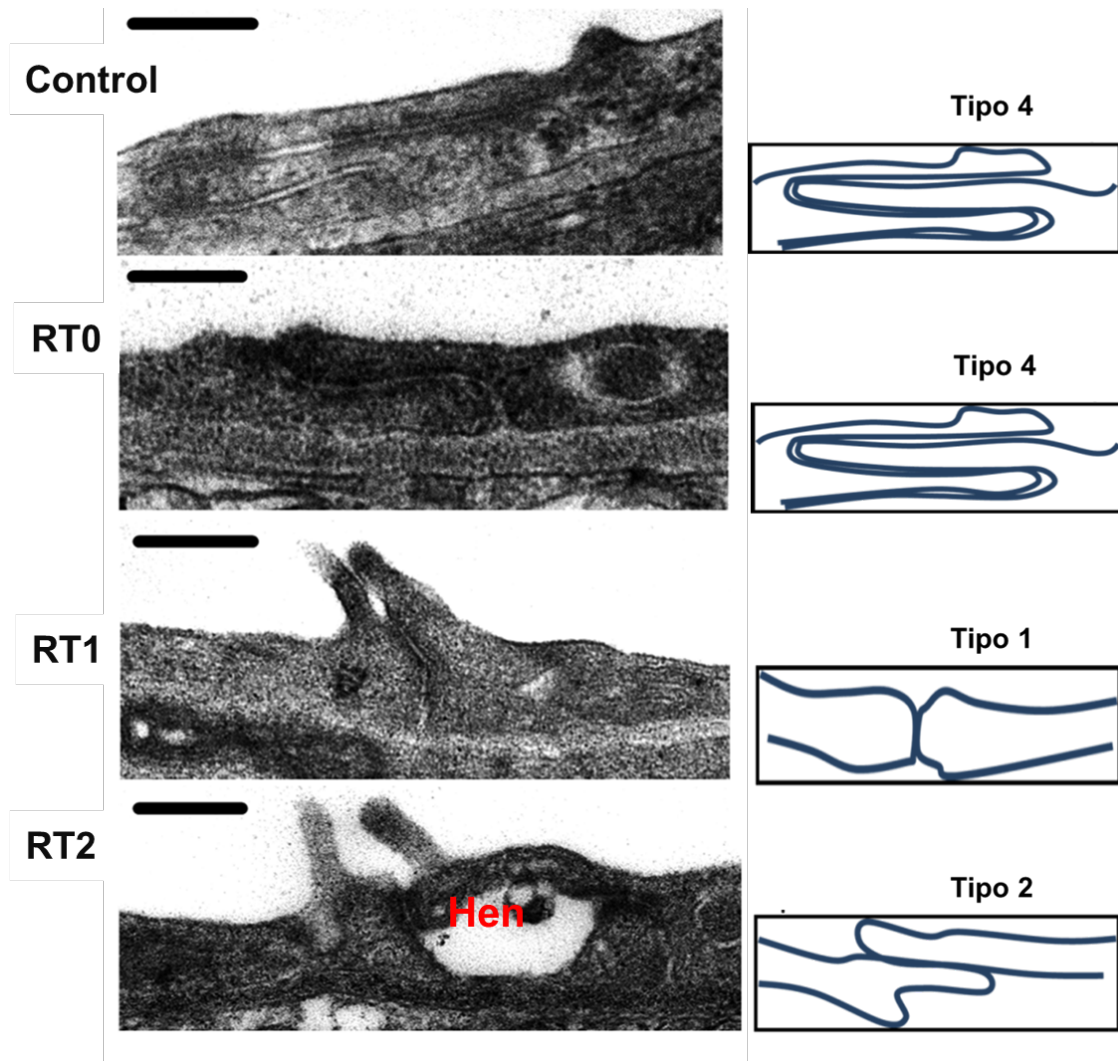


Figura 6. La restricción de sueño MOR disminuye la complejidad de las uniones ocluyentes y promueve la formación de hendiduras (Hen) en las uniones ocluyentes interendoteliales. Barra de escala: 200nm, X7500.

Tabla 2. Porcentaje de cada tipo de unión ocluyente (UO) por condición experimental.

Condición experimental	% UO tipo 1	% UO tipo 2	% UO tipo 3	% UO tipo 4
Control intacto				
(n=3)	0	0	33.4	66.6
T0				
(n=16)	37.5	56.25	6.25	0
T1				
(n=4)	25	75	0	0
T2				
(n=8)	37.5	25	37.5	0

Tabla 3. Características ultraestructurales de las uniones ocluyentes por condición experimental.

Condición experimental	Longitud UO μm	Promedio de hendiduras por UO	Longitud hendidura μm	% de la UO ocupada por hendiduras	Espesor de hendidura μm
Control intacto (n=3)	1.112 \pm 0.17	1	0.255 \pm 0.11	22.93	0.014 \pm 0.001
T0 (n=16)	0.82 \pm 0.15	1.68	0.440 \pm 0.11	53.65	0.044 \pm 0.006
T1 (n=4)	0.597 \pm 0.14	1.75	0.197 \pm 0.06	32.99	0.031 \pm 0.004
T2 (n=8)	1.001 \pm 0.25	0.87	0.178 \pm 0.03	17.78	0.085 \pm 0.01

Media \pm error estándar.

Expresión de proteínas de la unión ocluyente después de la restricción crónica de sueño MOR

El control para normalizar los blot de las proteínas de interés fue NeuN. Debido a que la densidad óptica relativa entre el control intacto y el control de plataforma grande no fueron diferentes, los valores se promediaron y se muestran en las gráficas como un solo grupo control con un error estándar considerando ambos grupos (Figura 7). La actina es una proteína importante para el mantenimiento de la integridad estructural de las células y es la proteína de anclaje para moléculas de la unión ocluyente (e. g. ZO-1). Como se muestra en la Figura 7, durante la restricción de sueño MOR los niveles de expresión de actina en el hipocampo disminuyeron y se mantuvieron reducidos con respecto al grupo control incluso en los animales con 40 y 120 minutos de oportunidad para dormir. Las proteínas transmembranales ocludina y Claudina-5 también se encuentran disminuidas en el hipocampo de todos los grupos experimentales sometidos a restricción de sueño MOR en comparación con el grupo control. De igual forma, la proteína citosólica ZO-1 se expresa menos en condiciones de restricción de sueño MOR, incluso con oportunidad para dormir, en comparación con el hipocampo del grupo control (Figura 7).

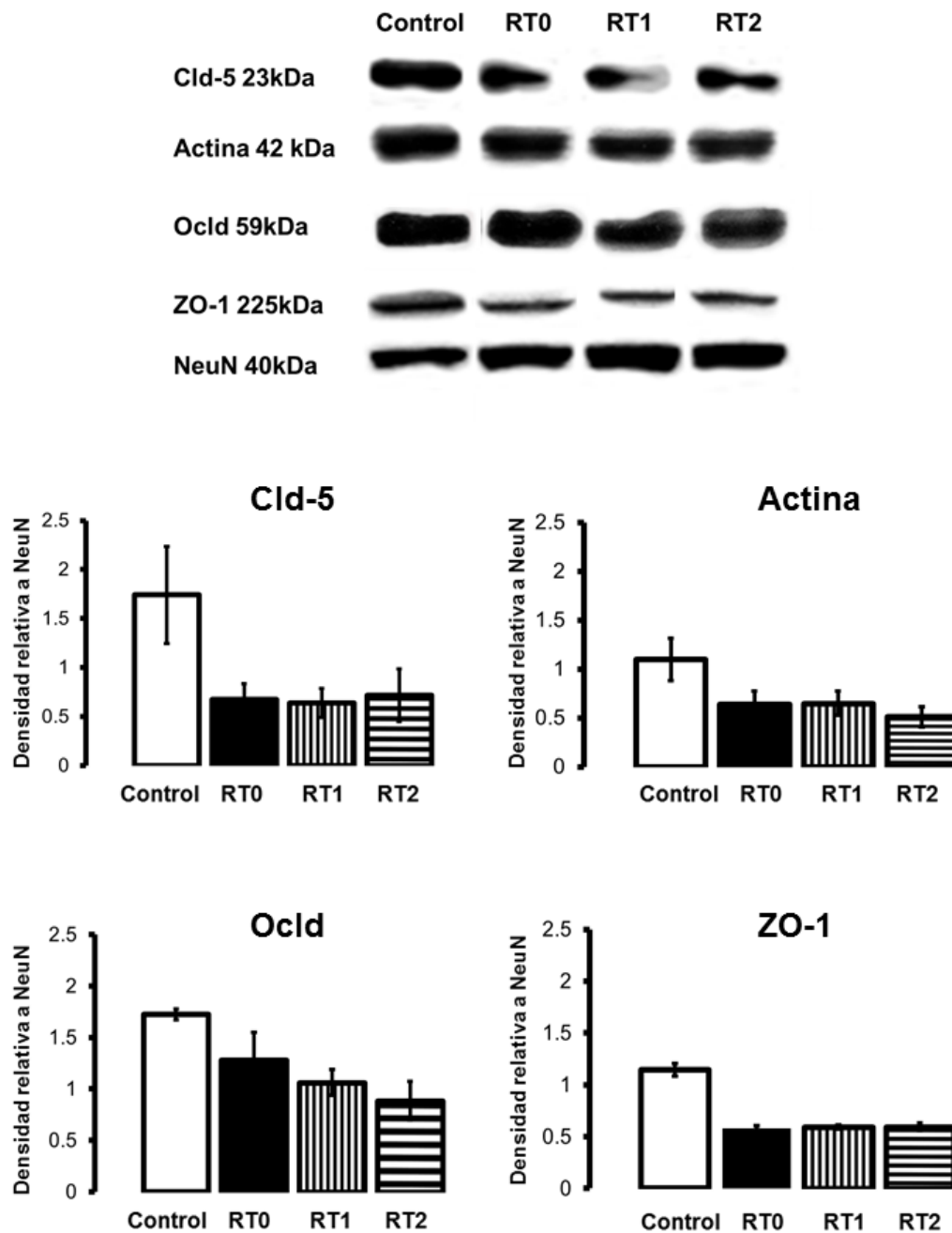


Figura 7. La restricción de sueño MOR disminuye la expresión de proteínas de la unión ocluyente en el hipocampo de la rata. Arriba: panel representativo de Western blot de ZO-1, Ocludina (Oclid), NeuN, actina, y Claudina 5 (Cld-5) en el hipocampo de ratas de los grupos control (Control intacto y control de plataforma grande); RT0, restricción de sueño MOR 10 días; RT1, restricción de sueño

MOR 10 días más 40 minutos de oportunidad para dormir; y RT2, restricción de sueño MOR 10 días más 120 minutos de oportunidad para dormir. Datos presentados como densidad relativa a NeuN. Media \pm error estándar.

Análisis del registro polisomnográfico durante la restricción de sueño MOR

La actividad EEG de las ratas sometidas a restricción crónica de sueño MOR y el control de plataforma grande se realizaron con el fin de determinar si el método empleado permite atribuir los cambios en el funcionamiento de la barrera hematoencefálica a la pérdida y subsecuente recuperación del sueño MOR. Durante las 20 horas de registro EEG en la caja de plataformas múltiples, las ratas restringidas de sueño MOR presentan un incremento en el tiempo total de vigilia en comparación con los controles ($p < 0.01$) (Figura 8). El método de plataforma múltiple disminuye el sueño no-MOR y abole por completo el sueño MOR desde el día 1 de restricción de sueño ($p < 0.005$). Asimismo, la supresión del sueño MOR, caracterizada por la reducción en el tiempo de sueño MOR y en el número de episodios MOR, se mantiene a lo largo de los 10 días de restricción de sueño. Como se observa en la Figura 8, los controles de plataforma grande presentan una ligera reducción en el porcentaje de sueño MOR y no-MOR, aunque nunca alcanzan los niveles observados en los animales restringidos de sueño.

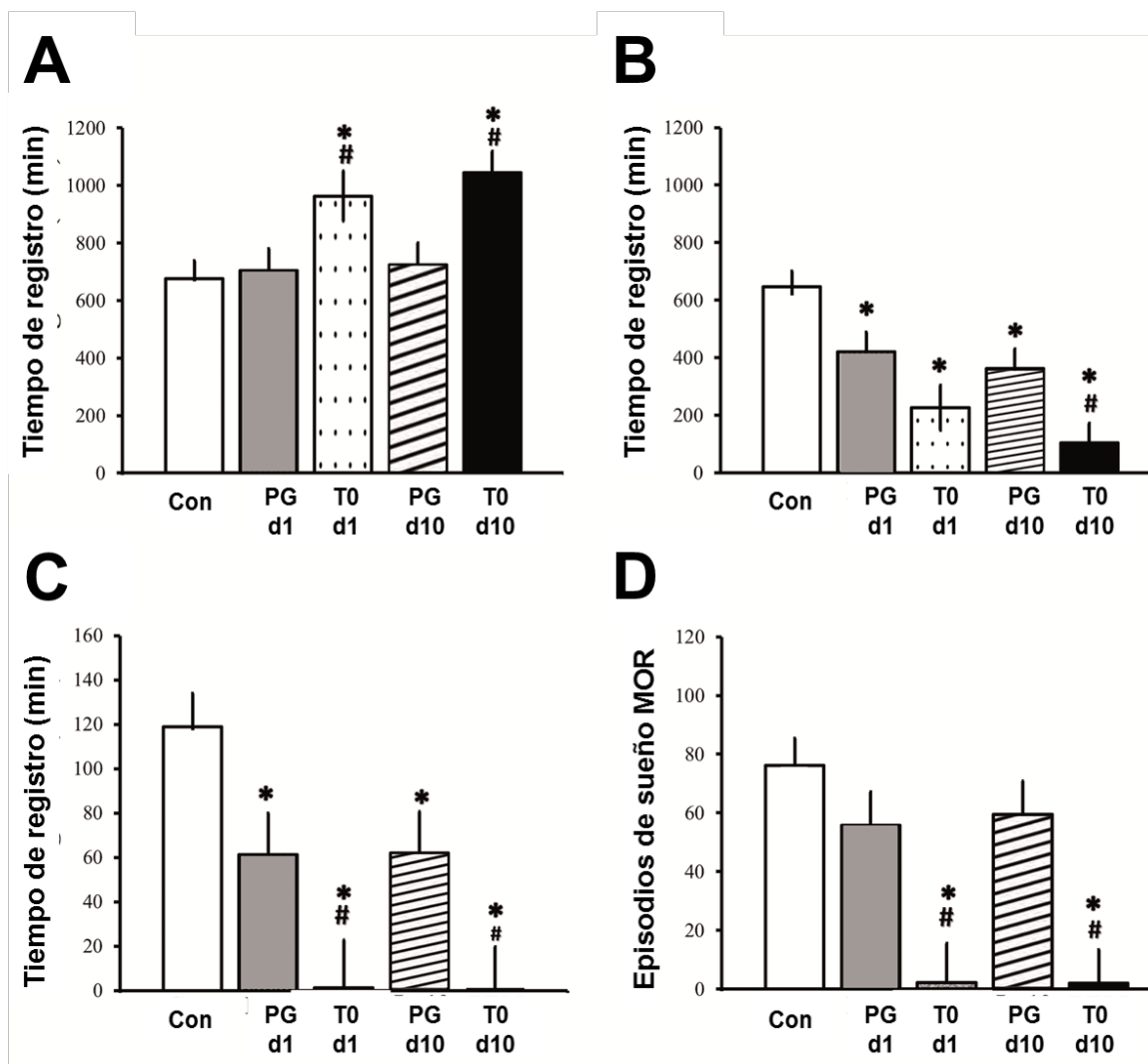


Figura 8. La técnica modificada de plataforma múltiple suprime el sueño MOR. Cambios en el patrón de sueño durante el periodo de restricción de sueño en la técnica modificada de plataforma múltiple. Las gráficas muestran el tiempo de vigilia (A), el tiempo de sueño no-MOR (B), el tiempo de sueño MOR (C) y el número de episodios de sueño MOR (D). Registro basal (Con), plataforma grande en el día 1 y 10 (PG d1 y PG d10), restricción de sueño en el día 1 y 10 (T0 d1 y T0 d10). *Diferencias significativas con respecto al control intacto ($p < 0.05$); #Diferencias significativas con respecto a la plataforma grande en el mismo día ($p < 0.05$).

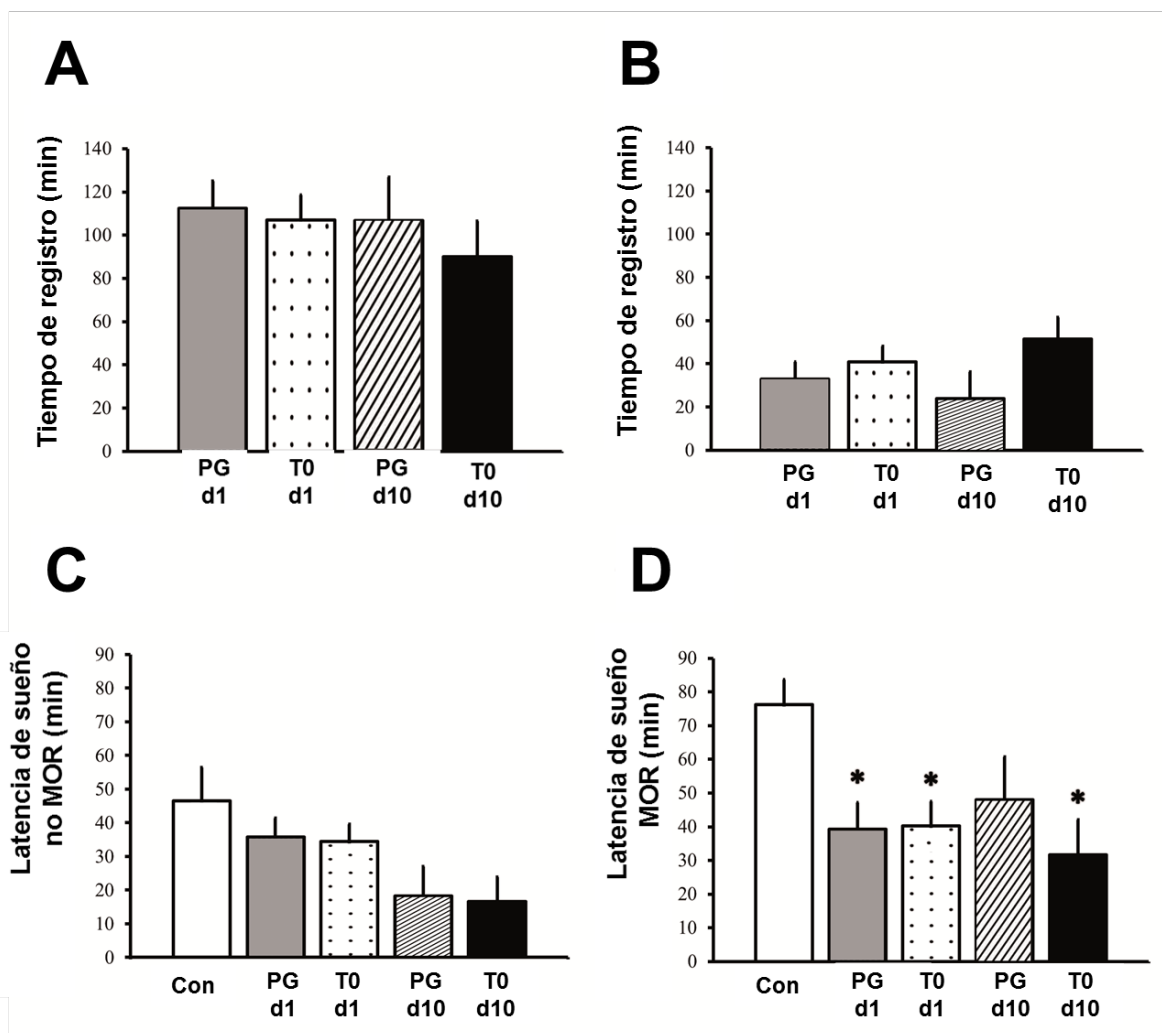


Figura 9. La técnica modificada de plataforma múltiple disminuye la latencia de sueño MOR. Cambios en el patrón de sueño durante el periodo de 4 horas de recuperación de sueño en la técnica modificada de plataforma múltiple. Las gráficas muestran el tiempo de sueño no MOR (A), el tiempo de sueño MOR (B), el tiempo de latencia de sueño no MOR (C) y la latencia de sueño MOR (D). Registro basal (Con), plataforma grande en el día 1 y 10 (PG d1 y PG d10), restricción de sueño en el día 1 y 10 (T0 d1 y T0 d10). *Diferencias significativas con respecto al control intacto ($p < 0.05$); #Diferencias significativas con respecto a la plataforma grande en el mismo día ($p < 0.05$).

Como se muestra en la Figura 9, durante las cuatro horas de oportunidad para dormir en la caja habitación las ratas restringidas de sueño MOR y los controles de plataforma grande presentan duraciones similares de sueño no-MOR. Las ratas restringidas de sueño MOR presentan una tendencia en el incremento de sueño MOR (rebote) y ambos grupos tienen una reducción en la latencia de sueño con respecto al registro EEG basal. Como se observa en la Figura 9, en el día 10 el grupo de restricción de sueño MOR presenta una tendencia a una latencia más corta de sueño MOR que el grupo control de plataforma grande.

DISCUSIÓN

La restricción de sueño MOR en un período de 10 días promueve la ruptura de la barrera hematoencefálica a través de la alteración de los dos mecanismos de transporte inespecífico, incremento en la densidad de vesículas pinocíticas y desacoplamiento de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales del hipocampo de la rata. Asimismo, los resultados de microscopía electrónica de transmisión muestran claramente que la restricción de sueño MOR altera la ultraestructura general de las células endoteliales del hipocampo de la rata. El incremento significativo en el número de vesículas pinocíticas puede estar relacionado con el incremento en el espesor de la lámina basal y con la formación de prolongaciones citoplasmáticas en el lumen de los capilares. De igual forma, se observa una relación estrecha entre el aumento en el número de vesículas pinocíticas y el desacoplamiento de las uniones ocluyentes, lo cual es congruente con reportes en la literatura especializada (Liu et al., 2008).

Las uniones ocluyentes de las células endoteliales del hipocampo de la rata son menos complejas en condiciones de restricción de sueño MOR en comparación con los animales con periodos de sueño normales. La disminución en la complejidad de la unión ocluyente se refleja en la reducción de la longitud de la unión y en la menor de la expresión de las proteínas de la unión ocluyente; en particular se encuentra reducida la expresión de la Claudina-5, que es la proteína crucial para limitar el transporte paracelular a nivel de la barrera hematoencefálica (Nitta et al., 2003). En el mismo sentido, se ha descrito en diversas patologías del sistema nervioso, que la disminución en la expresión de ZO-1 y ocludina correlaciona con el incremento en el número de vesículas pinocíticas (Liu et al., 2008). La escasa recuperación en el cierre de las hendiduras de la unión ocluyente concomitante con el alto número de vesículas pinocíticas puede ser el mecanismo responsable de la formación progresiva de edema observado en los modelos animales que son restringidos de sueño MOR.

Dado que durante el registro polisomnográfico se determinó que el método modificado de plataforma múltiple suprime selectivamente el sueño MOR, los resultados obtenidos en la regulación del funcionamiento de la barrera hematoencefálica pueden atribuirse específicamente a la disminución en la cantidad total de sueño MOR. Los hallazgos encontrados en el presente trabajo con relación al registro polisomnográfico son consistentes con reportes previos, donde se indica que además de la supresión de sueño MOR, la cantidad de sueño no-MOR disminuye aproximadamente en un 30% durante las primeras 24 horas de alojamiento en las plataformas múltiples (Machado et al., 2004). Asimismo, los

hallazgos en el grupo control de plataforma grande son similares a lo reportado por Machado y colaboradores (2004) quienes describen una disminución de aproximadamente del 30% en el tiempo de sueño no-MOR y una pérdida menor del tiempo de sueño MOR. Machado y colaboradores (2006) en un procedimiento de restricción de sueño MOR similar al empleado en el presente trabajo (18 horas diarias de privación de sueño MOR seguidas de 6 horas de oportunidad para dormir, aplicado durante 21 días) encontraron también que durante el período de oportunidad para dormir se presenta una tendencia al rebote de sueño MOR, que se caracteriza por reducción de la latencia a sueño MOR, incremento en el tiempo y número de episodios de sueño MOR desde el día 5 de restricción de sueño (Machado et al., 2004). Dado que el procedimiento de privación efectivamente suprime el sueño MOR y existe una tendencia a la recuperación del sueño durante las 4 horas de oportunidad para dormir, se puede afirmar que una de las funciones del sueño es mantener la integridad de la barrera hematoencefálica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con la hiperpermeabilidad constante en el hipocampo al colorante Azul de Evans previamente reportada en ratas restringidas de sueño MOR durante 10 días consecutivos (Gómez-González et al., 2013). El mantenimiento de la hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans de nuestro trabajo previo parece estar relacionado con el alto número de vesículas pinocíticas, la disminución de la complejidad de las uniones ocluyentes, así como la disminución en la expresión de las proteínas de la unión ocluyente en el hipocampo de los animales restringidos de sueño incluso con oportunidades para

dormir de 40 y 120 minutos. Dado que el hipocampo es una región crucial en la consolidación de la memoria y otros procesos cognitivos (Lagali et al., 2010). Las alteraciones en la integridad de la barrera hematoencefálica en esta región podrían explicar la génesis de las disfunciones moleculares y cognoscitivas reportadas después de periodos de privación/restricción de sueño MOR como decremento en la tasa de neurogénesis (Guzman-Marín et al., 2008; Mueller et al., 2008), reducción en el volumen del hipocampo (Novati et al., 2011), e incremento en la concentración de los neurotransmisores excitadores glutamato, aspartato y glutamina (Mohammed et al., 2011). No obstante, los mecanismos moleculares involucrados en los cambios de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica inducidos por la restricción de sueño MOR no se han reportado. Las características ultraestructurales y la disminución en la expresión de proteínas de la unión ocluyente en el hipocampo después de la restricción de sueño MOR se asemejan a lo reportado previamente en condiciones aversivas como el estrés, infecciones, trastornos metabólicos y enfermedades neurodegenerativas (Bouchard et al., 2002; Tasali et al., 2009; Mills et al., 2007; Gómez-González et al., 2011; Reynolds et al., 2012). El fenotipo de las células endoteliales cerebrales con incremento en vesículas pinocíticas, edema y formación de prolongaciones citoplasmáticas se ha reportado en distintas condiciones experimentales, como después de la alimentación crónica con una dieta rica en colesterol en un modelo murino, subsecuente a la administración de citocinas proinflamatorias en la rata y el ratón (Banks et al., 1991; Banks et al., 1995) así como en ratones deficientes de pericitos (Armulik et al., 2010). Lo anterior sugiere que los mediadores de la disrupción de la barrera hematoencefálica en ratas restringidas de sueño están

presentes en las condiciones previamente mencionadas y que la participación de otros componentes de la barrera hematoencefálica también puede desempeñar un papel importante en la ruptura de esta interfaz (e. g. pericitos). Los puntos en común entre la pérdida de sueño y la ruptura de la barrera hematoencefálica son mediadores inflamatorios, como: citocinas proinflamatorias, la adenosina y el óxido nítrico. Todos los componentes de la barrera hematoencefálica sintetizan estos mediadores inflamatorios en respuesta a alteraciones sistémicas o locales; asimismo son capaces de responder a cambios locales en la concentración de esos mediadores con modificaciones en el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Armulik et al., 2005). El cuadro de inflamación está presente en otras alteraciones fisiológicas que se acompañan de ruptura en la barrera hematoencefálica como la enfermedad de Alzheimer y procesos infecciosos en el sistema nervioso central. Adicionalmente, está ampliamente reportado que la pérdida de sueño induce un proceso inflamatorio que depende del tiempo y de la intensidad del modelo empleado. En humanos, períodos breves de pérdida de sueño (24-72 horas) incrementan la respuesta inflamatoria sistémica; sin embargo el aumento concomitante en altos niveles de cortisol, parece ejercer un efecto inmunoregulador negativo (van Leeuwen et al., 2009). Por otro lado, después de períodos crónicos de restricción de sueño se reporta elevación constante de citocinas proinflamatorias y resistencia a glucocorticoides. Datos aún no publicados de nuestro laboratorio muestran que la privación de sueño MOR durante 96 horas continuas no incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Lo anterior sugiere que la exposición temporal a mediadores inflamatorios en condiciones de privación y restricción de sueño podría mediar los

cambios en la integridad de la barrera hematoencefálica. La exposición crónica a mediadores inflamatorios (e. g. IL-1, IL-6, IL-17A y TNF- α) debido a la restricción de sueño y al tiempo insuficiente para la recuperación de sueño podría tener efectos de deterioro en la barrera hematoencefálica y en el organismo en general. Estos cambios sugieren una desregulación neuroinmunoendocrinológica que puede estar mediando la disrupción de la barrera hematoencefálica inducida por la restricción de sueño MOR.

CONCLUSIÓN

La restricción de sueño MOR induce el desarrollo de cambios ultraestructurales y moleculares en la barrera hematoencefálica. Los reportes de disfunciones cognitivas asociadas a las alteraciones de sueño pueden explicarse mediante la infiltración de moléculas potencialmente tóxicas y de mediadores inflamatorios que desencadenen cambios moleculares e histológicos en el sistema nervioso central. Dado que la pérdida de sueño es un factor que predispone a diversas patologías, la restricción crónica de sueño MOR puede ser un modelo de interés para descubrir los mecanismos que dan lugar a los cambios fisiopatológicos observados en la obesidad, diabetes y en un cuadro amplio de enfermedades que afectan el sistema nervioso central. Aunque este estudio muestra que la barrera hematoencefálica está comprometida después de la restricción de sueño MOR, es importante abundar en los mecanismos moleculares que median este proceso. La evaluación de la integridad de las células endoteliales es el estadio final ocasionado por la interacción de una red de moléculas provenientes de diferentes tipos celulares en el encéfalo. La participación de otros componentes de la barrera

hematoencefálica durante la restricción de sueño aún no ha sido dilucidada. El papel de los transportadores selectivos para solutos y nutrientes presentes en la célula endotelial de la barrera hematoencefálica deberá ser evaluado en detalle en estudios posteriores. El presente estudio podría ser considerado un eslabón importante para entender la aún enigmática función del sueño, en particular la del sueño MOR, que según nuestros hallazgos se relaciona con el mantenimiento de la integridad de la interfaz entre los sistemas nervioso, inmunológico y endocrino, la barrera hematoencefálica.

REFERENCIAS

Abbott, N. J. (2002). Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat.* 200, 629–638. Abbott, N. J. (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 5–23.

Abbot N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37, 13-25.

Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 97, 512–523.

Armulik A., Genové G., Mäe M., Nisancioglu M.H., Wallgard E., Niaudet C., He L., Norlin J., Lindblom P., Strittmatter K., Johansson B.R & Betsholtz C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 25, 468:7323, 557-561

Ballabh P., Braun A. & Nedergaad M. (2004). The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16, 1-13.3.

Banks WA, Ortiz L, Plotkin SR & Kastin AJ. (1991). Human interleukin (IL)1 α , murine IL-1 α and murine IL-1 β are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 988–996.

Banks W. A., Kastin A. J. & Broadwell R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, 2, 241-248.

Begley, D.J., and Brightman, M.W. (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog. Drug Res.* 61, 39–78.

Biswas S., Mishra P. & Mallick B. N. (2006). Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience*, 142, 315-331.

Bleys R. L. A. W. & Cowen T. (2001). Innervation of cerebral blood vessels: morphology, plasticity, age-related, and Alzheimer's disease-related neurodegeneration. *Microscopy Research and Technique*, 53, 106-118.

Bouchard P, et al. 2002. Morpho-functional studies of the blood-brain barrier in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 45: 1017 – 1025.

Carman A. J., Mills J. H., Krenz A., Kim D. G. & Bynoe M. S. (2011). Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier. *J Neurosci.* Sep 14;31(37):13272-80.

Davisa C. J., Meighanc P. C., Taishib P., Krueger J. M., Hardinga J. W. & Wright J. W. (2006). REM sleep deprivation attenuates actin-binding protein cortactin: A link between sleep and hippocampal plasticity. *Neuroscience letters* Vol., 400 3; 191-196.

Davson H. (1976). Review lecture. The blood-brain barrier. *J. Physiol.* 255, 1–28.

Dempsey E. W., Wislocki G. B. (1955). An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *J biophysic and biochem cytol*, Vol. 1, No. 3

Ehrlich P. (1885). Das sauerstoff-bedürfnis des organismus. Eine Farbenanalytische Studie. Habilitation thesis, Berlin.

Gómez-González B. & Escobar A. (2009). Altered functional development of the blood-brain barrier after early life stress in the rat. *Brain Research Bulletin*, 79, 376-387.

Gómez-Gonzalez B., Hurtado-Alvarado G., & Velazquez-Moctezuma J. (2012). In *Blood-brain barrier: new research* Nova Science, 2012 ISBN: 978-1-62100-766-1.

Gómez-Gonzalez B., Hurtado-Alvarado G., Esqueda-León E, Santana-Miranda R, Rojas-Zamorano J. A. & Velazquez-Moctezuma J. (2013). REM sleep loss and recovery regulate the blood-brain barrier function. *Curr Neurovasc Res*. Vol. 10, No. 3.

Guillemin G. J., Brew B. J. (2004). Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J. Leukoc. Biol.* 75: 388–397.

Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Bashir, T., Nienhuis, R., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2008). Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep*, 31, 167-175.

Hawkins B. T. & Davis T. P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharm review* vol. 57 no. 2173-185.

Huang W. L., Harper C. G., Evans S. F., Newnham J. P., & Dunlop S. A. (2001). Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci.* 19(5):487-93.

Huber J. D., Egleton R. D. & Davis T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 24, 719-725.

Jaiswal M. K. & Mallick B. N. (2009) Prazosin modulates rapid eye movement sleep deprivation-induced changes in body temperature in rats. *J. Sleep Res.*, 18, 349-56.

Jodoin J., Demeule M., Fenart L., Cecchelli R., Farmer S., Linton K. L., Higgins C. F. & Béliveau. (2003) P-glycoprotein in blood–brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *Journal of Neurochemistry*, 2003, 87, 1010–1023

Kiyatkin E. A., & Sharma H. S. (2009) Permeability of the blood-brain barrier depends on brain temperature. *Neurosci.*, 161, 926-939.

Kovac A., Erickson E. A., Banks W. A. (2011) Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to Lipopolysaccharide. *J of Neuroinflammation* 8:139

Krueger J. M. (2008) The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des.* 14(32):3408-16

Kumar P., Shen Q., Pivetti C. D., Lee E. S., Wu M. H., & Yuan S. Y. (2009). Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, e19.

Lagali P. S., Corcoran C.P., & Picketts D. J. (2010). Hippocampus development and function: role of epigenetic factors and implications for cognitive disease. *Clin Genet.* 78(4):321-33.

Liu L. B., Xue Y. X., Liu Y. H., & Wang Y. B. (2008). Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci. Res.* 86(5):1153-68.

Lourenço C. F., Brites D., Brito M. A. (2010). Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews* 64; 328-363

Machado, R.B., Hipólido, D. C., Benedito-Silva, A. A. & Tufik, S. (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery, *Brain Res.* 1004, 45-51.

Meerlo P., Sgoifo A. & Suchecki D. (2008). Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med. Rev.*, 12, 197-210.

Mendelson W. B., Guthrie R. D., Frederick G. & Wyatt R. J. (1974). The Flower Pot Technique of Rapid Eye Movement (REM) Sleep Deprivation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 2, pp. 553-556.

Metha D. & Malik A. B. (2006). Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability *Physiol Rev* 86: 279–367.

Mills J. H., Thompson L. F., Mueller C., Waickman A. T., Jalkanen S., Niemela J., Airas L. & Bynoe M. S. (2008). CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8;105(27):9325-30.

Mills P. J., von Känel R., Norman., Natarajan L., Ziegler M. G. & Dimsdale J. E. (2007). Inflammation and Sleep in Healthy Individuals. *Sleep*, Vol. 30, No. 6.

Mohammed, H. S., Aboul, H. S, Khadrawy, Y. A., & Noor, N. A. (2011) Neurochemical and electrophysiological changes induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Behav. Brain Res.*, 225, 39-46.

Mueller, A. D., Pollock, M. S., Lieblich, S. E., Epp, J. R., Galea, L. A., & Mistlberger, R. E. (2008) Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294, 1693-1703.

Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M. & Tsukita S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 12;161(3), 653-60.

Novati A, Hulshof HJ, Koolhaas JM, Lucassen PJ, Meerlo P. 2011. Chronic sleep restriction causes a decrease in hippocampal volume in adolescent rats, which is not explained by changes in glucocorticoid levels or neurogenesis. *Neuroscience* 190: 145-155.

Paolinelli R., Corada M., Orsenigo F. & Dejan E. (2011). The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? *Pharmacological Research* 63:165–171

Persidsky Y., Ramirez S. H. & Haorah J. (2006). Blood–brain Barrier: Structural Components and Function under Physiologic and Pathologic Conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* (2006) 1: 223–236

Poe R., Walsh C. M. & Bjorness T. E. (2010) Cognitive neuroscience of sleep. *Progress in Brain Research* Volume 185, 2010, s 1–19

Radisavljevic Z., Avraham H. & Avraham S. (2000) Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. Jul 7;275(27):20770-4.

Rechtschaffen A. & Bergmann B. M. (2002). Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*, 25, 18–24.

Rechtschaffen A., Bergmann B. M., Everson C. A., Kushida C. A. & Gilliland M. A. (1989). Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*, 12, 68-87.

Reynolds A. C., Dorrian J., Liu P. Y., Van Dongen H. A., Wittert G. A. (2012). Impact of Five Nights of Sleep Restriction on Glucose Metabolism, Leptin and Testosterone in Young Adult Men. *PLoS ONE* 7(7)

Sharma H. S. (2004). Blood-brain and spinal cord barriers in stress. In H. S. Sharma, J. Westman (Eds.), *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease* (pp. 231-298). San Diego, CA: Elsevier.

Sharma H. S. & Alm P. (2004). In H. S. Sharma, J. Westman (Eds.), *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease* (pp. 191-231) San Diego, CA: Elsevier

Siegel J. M. (2010). Do all animals sleep? *Trends Neurosci.*, 31, 208-213.

Tasali E., Leproult R. & Spiegel K. (2009). Reduced sleep duration or quality: Relationships with insulin resistance and type 2 diabetes. *Prog Cardiovasc Dis* 51: 381–391.

Ueno M. (2007) Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1199-1206.

van Leeuwen W. M. A., Lehto M., Karisola P., Lindholm H. & Luukkonen R. (2009). Sleep Restriction increases the risk of developing Cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *Plos One* 4(2): e4589.

Weiss N., Miller F., Cazaubon S., & Couraud P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1788(4):842-57.

Wittchen E. S., Haskins J, Stevenson B. R. (1999). Protein Interactions at the Tight Junction. *J Biol Chem* Vol. 274, 35179–35185

Yehuda S., Sredni B., Carasso R. L. & Kenigsbuch-Sredni D. (2009). REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J. Interf. Cytok. Res.*, 29, 393-398.

Zlokovic B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 178-201.

REM Sleep Loss and Recovery Regulates Blood-Brain Barrier Function

Beatriz Gómez-González^{#,*}, Gabriela Hurtado-Alvarado[#], Enrique Esqueda-León, Rafael Santana-Miranda, José Ángel Rojas-Zamorano and Javier Velázquez-Moctezuma

Area of Neurosciences, Department of Biology of Reproduction, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

Abstract: The functions of rapid eye movement (REM) sleep have remained elusive since more than 50 years. Previous reports have identified several independent processes affected by the loss and subsequent recovery of REM sleep (hippocampal neurogenesis, brain stem neuronal cell death, and neurotransmitter content in several brain regions); however, a common underlying mechanism has not been found. We propose that altered brain homeostasis secondary to blood-brain barrier breakdown may explain all those changes induced by REM sleep loss. Therefore, the present report aimed to study the consequences of REM sleep restriction upon blood-brain barrier permeability to Evans blue. REM sleep restriction was induced by the multiple platform technique; male rats were REM sleep restricted 20h daily (with 4h sleep opportunity) during 10 days; control groups included large platform and intact rats. To study blood-brain barrier permeability Evans blue was intracardially administered; stained brains were sliced and photographed for optical density quantification. An independent experiment was carried out to elucidate the mechanism of blood-brain barrier breakdown by transmission electron microscopy. REM sleep restriction increased blood-brain barrier permeability to Evans blue in the whole brain as compared to both control groups. Brief periods of sleep recovery rapidly and effectively restored the severe alteration of blood-brain barrier function by reducing blood-to-brain transfer of Evans blue. The mechanism of blood-brain barrier breakdown involved increased caveolae formation at brain endothelial cells. In conclusion, our data suggest that REM sleep regulates the physical barrier properties of the blood-brain barrier.

Keywords: BBB, EEG, REM sleep restriction, REM sleep function, transmission electron microscopy.

INTRODUCTION

Sleep is a widespread phenomenon among vertebrates; it is characterized by a rapidly reversible immobility, reduced awareness to environmental stimuli, acquisition of species' specific postures, and distinctive brain electrical activity [1]. In mammals, sleep is divided into two major stages, rapid eye-movement sleep (REM) and non-REM sleep. REM sleep is characterized by fast desynchronized electroencephalographic (EEG) activity and muscle atonia, while non-REM sleep is characterized by slow wave EEG activity and slight muscle tone reduction [2]. Although highly studied since more than 50 years, the function of sleep remains elusive; pioneer works proved that sleep is important to preserve life, because chronic sleep loss induced progressive health deterioration until death of the experimental animals [3, 4]. Therefore, sleep function is hypothesized to preserve the integrity of the systems controlling the constancy of the internal *milleu* (the endocrine and immune systems) [5]; in particular Korth [6] suggested that sleep could maintain the function of the system that keeps brain homeostasis, the blood-brain barrier, but until now no evidence has been given to support such sleep function.

The blood-brain barrier is constituted by endothelial cells, pericytes, astroglia and microglia, whose functions include selective transport of molecules from blood-to-brain and *vice versa*, metabolism of blood- and brain-borne molecules, as well as protection to the brain from potentially neurotoxic blood-borne molecules (e.g. glutamate and albumin) [7]. Proper blood-brain barrier function is needed to guarantee normal physiology of both neuronal and glial cells, indeed direct neural exposure to blood-borne proteins may induce apoptosis and glial reactivity [8-10]. The altered function of the blood-brain barrier would explain the diverse independent effects of REM sleep loss previously reported, such as reduced hippocampal neurogenesis [11, 12], increased concentration of the excitatory amino acids glutamate, aspartate and glutamine in the hippocampus and cerebral cortex [13], and increased apoptosis in the REM-sleep controlling nuclei of the brain stem [14]. Therefore it seems plausible that REM sleep may be preserving blood-brain barrier integrity. Hence, this study aimed to elucidate the effect of REM sleep loss and subsequent recovery upon blood-brain barrier permeability to a blood-circulating dye, Evans blue.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Three month-old male Wistar rats (n=39) were used. Rats were caged in groups of 6-8 in our laboratory vivarium under a 12h light/dark cycle (lights on at 23 hour) at room temperature of 20-25°C. Commercial rat chow and tap water were available *ad libitum* to all rats throughout the

*Address correspondence to this author at the Area of Neurosciences, Department of Biology of Reproduction, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, Mexico City, Mexico, Zip Code. 09340; Tel/Fax: 52 55 58046559; E-mails: bgomezglez@gmail.com, bgomez@xanum.uam.mx

[#]Both authors contributed equally to the work

Received: April 22, 2013

Revised: May 10, 2013

Accepted: May 15, 2013

experiment. Rats were randomly assigned to the following groups: intact control, 10-day large platform control, and 10-day REM sleep restriction. Because previous reports on blood-brain barrier breakdown after acute stress exposure showed that blood-brain barrier mending occurs rapidly after the end of stress [15], we tested whether brief periods of REM sleep recovery induced a recuperation of normal blood-brain barrier permeability; therefore rats subjected to 10 days of REM sleep restriction were allowed to sleep for 0 minutes (T0, n=5), 40 minutes (T1, n=5), and 120 minutes (T2, n=5) in their home-cage and then tested for blood-brain barrier permeability to Evans blue. Independent experiments were carried out to determine the route used by Evans blue to cross the blood-brain barrier by transmission electron microscopy (n=4) and to show Evans blue deposition inside brain parenchyma by fluorescence microscopy (n=2). Additionally, a fourth independent experiment was carried out to evaluate the loss of each sleep stage induced by the procedure of sleep deprivation, therefore EEG recording was done for 10-day large platform controls (n=4) and 10-day REM sleep restricted rats (n=4). Experiments were carried out following the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research [16].

Materials

For the REM sleep restriction procedure an acrylic water tank (82cm x 59cm x 48cm) and 7cm or 15cm diameter platforms were used. To study blood-brain barrier permeability Evans blue (Sigma, E2129) was used. Quantification of Evans blue extravasation and morphological measures were carried out blind using ImageJ software version 1.44 for Windows [17]. Transmission electron microscopy images were acquired on a JEOL microscope (JEM1200ex II) using a CCD camera (GATA, JEOL), and fluorescence microscopy images were acquired on a Zeiss microscope (AxioImager.A1) using a digital camera (AxioCam MRc), and the AxioVision software version 4.6.3. For EEG recording stainless steel electrodes for cortical recording and silver electrodes for muscle activity were used. EEG recording was performed on the digital polygraph Alice 5 System (Phillips Co.). Statistical tests were carried out using SPSS version 15 for Windows.

Procedure

REM Sleep Restriction

REM sleep restriction was carried out by the multiple platform technique, which deprives selectively REM sleep by caging rats over small platforms (7cm diameter) surrounded by water; rats living in those conditions may be awake and in non-REM sleep, but when they enter REM sleep they lost their muscle tone and fall into the water [18, 19]. The platform technique characteristically involves numerous awakenings during the REM sleep phase, although a slight loss of non-REM sleep is also observed. Because of the full suppression of REM sleep, we deemed the procedure as adequate to investigate the effects of REM sleep loss, as has also been considered previously by others [18, 19]. In the multiple platform technique 3-4 rats belonging to the same socially stable group are simultaneously REM-sleep deprived to avoid social isolation stress [19]. In our

experiment, rats were kept in the conditions of the multiple platform technique during 20 hours daily for 10 consecutive days, allowing them to sleep 4 hours in their home-cages during the last 4 hours of the light phase; in both conditions, REM sleep deprivation and sleep opportunity, rats remained in their socially stable group. Because the platform technique for REM sleep deprivation involves exposure of animals to stressful conditions (e.g. wet environment), the standard internal control involves caging animals in large platforms (15cm diameter) surrounded by water. Large platforms allow the subjects to reach the REM sleep stage and equal stress conditions as REM sleep deprived rats [19]. In our experiment, rats were caged in large platforms during 10 consecutive days following the same schedule as REM sleep restricted rats; in brief, large platform controls were caged 20 hours daily in the large platforms in groups of 3-4 subjects and during the last 4 hours of light phase they were allowed to rest in their home-cages. Intact controls slept *ad libitum* in their home cages during the 10 days of the experiment.

Quantification of Blood-Brain Barrier Permeability to Evans Blue

Evans blue is a vital dye that once in circulation forms stable conjugates with the serum protein albumin; therefore, the passage of Evans blue throughout the blood-brain barrier indicates increased transport of blood-borne proteins [20]. Evans blue administration was performed under sodium pentobarbital anesthesia (ip. 0.063 g/kg body weight) at the end of the 10th day of REM sleep restriction, immediately upon removal of the multiple platform cage (T0), and after brief periods of sleep recovery in the home-cage (40 min - T1, and 120 min -T2). Large platform controls received Evans blue also at the 10th day of caging in the multiple platform technique immediately upon removal of the multiple platform cage; Evans blue was administered to intact controls the same day the experiments were carried on REM sleep restricted rats and large platform controls. Evans blue was diluted at 2% in distilled water and intracardially administered between 9-11 hours. A 5 mm thoracic incision was done on the left side of each subject, the heart was partially exposed, and 0.2mL/100g body weight of Evans blue was administered in the left heart ventricle as previously reported by Gómez-González and Escobar [21]. Evans blue was left in circulation during 10 minutes; heart rate and respiratory movements persisted until the end of that period. At the end of the 10-minute Evans blue circulation period all subjects were perfused with saline solution (0.9%) during 5 minutes at a rate of 15mL/min, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M saline-phosphate buffer during another 5 minutes at a rate of 15mL/min. Brains from all subjects were dissected, post-fixed 24 hours by immersion in the same fixative at 4°C and hand-sectioned into 2 mm coronal sections. Evans blue-stained slices were photographed without magnification with a digital camera (Lumix, Panasonic) under identical artificial light conditions and with the same white background. To verify that all photographs had similar illumination intensity a one-way ANOVA test of the background optical density was carried out; the statistical test revealed that all groups of rats presented equal background illumination ($F_{4,24}=2.308$, $P=0.093$).

Evans blue extravasation was quantitatively analyzed by measuring mean optical density of each of the following brain regions: cingulate gyrus, retrosplenial, orbitofrontal, frontal, insular, rhinal, parietal, somatosensory, visual, auditory, and motor cortices, hippocampus, amygdala, basal nuclei, septal area, thalamus, preoptic area, hypothalamus, cerebellum, and brain stem regions. Regions of interest were identified using landmarks of Paxinos and Watson Atlas [22]. Images of brain slices were acquired in RGB format and then transferred to black/white to quantify the absorbance by optical density using ImageJ software. Color to black/white transformation was carried out using the formula: $\text{Gray} = 0.299(\text{red}) + 0.587(\text{green}) + 0.114(\text{blue})$ by ImageJ software. Optical density was quantified using the calibrated optical density step tablet and the Rodbard function provided by ImageJ software. In a previously validated study, Fry [23] derived an empirical relationship between the amount of Evans blue per unit area (nmol/cm^2) and the optical density; previous reports used that formula to quantify Evans blue concentration in the brain and periphery [21, 24]. Therefore, in the present study Evans blue extravasation was measured in terms of optical density units. To verify Evans blue deposition in brain parenchyma and to discard possible skewness associated to Evans blue remnants in the vessel wall after perfusion, 40 μm brain coronal slices were obtained on a freezing microtome for REM sleep restricted and large platform control groups. Sections were observed in the AxioImager A1 microscope using fluorescence optics with excitation at 546nm and emission at 575-640nm.

Ultrastructure of the Blood-Brain Barrier

To characterize the route of Evans blue extravasation, transmission electron micrographs were obtained from an intact control (n=1), and REM sleep restricted rats at T0 (n=1), T1 (n=1), and T2 (n=1). Between 9-11 hours rats were ip. anesthetized with sodium pentobarbital (0.063 g/kg body weight). Thereafter, rats were perfused with normal saline solution (0.9%) during 5 minutes, followed by 2% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4 during 10 minutes. Brains were removed, hand-sectioned in 2mm thick coronal slices and fixed by immersion in the same fixative during 12 hours at 4°C. After that period, slices containing the hippocampus were rinsed in sodium phosphate buffer and a 1mm³ block containing the CA3 region was obtained. The block was post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were post-stained with heavy metals and observed under a JEOL electron microscope (JEM1200ex II). Ten to fifteen micrographs of brain capillaries (<10 μm diameter) per each subject were obtained, and the density of caveolae (<100nm diameter) per endothelial cell area was quantified using ImageJ software.

EEG Recording

For the surgery to implant electrodes for EEG recording, rats were ip. anesthetized with a cocktail containing ketamine (288.35 mg/mL), xylazine (10 mg/mL), and propiopromazine (0.5g/100mL), at a dose of 1 mL/kg body weight. Four stainless-steel electrodes were placed bilaterally

in the anterior and posterior parietal bone and one in the frontal bone to record EEG activity. Two pairs of silver flexible fine wires were sutured to the dorsal neck muscle for EMG recording. Electrodes were soldered to a connector and attached to the rat's cranium through acrylic dental cement. After the surgical procedure, antibiotic was once administered intramuscularly; rats were allowed a post-surgery recovery of 15 days before EEG recording.

Electrophysiological signals were recorded on the digital polygraph Alice 5 System (Phillips Co). Recordings were displayed at 30 s epochs on a PC; each epoch was visually classified as wakefulness, non-REM sleep and REM sleep [25]. For 3 days before EEG recording, animals were habituated to the polygraph setup; thereafter, a 24-hour basal EEG recording began in all subjects. Animals were randomly assigned to one of two groups: large platform controls (n=4) and REM-sleep restricted rats (n=4). Twenty-four hour EEG recordings were acquired in days 1 and 10 of REM sleep restriction; all groups were recorded during the 20 hours of multiple platform caging and during the 4 hours of sleep opportunity in their home cages.

Statistical Analyses

Because data from all groups fulfilled normality and independence requirements to perform statistical parametric analysis, a mixed ANOVA test was used to compare blood-brain barrier transport of Evans blue among groups. The mixed ANOVA test used experimental groups as between-subjects factor and regions of interest as within-subjects factor. The Huynh-Feldt epsilon ($\epsilon=0.428$) was applied to the degrees of freedom to account for violation of the sphericity assumption in the mixed ANOVA test [26]. The alpha level was maintained at 0.05 in all the ANOVA tests. To reduce the probability of type I statistical error associated with multiple comparisons, pair wise differences between sleep restricted groups and controls were tested on using orthogonal contrasts codes (C_i); contrast coefficients of 1 and -1 were assigned to experimental groups (REM sleep restricted at T0, T1, T2) and control groups, respectively. A one-way ANOVA test was used to compare differences between groups in the sleep parameters obtained during EEG recording, pair wise differences between REM sleep restricted, large platform and intact control groups were also tested by using orthogonal contrasts codes; contrast coefficients of 1 and -1 were assigned to REM sleep restricted group and control groups (large platform and intact controls), respectively.

RESULTS

Quantification of Blood-Brain Barrier Permeability to Evans Blue

This study aimed to evaluate the effect of REM sleep loss and recovery upon blood-brain barrier permeability to Evans blue as an attempt to test the hypothesis proposed by Korth [6] regarding the function of sleep. As it is shown on Figure 1, both control groups, large platform and intact, presented equal null blue staining of the brain ($P>0.05$), proving an intact blood-brain barrier even under conditions of sleep fragmentation characteristic of the large platform control. Chronic REM sleep loss induced by the multiple platform

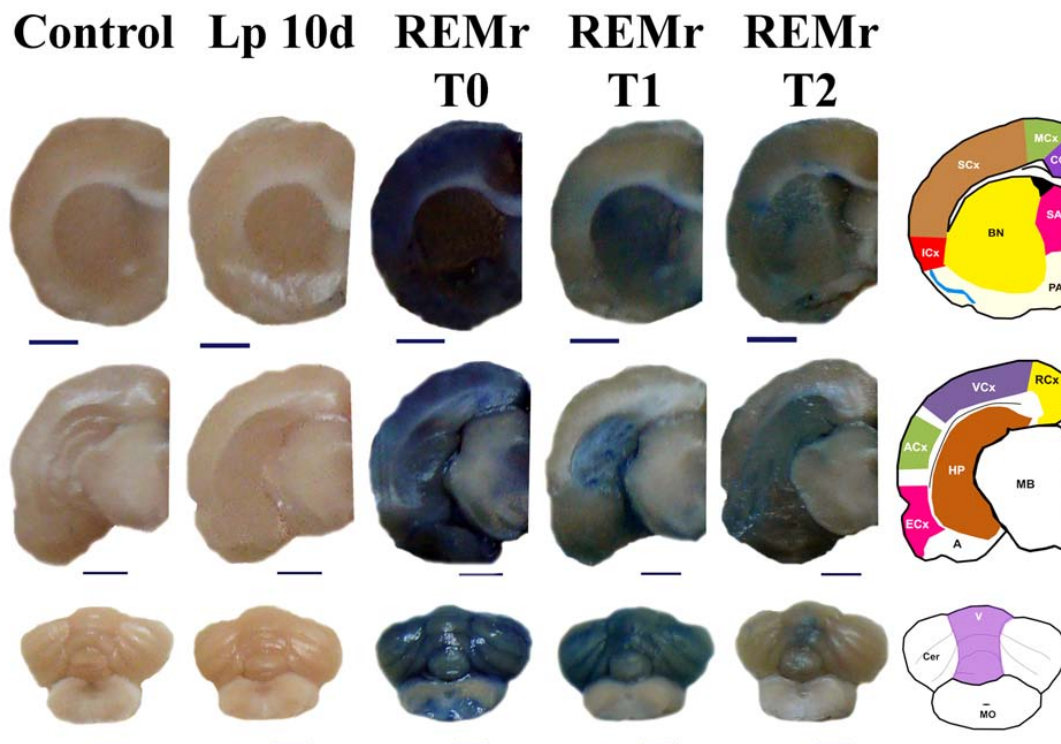


Fig. (1). REM sleep restriction effects upon blood-brain barrier permeability to Evans blue. Photographs of coronal sections of the brain showing changes in blood-brain barrier permeability to Evans blue in the cingulate gyrus (CG), motor (MCx), somatosensory (SCx), insular (ICx), retrosplenial (RCx), visual (VCx), auditory (ACx), and entorhinal cortices (RhCx), hippocampus (HP), basal nuclei (BN), septal (SA) and preoptic areas (PA), midbrain (M), amygdala (A), cerebellum (Cer), vermis (V), and medulla oblongata (MO) of REM sleep restricted rats (REMr) at 0 (T0), 40 (T1) and 120 minutes (T2) of sleep recovery as compared to intact and large platform controls (LP 10d). Scale bar: 25 mm.

technique increased blood-brain barrier permeability to Evans blue almost in the whole brain as compared to both controls (mixed ANOVA test, experimental condition \times region, $F_{9,842-196,838}=1.479$, $P=0.044$). REM sleep restricted rats presented a dark blue staining of all brain regions studied as compared to controls (Fig. 1). Ten-day REM sleep restricted rats presented a $\approx 40\%$ increase in optical density in all brain regions studied as compared to homologous regions of large platform and intact controls (Figs. 2 and 3).

Generally, brief periods of REM sleep recovery induced a progressive recouping of normal blood-brain barrier permeability to Evans blue, although regional differences were observed during the time of sleep opportunity. In several brain regions, sleep recovery induced a gradual decrease in Evans blue staining (Fig. 1). Brain regions at which 120 minutes of sleep opportunity promoted a full recovery of normal blood-brain barrier permeability included the cingulate gyrus, parietal, and insular cortices, hypothalamus, basal nuclei, amygdala, thalamus, septal and preoptic areas (Fig. 2). On the other hand, regions such as the hippocampus, rhinal, somatosensory, motor, auditory, orbitofrontal, and retrosplenial cortices showed a slow reduction in blood-to-brain transport of Evans blue along the period of sleep opportunity in 10-day REM sleep restricted rats, but optical density values were still significantly higher

than both control groups at 120 minutes of sleep recovery ($P<0.05$) (Fig. 3). Finally, in the chronically REM sleep restricted rats there was a group of brain regions whose Evans blue staining was maintained homogeneously high throughout the period of sleep recovery; regions like the olfactory bulb, midbrain, pons, cerebellum, frontal and visual cortices presented similar optical density values from T0 to T2 ($P>0.05$), which were significantly higher than those observed in homologous regions of both large platform and intact controls ($P<0.05$) (Fig. 3). Fluorescence microscopy showed that in REM sleep restricted rats Evans blue accumulated inside the brain parenchyma with some residual dye deposits on the brain vessel network (Fig. 4). As it is shown in Fig. (4), the hippocampus and basal nuclei of a REM sleep restricted rat presented homogeneous red fluorescence as compared to a large platform control, which was characterized by slight Evans blue deposits in brain vessels.

ULTRASTRUCTURE OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER

As it is shown in Fig. (5), REM sleep restriction increased the density of caveolae in hippocampal endothelial cells as compared to the intact control. Fig. (5) shows the mean number of caveolae present in 10-15 capillary profiles of 10-day REM sleep restricted rats in T0, T1 and T2 and in

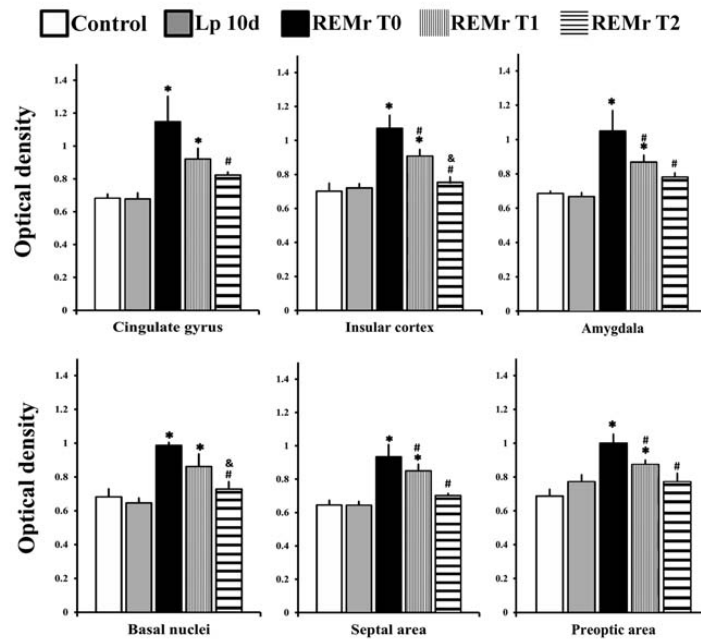


Fig. (2). Regional differences in blood-brain barrier mending associated with REM sleep recovery. Graphs show the magnitude of Evans blue extravasation (optical density units) in some brain regions with full recovery of normal blood-brain barrier permeability after 120 minutes of sleep opportunity at the home cage. mean \pm s.e.m. *significant differences as compared to controls ($p < 0.05$); #significant differences as compared to T0 ($p < 0.05$); âsignificant differences as compared to T1 ($p < 0.05$).

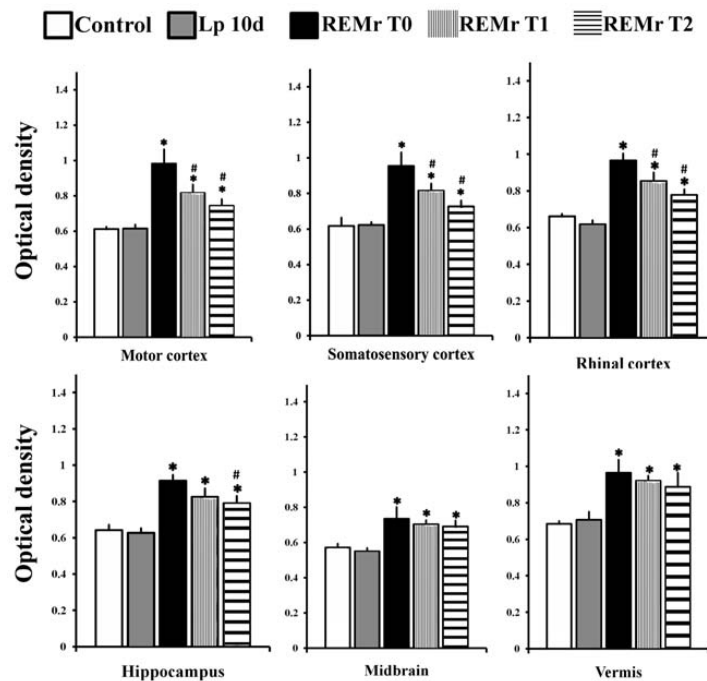


Fig. (3). Regions with poor recovery of normal blood-brain barrier permeability to Evans blue after sleep opportunity. Graphs show the magnitude of Evans blue extravasation (optical density units) in 10-day REM sleep restricted rats at 0, 40, and 120 minutes of sleep recovery as compared to intact and large platform controls. Mean \pm s.e.m. *Significant differences as compared to controls ($p < 0.05$); #Significant differences as compared to T0 ($p < 0.05$).

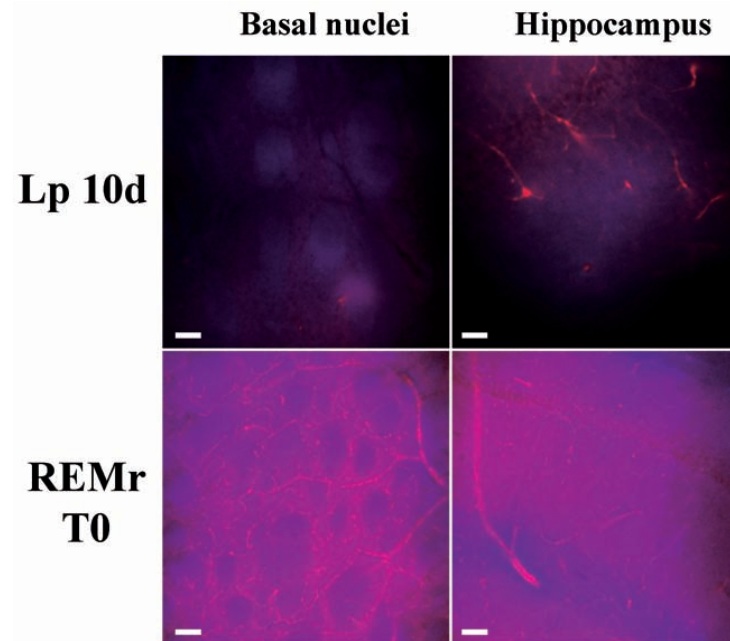


Fig. (4). Fluorescence microscopy of Evans blue extravasation in the brain. Photographs depict Evans blue deposits in brain vessels of a large platform control (Lp 10d) and large Evans blue extravasation and deposition in brain parenchyma of a REM sleep restricted (REMr T0) rat. Note Evans blue accumulation in the extracellular matrix of basal nuclei and hippocampus of a 10-day REM sleep restricted rat. Scale bar: 25 μm .

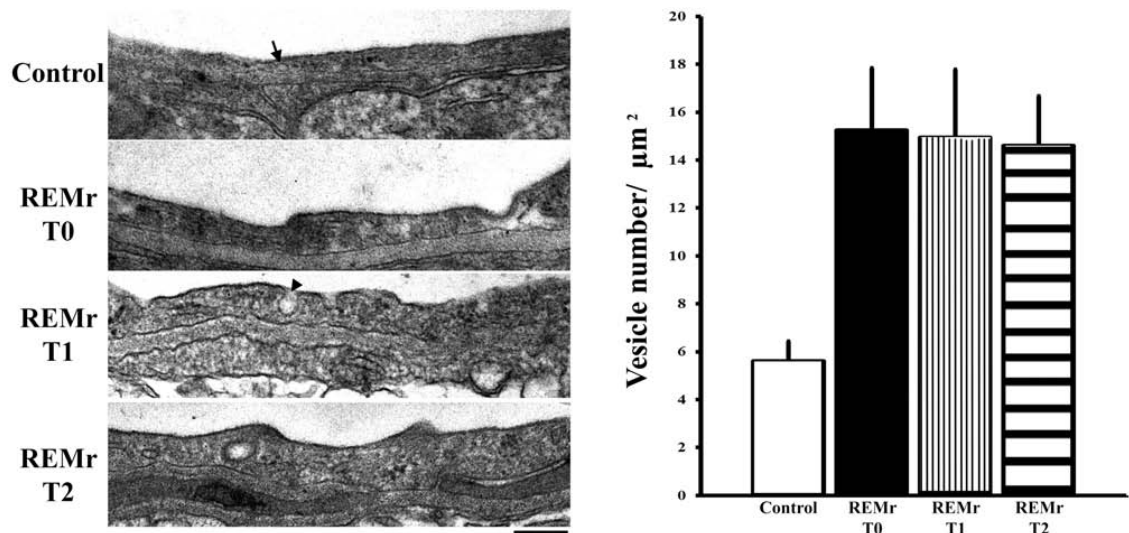


Fig. (5). Chronic REM sleep loss increases caveole density in hippocampal endothelial cells. Transmission electron microscopy of CA3 hippocampal region in the intact control (Control), 10-day REM sleep restricted rat at T0 (REMr T0), 10-day REM sleep restricted rat with 40 minutes of sleep recovery (REMr T1), and 10-day REM sleep restricted rat with 120 minutes of sleep recovery (REMr T2) showing Ω -shaped invaginations (arrowhead) and some plasmalemmal vesicles (arrow) in brain endothelial cells. The graph depicts the quantification of caveolae number per cytoplasmic area (μm^2) in capillary profiles (Control n=10; REMr T0 n=15; REMr T1 n=13; REMr T2 n=12). Mean \pm s.e.m. Scale bar: 250 nm

the intact control. In some microvessel profiles caveolae were seen as Ω -shaped cell-surface invaginations in the luminal wall (Fig. 5 arrowhead), as detached plasmalemmal vesicles near the luminal wall (Fig. 5 arrow) or in the proximity of the abluminal surface of the endothelial cells.

EEG Recording

To ascertain that the observed changes in blood-brain barrier permeability to Evans blue were a consequence of REM sleep loss and recovery, a EEG recording was carried

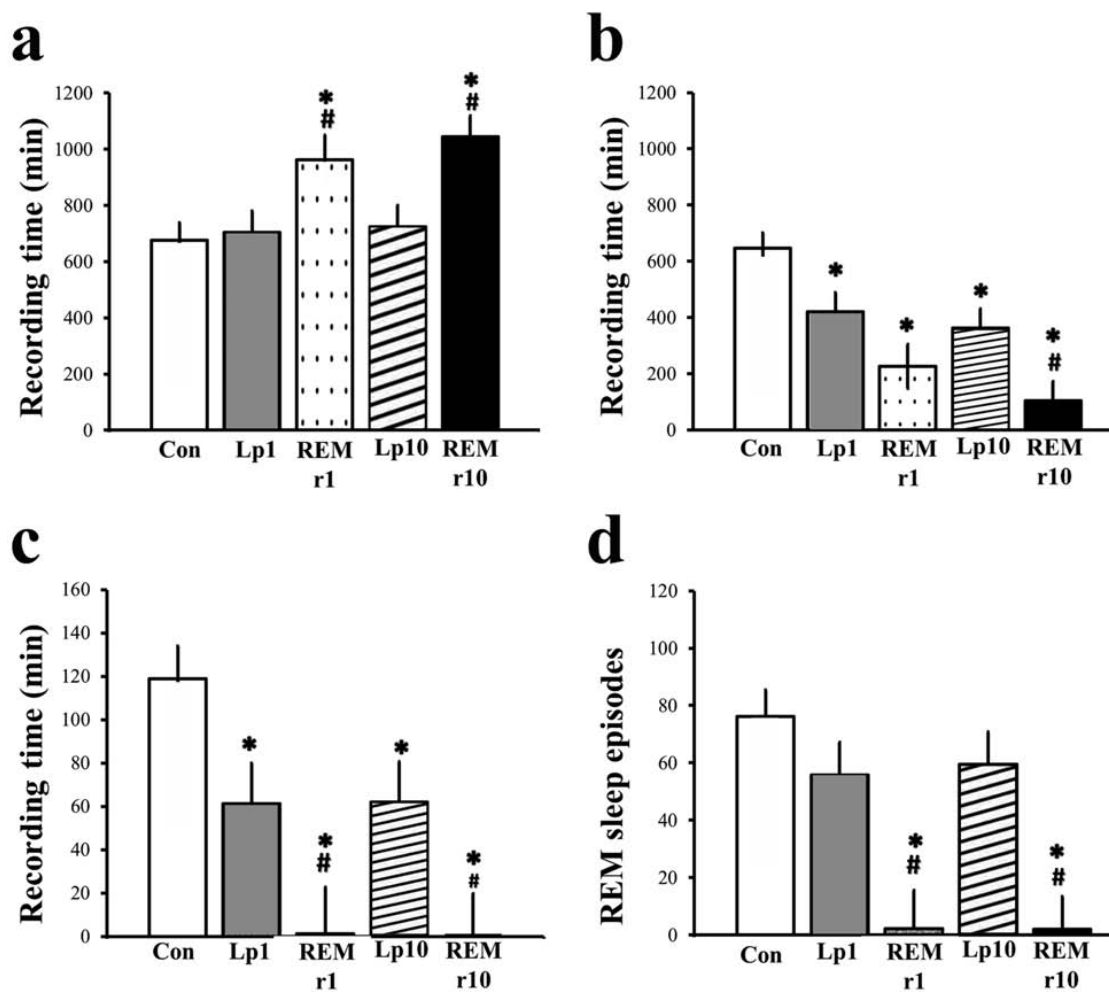


Fig. (6). Changes in sleep pattern during the period of sleep restriction in the multiple platform technique. Graphs show the waking time (a), non-REM sleep time (b), REM sleep time (c), and number of REM sleep episodes (d) in intact controls, large platform controls at days 1 and 10, and REM sleep restricted rats at days 1 and 10. Mean \pm s.e.m. *Significant differences as compared to intact control ($p < 0.05$); #Significant differences as compared to same day large platform controls.

out in the 1st and 10th day of caging in the multiple platform technique in both REM sleep restricted and large platform control groups. As it is shown in Fig. (6a) REM sleep restricted rats presented increased waking time during the 20 hours of caging in the multiple platform technique as compared to large platform and intact controls (one-way ANOVA test, experimental condition $F_{4,20}=5.145$, $P=0.007$). Regarding sleep stages, both large platform controls and REM sleep-restricted rats had diminished durations of non-REM sleep as compared to their basal recordings, although REM sleep-restricted rats had a greater loss of non-REM sleep ($F_{4,20}=10.941$, $P < 0.001$) (Fig. 6b). Only the REM sleep-restricted group showed a full suppression of REM sleep since the first day of caging in the multiple platform technique and the large platform controls presented a stable $\approx 50\%$ reduction in REM sleep duration along the 10 days ($F_{4,20}=8.056$, $P < 0.001$) (Fig. 6c). As shown in Fig. (6d), despite the reduced REM sleep time in the large platform

controls the number of REM sleep episodes was similar to the basal recording, while REM sleep episode number was largely reduced in the REM-sleep restricted group ($F_{4,20}=9.614$, $P < 0.001$).

During the 4-hour sleep opportunity period in the home-cage, both REM-sleep restricted and large platform control rats presented similar durations of non-REM sleep (Fig. 7a); the REM-sleep restricted group presented a trend toward increased REM sleep duration (REM sleep rebound) only in the 10th day of caging in the multiple platform technique as compared to the same-day large platform control ($P > 0.05$) (Fig. 7b). Both groups showed reduced sleep latencies (non-REM and REM sleep latencies) as compared to the intact controls ($F_{4,20}=4.548$, $P=0.011$), and the 10-day REM-sleep restricted rats had a trend toward a shorter REM-sleep latency than their large platform controls ($P > 0.05$) (Figure 7c and 7d). REM sleep latency in the 10th day of caging in the multiple platform technique was reduced to 31.66 ± 10.33 min

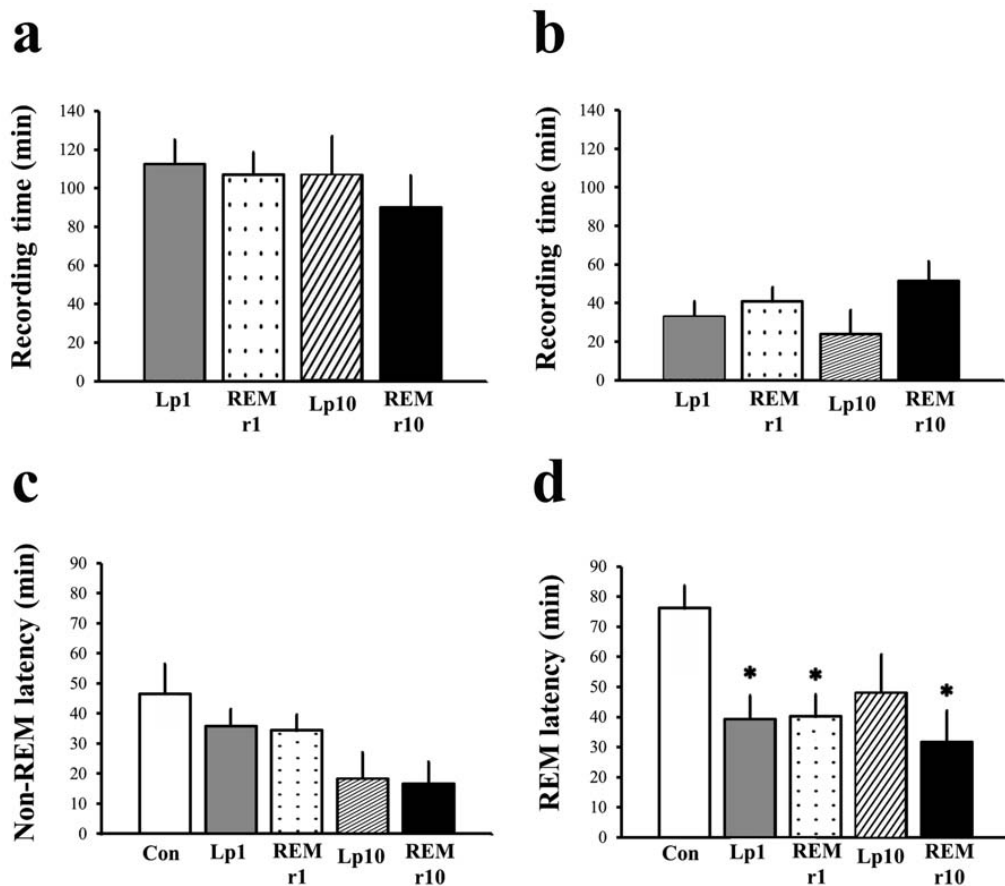


Fig. (7). Changes in sleep pattern during the 4-hour sleep opportunity period. Graphs show the non-REM sleep time (a), REM sleep time (b), non-REM sleep latency (c), and REM sleep latency (d) in intact controls, large platform controls at days 1 and 10, and REM sleep restricted rats at days 1 and 10. Mean \pm s.e.m. *Significant differences as compared to intact controls ($p < 0.05$).

in the REM-sleep restricted rats, and the mean duration of each REM sleep episode was increased from 1.525 ± 0.194 in the intact control and 1.691 ± 0.631 in the 10-day large platform control to 3.422 ± 0.516 in the 10-day REM-sleep restricted rats ($P > 0.05$).

DISCUSSION

This study aimed to elucidate REM sleep function by analyzing the effect of REM sleep loss and recovery upon blood-brain barrier permeability to a vital dye, Evans blue. Chronic REM sleep loss by subjecting rats to a protocol of 20 hours REM sleep deprivation plus 4 hours of sleep opportunity during 10 consecutive days induced a widespread breakdown of the blood-brain barrier in the whole brain. Importantly, periods of only 40 to 120 minutes of sleep opportunity in the home-cage induced a progressive recovery of blood-brain barrier permeability to Evans blue in the majority of brain regions studied; however, other regions presented a prolonged increase in blood-to-brain transfer of Evans blue despite the recovery of sleep. The route of Evans blue extravasation was related to increased caveolae

formation in brain endothelial cells. We showed that caveolae number was maintained constantly high in the hippocampus of REM sleep restricted rats at 0, 40, and 120 minutes of sleep recovery as compared to intact controls, which correlates with the maintenance of blood-brain barrier high permeability to Evans blue in that region, even after REM sleep opportunity. In addition, we showed that the multiple platform technique effectively suppressed REM sleep, and also showed that a slight REM sleep rebound, characterized by a trend toward a shorter latency and a trend toward an increased mean duration of REM sleep episodes, occurred during the period of sleep opportunity; therefore, REM sleep loss and recovery seems to be regulating blood-brain barrier permeability to Evans blue. This is the first time that blood-brain barrier function after REM sleep loss is studied and the findings here described confirm the putative blood-brain barrier-sleep relationship hypothesized by Korhonen more than 15 years ago [6].

Classically, the multiple platform technique has been shown to abolish REM sleep and reduce non-REM sleep time up to 30% over the first 24 hours; while large platform

controls present variable loss of REM sleep and around 30% reduction in non-REM sleep [19]. Those studies have also shown that after REM sleep deprivation a REM sleep rebound is observed, while large platform controls present a smaller REM sleep rebound without changes in non-REM sleep [19]. Similar to our findings, Machado et al. [27] found that REM sleep restriction during 21 days in a protocol of 18 hours in the multiple platform technique plus 6 hours of sleep opportunity in the home-cage, induced a slight REM sleep rebound during the daily 6 hours of sleep opportunity; in that study the REM sleep rebound was characterized by a trend toward a shorter REM sleep latency, an increased percentage of REM sleep, and an increased duration of REM sleep episodes beginning on day 5 of REM sleep restriction [27]. Because our REM sleep restricted rats presented full suppression of REM sleep and a REM sleep rebound on day 10, it is reasonable to assume that REM sleep full suppression and not sleep fragmentation with slight REM sleep reduction (observed in the large platform controls) accounts for the increased blood-brain barrier permeability to Evans blue.

Evans blue is a vital dye that bounds albumin when intravenously administered, therefore its passage from blood-to-brain signals the increased transport rate of albumin and other serum proteins like pro-thrombin and plasminogen [20]. Albumin is transported by adsorptive endocytosis through brain endothelial cells [28]; indeed we showed that REM sleep restriction increased pinocytotic vesicle density in hippocampal endothelial cells. Under normal physiological conditions caveolae density is around 5 vesicles/ μm^2 and chronic REM sleep loss increased caveolae density until levels observed in peripheral endothelial cells (15-20 vesicles/ μm^2) [29]. It seems that increased caveolae formation is a common mechanism underlying altered blood-brain barrier permeability by several conditions, such as chronic stress [30, 31], hyperthermia [32], acute brain injury [33], and metabolic diseases [34]. All those altered physiological conditions and sleep loss share a common inflammatory component [35, 36]. Several studies report that sleep loss upregulates molecules that may induce blood-brain barrier breakdown, including blood-flow modulators, growth factors, and inflammatory mediators; sleep loss has been shown to increase levels of endothelin-1 [37], C-reactive protein (CRP) [38], vascular endothelial growth factor (VEGF) [39], and the pro-inflammatory cytokines interleukin 1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-17 and tumor necrosis factor α (TNF α) [40].

The diversity in the regional recovery pattern of blood-brain barrier integrity after brief periods of sleep opportunity may be related to regional differences in the susceptibility to canonic molecules that participate in blood-brain barrier disruption after REM sleep restriction. Moreover, regional differences in blood-brain barrier breakdown and recovery may also arise from differences in cerebral blood-flow between brain regions; indeed, along the sleep/wake cycle local cerebral blood-flow varies from one stage to another. During REM sleep the high electrical brain activity is accompanied by concurrent changes in cerebral blood-flow [41]. In addition, a recent study shows that sleep restriction decreases cerebral blood-flow with differences from one brain region to another in humans [42].

Increased caveolae formation may promote the leakage of molecules such as albumin, pro-thrombin, plasminogen, and glutamate from blood to brain [28]; molecules that once in the brain parenchyma may induce epileptiform activity [9], neuronal apoptosis [8], and promote activation of both microglial and astroglial cells [9, 10]. The altered brain homeostasis induced by the blood-brain barrier breakdown to circulating molecules may thus constitute the underlying mechanism by which REM sleep deprivation decreases neurogenesis in the hippocampus [11, 12], induces neuronal cell death in the sleep-related brain stem nuclei [14], increases glutamate concentration in brain parenchyma [13], and alters learning and other behavioral processes in both rodents and humans [43]. In conclusion, this study clearly shows that REM sleep regulates the physical and chemical barrier properties of the blood-brain barrier.

LIST OF ABBREVIATIONS

Abbreviations in the Manuscript

EEG	=	electroencephalography
IL	=	interleukin
REM	=	rapid eye movement sleep
TNF	=	tumor necrosis factor

Abbreviations in the Figures

CG	=	Cingulate gyrus
MCx	=	Motor cortex
SCx	=	Somatosensory cortex
ICx	=	Insular cortex
RCx	=	Retrosplenial cortex
VCx	=	Visual cortex
ACx	=	Auditory cortex
RhCx	=	Entorhinal cortex
HP	=	Hippocampus
BN	=	Basal nuclei
SA	=	Septal area
PA	=	Preoptic area
M	=	Midbrain
A	=	Amygdala
Cer	=	Cerebellum
V	=	Vermis of cerebellum
MO	=	Medulla oblongata
REMr	=	REM sleep restriction

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Edith Monroy for her expert review of the language of the manuscript.

To Dr. José David Sepúlveda and Jorge Sepúlveda for their valuable help in processing hippocampal blocks for transmission electron microscopy and for their valuable help in the acquisition of the transmission electron microscopy images.

To Dr. Fernando García Hernández for kindly providing access to the Microscopy Laboratory of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

To Dr. Guadalupe Flores Cruz for kindly providing access to the epifluorescence microscope in the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Partially supported by Grant 14412025 from CONACyT-SEP to BGG and by CONACyT master fellowship to GHA.

REFERENCES

- [1] Siegel JM. Do all animals sleep? *Trends Neurosci* 2010; 31: 208-213.
- [2] Datta S, MacLean RR. 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.
- [3] Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep* 2002; 25: 18-24.
- [4] Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 1989; 12: 68-87.
- [5] Gómez-González B, Domínguez-Salazar E, Hurtado-Alvarado G, *et al.* Role of sleep in the regulation of immune system and the pituitary hormones. *Ann NY Acad Sci* 2012; 1261: 97-106.
- [6] Korth C. A co-evolutionary theory of sleep. *Med. Hypoth* 1995; 45: 304-310.
- [7] Gómez-González B, Sánchez-Alegria K, Velázquez-Moctezuma J. From blood-to-brain: regulating the permeability of the blood-brain barrier. *Curr. Psychopharmacol* 2012; 1: 214-227.
- [8] Gingrich MB, Traynelis SF. Serine proteases and brain damage – is there a link? *Trends Neurosci* 2000; 23: 399-407.
- [9] Tomkins O, Friedman O, Ivans S, *et al.* Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Dis* 2007; 25: 367-377.
- [10] Hooper C, Pinteaux-Jones F, Fry VAH, *et al.* Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *J Neurochem* 2009; 109: 694-705.
- [11] Guzman-Marin R, Suntsova N, Bashir T, Nienhuis R, Szymusiak R, McGinty D. Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep* 2008; 31: 167-175.
- [12] Mueller AD, Pollock MS, Lieblich SE, Epp JR, Galea LA, Mistlberger RE. Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: 1693-1703.
- [13] Mohammed HS, Aboul HS, Khadrawy YA, Noor NA. Neurochemical and electrophysiological changes induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Behav Brain Res* 2011; 225: 39-46.
- [14] Biswas S, Mishra P, Mallick BN. Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience* 2006; 142: 315-331.
- [15] Esposito P, Gheorghe D, Kandere K, *et al.* Acute stress increases permeability of the blood-brain barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res* 2001; 888: 117-127.
- [16] National Research Council. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. Washington DC: The National Academies Press, 2010.
- [17] Rasband WS. ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2010, available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/1997-2010>.
- [18] Coenen AM, van Luitelaar EL. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiol Behav* 1985; 35: 501-504.
- [19] Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 2004; 1004: 45-51.
- [20] Freedman FB, Johnson JA. Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. *Amer J Physiol* 1969; 216: 675-681.
- [21] Gómez-González B, Escobar A. Altered functional development of the blood-brain barrier after early life stress in the rat. *Brain Res. Bull* 2009; 79: 376-387.
- [22] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press-Elsevier, San Diego, 1998.
- [23] Fry DL. Aortic Evans blue dye accumulation: its measurement and interpretation. *Amer J Physiol* 1977; 232: H204-H222.
- [24] LaMack JA, Himborg HA, Friedman HM. Effect of hypercholesterolemia in transendothelial EBD-albumin permeability and lipid accumulation in porcine iliac arteries. *Atherosclerosis* 2006; 184: 255-263.
- [25] Timo-laria C, Negrao N, Schmidek WR, *et al.* Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav* 1970; 5: 1057-62.
- [26] Huck SW. Fully repeated measures analyses of variance. In: Huck SW, Ed. *Reading statistics and research*. New York: Longman, 2000, pp. 467-500.
- [27] Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Comparison of the sleep pattern throughout a protocol of chronic sleep restriction induced by two methods of paradoxical sleep deprivation. *Brain Res. Bull* 2006; 70: 213-220.
- [28] Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729-736.
- [29] Nag S. Morphology and properties of brain endothelial cells. *Methods Mol Biol* 2011; 686: 3-47.
- [30] Nag S, Kapadia A, Stewart DJ. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 3-23.
- [31] Sharma HS, Westman J, Navarro JC, Dey PK, Nyberg F. Probable involvement of serotonin in the increased permeability of the blood-brain barrier by forced swimming. An experimental study using Evans blue and 131I-sodium tracers in the rat. *Behav Brain Res* 1995; 72: 189-196.
- [32] Gómez-González B, Escobar A, Merchant-Larios H. Increased transvascular transport of WGA-peroxidase after chronic perinatal stress in the hippocampal microvasculature of the rat. *Int. J. Devel. Neurosci* 2011; 29: 839-846.
- [33] Kiyatkin EA, Sharma HS. Permeability of the blood-brain barrier depends on brain temperature. *Neurosci* 2009; 161: 926-939.
- [34] Acharya NK, Levin EC, Clifford PM, *et al.* Diabetes and hypercholesterolemia increase blood-brain barrier permeability and brain amyloid deposition: beneficial effects of the LpPLA2 inhibitor Darapladib. *J Alzheimers Dis* 2013; 35: 179-198.
- [35] Jaiswal MK, Mallick BN. Prazosin modulates rapid eye movement sleep deprivation-induced changes in body temperature in rats. *J Sleep Res* 2009; 18: 349-56.
- [36] Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK. Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 51: 294-302.
- [37] Weil BR, Mestek ML, Westby CM, *et al.* Short sleep duration is associated with enhanced endothelin-1 vasoconstrictor tone. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88: 777-781.
- [38] Jackowska M, Kumari M, Steptoe A. Sleep and biomarkers in the English Longitudinal Study of Ageing: Associations with C-reactive protein, fibrinogen, dehydroepiandrosterone sulfate and hemoglobin. *Psychoneuroendocrinology* 2013 (in press) doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.12.015.
- [39] Ibrahim L, Duncan W, Luckenbaugh DA, Yaun P, Machado-Vieira R, Zarate CA Jr. Rapid antidepressant changes with sleep deprivation in major depressive disorder are associated with changes in vascular endothelial growth factor (VEGF): a pilot study. *Brain Res Bull* 2011; 86: 129-133.

REM Sleep Regulates Blood-Brain Barrier Function*Current Neurovascular Research*, 2013, Vol. 10, No. 3 207

- [40] Yehuda S, Sredni B, Carasso RL, Kenigsbuch-Sredni D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J Interf Cytok Res* 2009; 29: 393-398.
- [41] Abrams RM, Post JC, Burchfield DJ, Gomez KJ, Hutchison AA, Conlon M. Local cerebral blood flow is increased in rapid-eye-movement sleep in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 278-81.
- [42] Poudel GR, Innes CR, Jones RD. Cerebral perfusion differences between drowsy and nondrowsy individuals after acute sleep restriction. *Sleep* 2012; 35: 1085-96.
- [43] Meerlo P, Sgoifo A, Suchecki D. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med Rev* 2008; 12: 197-210.

El presente trabajo fue realizado principalmente en el Área de Neurociencias del Departamento de Biología de la Reproducción en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 266049 CVU: 420918

Miembros del Jurado**Dra. Beatriz Gómez González**

Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.

Dr. Lenin Pavón Romero

Departamento de Psicoimmunología, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente". México D. F. México.

Dr. Emilio Domínguez Salazar

Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.

Dra. Janet Murbartián Aguilar.

Departamento de Farmacología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Sede Sur.

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.

Miembros del Comité Tutorial

Director: Dr. Javier Velázquez Moctezuma

*Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.*

Asesor interno: Dra. Beatriz Gómez González

*Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D. F. México.*

Asesor externo: Dr. Lenin Pavón Romero

*Departamento de Psicoimmunología, Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la
Fuente”. México D. F. México.*

A toda mi familia, en especial a mis padres Estela y Gustavo, a mis hermanos
Alexandra, Gustavo, Citlalli y Bryan.

A las nuevas generaciones Bryan Francisco, Erick Fernando, José Arturo, Diana
Celic, Tristhan, Sayuri, Taili, Salvador y Daniel.

*A los que piensan que el conocimiento adquiere su verdadero valor cuando se
comparte.*

Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto titulado: Regulación funcional y estructural de la barrera hematoencefálica dependiente del ciclo sueño/vigilia, financiado por CONACyT (Número de convenio CB-2012-01 180792) a cargo de la Dra. Beatriz Gómez González.

A la Dra. Beatriz Gómez por su invaluable aportación a mi desarrollo profesional y personal, por inspirar con el ejemplo la pasión por la investigación científica, por asesorarme ardua y acertadamente en el tema que más me apasiona, la barrera hematoencefálica.

Al Dr. Javier Velázquez Moctezuma por su valiosa contribución a mi desarrollo académico y por compartir su gran experiencia en el área de Neurociencias, particularmente en el estudio de Sueño.

Al Dr. Lenin Pavón Romero por su invaluable contribución a mi formación académica durante un año de rigurosas y productivas asesorías en el área de la inmunología.

Al Dr. Emilio Domínguez Salazar, cuyos comentarios, sugerencias y enseñanzas en el área de biología molecular y conducta sexual contribuyeron significativamente a mejorar mi desarrollo académico y personal.

A la Dra. Janet Murbartián Aguilar por su valiosa ayuda en la realización de la técnica de Western blot y por proveer gentilmente las instalaciones de su laboratorio en el departamento de Farmacología del Cinvestav Sede Sur.

A José Sepúlveda y Jorge Sepúlveda por su valiosa ayuda técnica en el procesamiento de tejidos para microscopia electrónica de transmisión en el laboratorio de microscopia de la UAM-I.

A Fernando García Hernández por proveer el acceso al laboratorio de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Al Dr. José Ángel Rojas Zamorano, al Mtro. Rafael Santana y al Lic. Enrique Esqueda por su valioso apoyo en la realización de cirugías para el implante de electrodos, registro polisomnográfico y calificación de registros polisomnográficos en ratas.

Al profesor Joaquín Herrera Muñoz por su invaluable contribución a mi formación académica, por su ejemplo de investigador, docente y gran amigo.

Al profesor Carlos Kerbel Lifshitz por sus valiosos consejos a nivel profesional y personal.

Al Maestro Francisco Javier Olvera Ramírez por su apoyo moral y amistad.

A mi familia por siempre confiar en mí y entender las ausencias constantes.

A mi familia de laboratorio: Hishan, Emma, Lety, Phany, Isra, Anabel, Andrea y Fede por el cariño y porque de cada uno aprendo cosas muy valiosas. En especial a Adrián Cabañas por su amistad, por todo lo vivido y por compartir la pasión por la ciencia conmigo.

A Guillermo Cordero García y Adrián Zepeda por su amistad e incondicional apoyo, por los momentos de desestrés y porque este es su momento.

A mis compañeros de maestría Luis Maciel, Rebeca Martínez, Prisca Bustamante y Marcela Domínguez por el apoyo académico y por brindarme su amistad.

A Joana, Julio y Rodrigo por ser claro ejemplo de las cosas que realmente valen la pena.

A mis amigos Nelly, Brisa, Manuel, Erick, Miguel, Verónica, Antonio y Margarita por su comprensión en toda esta etapa.

Tabla de Contenido

	Página
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
La barrera hematoencefálica.....	14
Las células endoteliales.....	19
Cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	23
La pérdida de sueño.....	24
ANTECEDENTES.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	28
OBJETIVOS.....	29
HIPÓTESIS.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
Animales experimentales.....	30
Restricción de sueño.....	30
Estudio de la ultraestructura de la barrera hematoencefálica.....	32
Determinación de la expresión de proteínas características de la unión ocluyente de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.....	33
Registro polisomnográfico.....	37
Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	53

CONCLUSIÓN..... 59

REFERENCIAS..... 60

RESUMEN

La barrera hematoencefálica es un sistema constituido de células endoteliales, astrocitos, pericitos y microglia que mantienen la homeostasis del sistema nervioso central. Todos los elementos de la barrera hematoencefálica son importantes para el funcionamiento del sistema pero las células endoteliales le confieren las propiedades físicas y químicas de barrera. Las células endoteliales no presentan fenestraciones y exhiben bajo tráfico de vesículas pinocíticas. Asimismo, el paso de moléculas solubles de la sangre hacia el cerebro por la vía paracelular está restringido debido a la presencia de uniones ocluyentes. La ruptura de la barrera hematoencefálica promueve la entrada masiva de moléculas potencialmente neurotóxicas de la sangre hacia el cerebro, las cuales pueden ocasionar muerte neuronal y subsecuentemente alteraciones cognitivas. Estudios previos mostraron que la restricción selectiva de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) durante 10 días incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en todo el cerebro y, breves periodos de oportunidad para dormir (40-120min) restablecen la permeabilidad normal de la barrera en la mayoría de las regiones cerebrales. El hipocampo es una región cerebral que no recupera la permeabilidad normal de la barrera hematoencefálica después de los periodos de recuperación de sueño; sin embargo se desconoce el mecanismo por el que la pérdida de sueño induce ruptura de la barrera hematoencefálica. Así, el objetivo del presente trabajo fue dilucidar los mecanismos inespecíficos por los cuales la restricción de sueño MOR incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el hipocampo de la rata. Se evaluó la ultraestructura de las

células endoteliales del hipocampo por microscopía electrónica de transmisión y se determinó la expresión de proteínas de la unión ocluyente (Claudina-5, ocludina y ZO-1) por Western blot. La restricción de sueño MOR incrementó el número de vesículas pinocíticas (3 veces más en comparación con los controles) y promovió que las uniones ocluyentes de las células endoteliales del hipocampo sean menos complejas con respecto a las uniones ocluyentes de los grupos control, incluso después de periodos de recuperación de sueño. Concomitante a la reducción de la complejidad de las uniones ocluyentes, la restricción de sueño MOR disminuyó la expresión de proteínas de la unión ocluyente, particularmente Claudina-5. La restricción de sueño MOR altera los mecanismos de transporte inespecífico promoviendo la ruptura de la barrera hematoencefálica. Los resultados sugieren que el sueño MOR es crucial para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica. Las disfunciones asociadas a la pérdida de sueño pueden ser explicadas por cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

ABSTRACT

The blood-brain barrier is a complex system that maintains central nervous system homeostasis. Brain endothelial cells, pericytes, astrocytes, and microglia comprise the blood-brain barrier. All components are crucial for blood-brain barrier development and maintenance; however endothelial cells confer the physical and chemical barrier properties. Brain endothelial cells exhibit low pinocytotic trafficking and express tight junction proteins. Under pathological conditions, blood-brain barrier disruption promotes massive entrance of potential neurotoxic molecules from blood to brain, which may cause cognitive deficits. Recently, we reported that selective rapid eye movement (REM) sleep restriction during 10 days increased blood-brain barrier permeability to an unspecific vital dye Evans blue in the whole brain, and that brief sleep periods (40-120 min) restored normal blood-brain barrier permeability in almost all brain regions. Hippocampus is unable to recover the blood-brain barrier integrity after REM sleep restriction even with sleep opportunity periods, but the mechanism of blood-brain barrier breakdown is unknown. Therefore, the aim of this work was to elucidate the mechanism involved in the hippocampal hyperpermeability after REM sleep restriction and sleep opportunity periods. We evaluated the ultrastructure of endothelial cells by transmission electron microscopy and tight junction protein expression (Claudin-5, occludin and ZO-1) by western blot. REM sleep restriction increases the pinocytotic vesicle number (3-fold higher than intact controls) and promotes reduction in tight junction complexity. Concomitant to tight junction complexity, REM sleep restriction diminishes tight junction protein expression, mainly Claudin-5. REM sleep

restriction impairs unspecific transport systems, promoting blood-brain barrier disruption. Our data suggests that REM sleep is crucial to maintain the blood-brain barrier integrity. Impairments associated to sleep loss may be explained by blood-brain barrier hiperpermeability.

INTRODUCCIÓN

“Brain must respond to many blood-borne signals but has not direct access to them”

Clifford B. Saper

El sistema nervioso central, constituido por la médula espinal y el encéfalo, lleva a cabo procesos cognitivos y autonómicos vitales para el organismo. Cada región encefálica recibe y procesa estímulos externos y propios promoviendo así el reconocimiento del entorno y de su medio interno para la ejecución de conductas adaptativas. Al igual que otros órganos, el encéfalo es un conjunto de diversos tipos celulares que funcionan de manera dinámica y coordinada. El encéfalo es el órgano maestro que controla procesos básicos como la respiración o la frecuencia cardíaca y orquesta respuestas motoras y sensoriales. Además, el encéfalo es responsable de una serie de procesos cognitivos complejos como la memoria, el aprendizaje y el raciocinio; por ende, la demanda energética del sistema nervioso central es alta y el encéfalo tiene prioridad para recibir un continuo e idóneo aporte de nutrientes; sin embargo, dado que el encéfalo debe tener mecanismos estrictos de protección, el parénquima cerebral está aislado de la circulación sanguínea.

La barrera hematoencefálica

En 1885 el científico alemán Paul Ehrlich descubrió que la administración intracardiaca de un colorante vital en animales resulta en la coloración de todo el cuerpo con excepción del encéfalo, la médula espinal, la retina y las gónadas. En

un principio, Ehrlich atribuyó estos hallazgos a la falta de afinidad de los tejidos al colorante (Ehrlich, 1885). Casi treinta años después Edwin Goldmann, alumno de Ehrlich, presentó datos contundentes de que la administración de azul tripano por vía intratecal (directamente en el líquido cefalorraquídeo) tiene el efecto contrario, el encéfalo y la médula espinal se tiñen mientras que el resto de cuerpo no, sugiriendo así la presencia de una barrera física entre la sangre y el sistema nervioso central (Goldmann, 1913). Lewandowsky en el año de 1900 estudió el límite de permeación del ferrocianato de potasio en el encéfalo, observó que este compuesto no se localizaba en el parénquima cerebral pero si se observaba en la región luminal de los capilares. En base a sus observaciones Lewandowsky acuñó el término de “barrera hematoencefálica” (Lewandowsky, 1900). El uso de la microscopia electrónica de transmisión permitió determinar la localización de la barrera hematoencefálica al administrar por vía intracardiaca peroxidasa de rábano o nitrato de plata. Los hallazgos describen que estos trazadores se depositan en la región luminal de los capilares y en una muy baja cantidad dentro de vesículas pinocíticas pero no dentro del parénquima cerebral, atribuyendo la ubicación de la barrera hematoencefálica a la microvasculatura cerebral (Dempsey & Wislocki, 1955; Reese & Karnovsky, 1967).

El término de “barrera” indica dos connotaciones importantes: como barrera “física” tiene la propiedad de evitar el paso al encéfalo de moléculas hidrosolubles potencialmente tóxicas que están circulantes en la sangre, y como barrera “química” presenta una permeabilidad baja y pasiva para los nutrientes solubles en agua que requiere el tejido nervioso (e. g. oxígeno, aminoácidos y glucosa)

(Oldendorf, 1973; Davson, 1976; Abbott et al., 2005; Abbott et al., 2010), manteniendo así la homeostasis del sistema nervioso central (Abbott et al., 2005; Persidsky et al., 2006; Ueno, 2007). En el encéfalo, las únicas regiones que carecen de barrera hematoencefálica son el plexo coroideo y los órganos circunventriculares (e. g. la glándula pineal, la hipófisis, la eminencia media y el área postrema), dado que regulan el intercambio hormonal o se consideran regiones quimiorreceptoras (Abbott, 2005).

A los estudios clásicos que ubicaban a la barrera hematoencefálica en la microvasculatura encefálica, se sumaron investigaciones que definían a la barrera hematoencefálica como un sistema complejo constituido de diversos tipos celulares: células endoteliales, astrocitos, pericitos y microglia, así como sus derivados de matriz extracelular: lámina basal y glicocalix (Abbott et al., 2010; Lourenço et al., 2010) (Figura 1). Todos los elementos de la barrera hematoencefálica forman parte de la denominada unidad neurovascular junto con las neuronas, de tal modo que las neuronas y la glía pueden regular la función de los vasos sanguíneos en respuesta a requerimientos metabólicos (Persidsky et al., 2006). Todos los componentes de la barrera hematoencefálica son necesarios para mantener el desarrollo y la integridad del sistema (Hawkins & Davis, 2005; Lourenço et al., 2010).

Los astrocitos son células gliales que se asocian a los capilares encefálicos mediante prolongaciones citoplasmáticas denominadas pies perivasculares, además de remover aminoácidos excitatorios del espacio intersticial, los astrocitos contribuyen al mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica

mediante la liberación a la lámina basal de señales químicas que modulan la permeabilidad de las células endoteliales, por ejemplo citocinas proinflamatorias, purinas (ATP) y óxido nítrico (NO) (Abbott, 2002).

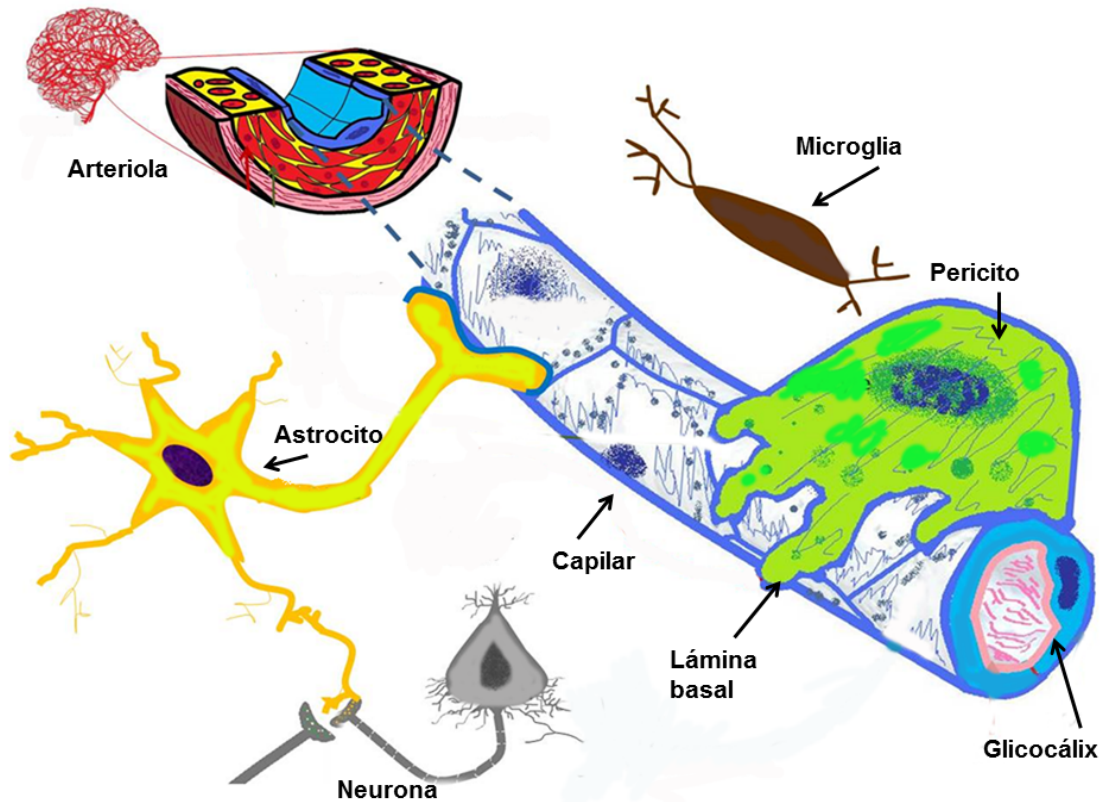


Figura 1. Componentes de la barrera hematoencefálica que junto con las neuronas constituyen la unidad neurovascular. Modificado de Gómez-González et al. (2012).

Los pericitos son células de origen mesodérmico que se adosan a los capilares encefálicos mediante un gran número de procesos citoplasmáticos y que están embebidos completamente en la lámina basal. Al igual que los astrocitos, los pericitos son importantes para el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y

tienen un papel crucial en el desarrollo embrionario de la misma. Los pericitos regulan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debido a sus propiedades vasoconstrictoras y a su capacidad de presentar antígenos y producir mediadores inflamatorios (Guillemin et al., 2004; Armulik et al., 2005; Kovac et al., 2011).

A diferencia de los astrocitos y los pericitos, la microglia no presenta una estrecha proximidad a las células endoteliales; sin embargo se considera la primera línea de defensa, ya que son macrófagos residentes del sistema nervioso central. La microglia media la respuesta inmunológica del sistema nervioso central, puede presentar antígenos y su fenotipo se modifica en respuesta a cambios en el microambiente cerebral, adquiriendo propiedades fagocíticas para la remoción de fuentes tóxicas (Persidsky et al., 2006; Zlokovic, 2008).

Además de las interacciones célula-célula, los componentes de la barrera hematoencefálica se comunican a través de mediadores químicos. Las moléculas secretadas por las células endoteliales, pericitos, microglia y astrocitos (incluso por neuronas) regulan el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (e. g. neurotransmisores, hormonas, citocinas, NO y purinas) (Abbott, 2002; Ballabh et al., 2004; Zlokovic, 2008). Los cambios neuroquímicos regulan el fenotipo de la barrera hematoencefálica en función de la actividad neuronal y sistémica, dependientes de condiciones fisiológicas o patológicas (e. g. concentraciones elevadas de neurotransmisores excitatorios o respuesta inflamatoria mediada por citocinas) (Ballabh et al., 2004; Persidsky et al., 2006; Zlokovic, 2008). La contribución de mediadores solubles provenientes de los componentes de la barrera hematoencefálica es crucial para mantener la comunicación e integridad

del sistema, la deficiencia de uno o varios elementos conlleva a cambios en la permeabilidad de solutos hacia el microambiente nervioso que pueden perjudicar la óptima función neuronal (Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010; Lourenço et al., 2010). Si bien no se puede prescindir de ningún componente de la barrera hematoencefálica, la propiedad de barrera físico-química del sistema se atribuye primordialmente a las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, en particular a la compleja y estrecha relación entre el bajo transporte de vesículas pinocíticas y la presencia de uniones ocluyentes (Reese & Karnovsky, 1967).

Las células endoteliales

El encéfalo exhibe una gran red de capilares dada la alta demanda energética. La superficie de capilares empleados para el transporte molecular en el encéfalo de un humano es de aproximadamente 20m² (Begley & Brightman, 2003). Los capilares encefálicos están compuestos de una monocapa de células endoteliales, y tienen un diámetro aproximado de 10µm de diámetro (Peters et al., 1991).

La célula endotelial cerebral presenta paredes continuas y delgadas (500nm de grosor) que se elongan en la región del núcleo con espesor de entre 200 y 300nm (Zlokovic, 2008). La lámina basal que rodea a la célula endotelial también es continua y presenta un espesor de entre 30 y 40nm (Dempsey & Wislocki, 1955). El núcleo puede observarse más bien aplanado y con un arreglo de cromatina homogéneo; la heterocromatina se localiza principalmente en la periferia mientras que la eucromatina tiende a estar en el centro del núcleo. El aparato de Golgi se encuentra cerca del núcleo en posición paralela a la membrana plasmática. La célula endotelial tiene un alto número de mitocondrias en comparación con el

endotelio no neural y, éstas se localizan adyacentes al núcleo aunque ocasionalmente pueden presentarse distribuidas en el citoplasma. La presencia de filamentos de actina puede estar relacionada con la apariencia granular del citoplasma de la célula endotelial. Los ribosomas no son prominentes en la célula endotelial de los capilares encefálicos y el retículo endoplásmico rugoso se distingue en la membrana nuclear externa. La presencia de vesículas pinocíticas en las células endoteliales cerebrales es de aproximadamente 5 vesículas/ μm^2 , es decir son hasta 20 veces menos que en los capilares de otros órganos (e. g. El endotelio cardiaco) (Dempsey & Wislocki, 1955; Peters, Palay & Webster, 1991). La baja actividad pinocítica junto con la carencia de fenestraciones son propiedades que limitan el tráfico transcelular en el endotelio encefálico. La presencia de vesículas pinocíticas en diversos tejidos, incluyendo el endotelio, se identificó hace más de 50 años mediante microscopia electrónica (Palade, 1953). Las vesículas pinocíticas se pueden clasificar en dos tipos: cubiertas de clatrina o sin cubierta, asociadas a caveolina. Las vesículas con cubierta de clatrina se descubrieron primero, se observan con una alta densidad electrónica dada la presencia de depósitos de calcio y ATPasas (Rothberg et al., 1992); estas vesículas internalizan moléculas acopladas a su receptor (e. g. albumina, insulina, leptina, interleucinas, factor de necrosis tumoral α). Después se encontraron vesículas con menor densidad electrónica que las vesículas cubiertas de clatrina y con un diámetro de entre 50 y 100nm que se denominaron caveolas y que están involucradas en el transporte transcelular inespecífico por ejemplo de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Palade, 1953; Yamada, 1955; Lisanti et al., 1994a; Razani & Lisanti, 2002). Las caveolas endoteliales están involucradas en procesos

de internalización de moléculas de la sangre hacia el intersticio cerebral (endocitosis) o en dirección contraria del cerebro hacia la circulación sanguínea (trancitosis) (Simionescu, 1991). El movimiento transcelular de las caveolas esta facilitado por la asociación con proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina como la miosina y la distrofina (Razani & Lisanti, 2002).

La formación de caveolas se observa como un collar en la región luminal o abluminal de la célula endotelial y se ha descrito que la caveolina-1, la principal molécula involucrada en la formación caveolar, se localiza en regiones denominadas balsas lipídicas, ricas en colesterol y esfingolípidos. De manera importante se reconoce un amplio número de proteínas asociadas con las caveolas y su función, como la glicoproteína P, el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-R), metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y -9), fosfocinasa C (PKC), la cinasa de inositol 3-fosfato (PI3-K), cinasas de tirosina (Src) y la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Lisanti et al., 1994a: Lisanti et al., 1994b; Shaul et al., 1996). Todas esas moléculas están involucradas en vías de señalización implicadas en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica en condiciones normales y en respuesta a cambios aversivos. La hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica asociada a un incremento de caveolas también puede relacionarse con la posibilidad de fusión de las caveolas y de formación de canales transcelulares (Mehta & Malik, 2006).

Si bien el transporte trans- y paracelular es limitado, las demandas metabólicas del parénquima encefálico son altas y requieren de sistemas de transporte específicos que promueven la entrada al sistema nervioso central de nutrientes (e. g. transportador de glucosa GLUT1, transportadores de aminoácidos) o la salida de

metabolitos tóxicos y/o lipofílicos hacia la circulación sanguínea (e. g. glicoproteína p) (Abbott, 2005; Engelhardt, 2003; Persidsky et al., 2006; Ueno, 2007).

El paso de moléculas entre las células endoteliales está restringido por la presencia de uniones ocluyentes (también conocidas como uniones estrechas). Las uniones ocluyentes dejan un espacio entre las células endoteliales de 12 Å y se caracterizan ultraestructuralmente por la aparente fusión de las membranas en puntos específicos denominados “kiss-points” presentes en la región apical de la célula endotelial, determinando así la polaridad de la misma (Dempsey & Wislocki, 1955; Ueno, 2007) (Figura 2). La complejidad de una unión ocluyente tiene una relación inversamente proporcional con la permeabilidad de moléculas; entre más inmadura es una unión el paso de moléculas se incrementa (Huang et al., 2001) (Figura 2). Las uniones ocluyentes están formadas por proteínas transmembranales que se asocian a sus homólogas en la membrana de la célula endotelial adyacente: en la barrera hematoencefálica se reconocen dos proteínas características de las uniones ocluyentes, Claudina-5 (relacionada con la permeabilidad de cationes y aniones) y la Ocludina (importante para el mantenimiento de la unión pero no crucial para la permeabilidad). Ambas proteínas se asocian con una familia de proteínas citoplasmáticas ancladas al citoesqueleto de actina denominadas *Zonula occludens* (ZO) (Wittchen et al., 1999). ZO-1 es la más relacionada con cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que implican disrupción en las uniones ocluyentes e incremento en el tráfico de vesículas pinocíticas (Fanning et al., 2007) (Figura 2). Las proteínas características de las uniones ocluyentes están directamente asociadas a la dinámica del citoesqueleto de la célula endotelial, ya que interactúan con

proteínas importantes en diversas vías de señalización como cinasas (e. g. PKC) que pueden desencadenar cascadas de señalización que inducen hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica (Anderson & Itallie, 2006).

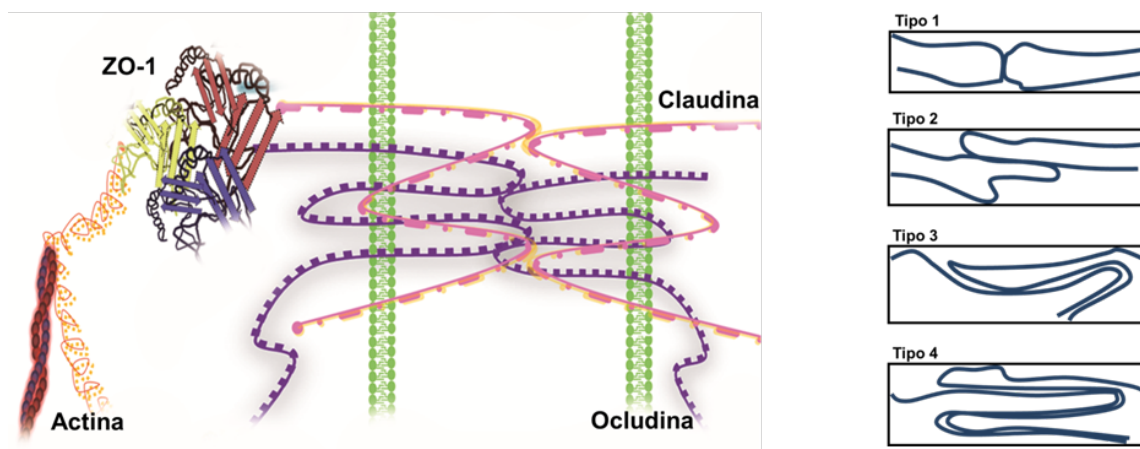


Figura 2. La unión ocluyente en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Proteínas componentes de la unión ocluyente (izquierda) y clasificación de los tipos de unión ocluyente dependiendo de su complejidad: tipo 1 (fin-fin), tipo 2 (traslape simple), tipo 3 (tipo mortero) y tipo 4 (unión compleja). Modificado de Huang et al. (2001)

Cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Las alteraciones en la integridad estructural de las uniones ocluyentes o el incremento en el transporte mediado por vesículas pinocíticas ocasionan disrupción de la barrera hematoencefálica. Los mecanismos involucrados en la desregulación de la integridad de la barrera hematoencefálica son poco conocidos. La hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica promueve la entrada de

moléculas potencialmente neurotóxicas y la infiltración de células del sistema inmune, ambos factores son capaces de inducir muerte neuronal. En diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple o diabetes se observa una disrupción estructural y funcional de la barrera hematoencefálica (Huber et al., 2001; Kumar et al., 2009). Asimismo, el incremento en la permeabilidad de moléculas circulantes hacia el parénquima cerebral se ha reportado en infecciones (e. g. VIH), procesos inflamatorios, hipertermia, estrés y restricción crónica de sueño de Movimientos Oculares Rápidos (MOR) (Banks et al., 1995; Bleys & Cowen, 2001; Sharma, 2004; Gómez-González & Escobar, 2009; Kiyatkin & Sharma, 2009; Gómez-Gonzalez et al., 2013).

La pérdida de sueño

Las demandas laborales y el estilo de vida en la sociedad actual están altamente relacionados con la reducción en la cantidad de horas de sueño por día. El sueño es un fenómeno fisiológico que se asocia con la reparación y la recuperación del organismo después del periodo de vigilia (Siegel, 2010); sin embargo los mecanismos por los cuales el sueño promueve la óptima función cerebral siguen siendo un enigma. El sueño está caracterizado por presentar patrones cíclicos de actividad eléctrica cerebral. El sueño implica la disminución significativa de las conductas de vigilia y el aumento en el umbral de respuesta ante estimulación ambiental diversa; por lo que se considera un fenómeno rítmico y reversible (Siegel, 2010). El sueño se divide en dos estadios bien diferenciados, el sueño de ondas lentas (no-MOR) y el sueño paradójico o de movimientos oculares rápidos

(MOR). Durante el sueño no-MOR, la actividad electroencefalográfica (EEG) disminuye presentando un patrón de ondas lentas mientras que el sueño MOR se caracteriza por presentar una actividad EEG parecida a la vigilia, movimientos oculares rápidos y pérdida de tono muscular. Ambas fases, MOR y no-MOR, alternan durante el periodo total de sueño. Entre los factores endógenos involucrados en la promoción y el mantenimiento del sueño se encuentran neurotransmisores (e.g. GABA, acetilcolina), péptidos neuromoduladores (e.g. prostaglandinas), hormonas (e.g. melatonina, hormona de crecimiento, cortisol), citocinas (e.g. IL-1 β , TNF α , IL-6), adenosina y NO (Krueger et al., 2008).

Uno de los medios más empleados y potentes para conocer la función del sueño es someter a los sujetos o animales experimentales a un periodo de privación de sueño (Rechtschaffen et al., 1989). La privación total de sueño en humanos induce déficits cognitivos y motores (Mills et al., 2007). Se ha reportado también que la privación prolongada de sueño en roedores y gatos (15-20 días) provoca cambios de comportamiento y finalmente la muerte. En particular, la privación selectiva de sueño MOR se relaciona con déficits de memoria y aprendizaje, disminución en la neurogénesis hipocámpica, muerte neuronal en regiones del tallo cerebral, hipertermia cerebral, incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en plasma (e. g. IL-1, TNF α , IL-17) y cambios neuroquímicos en el sistema nervioso central (Rechtschaffen et al., 1989; Rechtschaffen et al., 2002; Biswas et al., 2006; Davisa et al., 2006; Jaiswal et al., 2009; Yehuda et al., 2009; Poe et al., 2010). Un modelo en roedores de privación selectiva de sueño MOR implica la pérdida completa y continúa de esta fase de sueño: sin embargo, es complicado extrapolar

los resultados a lo que ocurre en humanos. Los estudios realizados con humanos para determinar el efecto de la pérdida de sueño sobre distintos sistemas en el organismo, generan controversia principalmente por el paradigma empleado para disminuir el periodo de sueño. Se habla entonces de privación de sueño (un periodo de tiempo consecutivo sin dormir), fragmentación de sueño (alteración de la ciclicidad de los estadios de sueño) y la restricción de sueño. En modelos animales la restricción crónica de sueño MOR implica la reducción de horas de oportunidad para dormir, y se ha reportado que tiene prácticamente los mismos efectos que la privación de sueño MOR a nivel cognitivo, aunque los animales exhiben un deterioro a largo plazo y se presentan alteraciones neuroquímicas diferenciales que sugieren una desregulación en la red neuroinmunoendocrina, por ejemplo la resistencia a la corticosterona y a la insulina (Meerlo et al., 2008).

ANTECEDENTES

Muchos cambios asociados a la hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica en condiciones experimentales y patologías se observan de manera independiente en sujetos con deficiencia de sueño MOR. Por ejemplo, se sabe que las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-17A y TNF- α se incrementan durante la privación total de sueño MOR; de igual forma la privación crónica de sueño MOR induce hipertermia, y por separado, ambos factores (citocinas proinflamatorias e hipertermia) incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Bleys & Cowen, 2001; Sharma, 2004; Kiyatkin & Sharma, 2009; Yehuda et al., 2009). De hecho, las patologías neurodegenerativas y metabólicas tienen en común cuadros inflamatorios, un correlato de alteraciones en la

integridad de la barrera hematoencefálica y desordenes de sueño (Tasali et al., 2009; Mills et al., 2007; Reynolds et al., 2012; Gómez-González et al., 2013).

Nuestro grupo de trabajo realizó el primer estudio para dilucidar los efectos de la restricción de sueño MOR sobre la integridad de la barrera hematoencefálica en ratas. La restricción crónica de sueño MOR durante 10 días incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en casi todo el cerebro en comparación con los controles empleados (Gómez-González et al., 2013, Anexo 1). Una vez en circulación, el azul de Evans se conjuga con la albúmina, que normalmente no atraviesa la barrera hematoencefálica; por lo que la tinción azul del cerebro indica disrupción de la barrera hematoencefálica. Los efectos de la restricción crónica de sueño MOR sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica son reversibles. La mayoría de las regiones cerebrales estudiadas recuperan la integridad de la barrera hematoencefálica con sólo 40 minutos de oportunidad para dormir; mientras que en regiones como la corteza frontal, los ganglios basales y el tálamo, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica se recupera por completo después de 120 minutos de oportunidad para dormir. En el vermis del cerebelo se mantiene la hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica aun después de periodos de oportunidad para dormir. En cambio en el hipocampo el transporte de azul de Evans disminuye progresivamente aunque nunca alcanza los niveles observados en animales control que durmieron normalmente (Gómez-González et al., 2013). La hiperpermeabilidad constante de la barrera hematoencefálica después de la restricción de sueño MOR en el hipocampo podría explicar las alteraciones

neuroquímicas e histológicas en esta región, lo cual se ha relacionado ampliamente con los déficits en la memoria y aprendizaje en animales y humanos secundarios a la privación/restricción de sueño (Rechtschaffen et al., 1989; Rechtschaffen et al., 2002; Biswas et al., 2006; Davisa et al., 2006; Jaiswal et al., 2009; Yehuda et al., 2009; Poe et al., 2010).

JUSTIFICACIÓN

La restricción de sueño es un problema de salud en la sociedad actual debido a las demandas laborales y al acceso ilimitado a medios electrónicos de comunicación. Un gran número de reportes sustentan que la deficiencia de sueño se considera un factor de riesgo importante para desarrollar obesidad, trastornos metabólicos, enfermedades cardiovasculares, patologías neurodegenerativas y todos los déficits cognitivos asociados a estos padecimientos (Tasali et al., 2009; Mills et al., 2007; Reynolds et al., 2012). Conocer los mecanismos involucrados en el incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica causada por la restricción de sueño MOR y su rápida recuperación permitirá entender como el sueño mantiene la homeostasis del organismo y proponer posibles mediadores moleculares capaces de modular la permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la restricción de sueño. Por otro lado, conocer el mecanismo que incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debido a la restricción de sueño también aporta un modelo de apertura de la barrera hematoencefálica con una ventana temporal relativamente corta y de alta selectividad regional para la entrada de fármacos al sistema nervioso central, lo cual puede ser considerado en ensayos farmacológicos para el tratamiento de diversas neuropatologías.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los cambios estructurales-funcionales de la barrera hematoencefálica durante la restricción crónica de sueño MOR y los periodos de oportunidad para dormir?

OBJETIVO GENERAL

Conocer los cambios estructurales-funcionales de la barrera hematoencefálica en ratas restringidas de sueño MOR y en los periodos de oportunidad para dormir.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los cambios ultraestructurales de las células endoteliales cerebrales del hipocampo después de la restricción crónica de sueño MOR y periodos de recuperación de sueño MOR.
2. Evaluar los cambios en la expresión de las proteínas características de las uniones ocluyentes en la barrera hematoencefálica: ZO-1, claudina-5 y ocludina en el hipocampo de la rata.
3. Validar el método empleado para la restricción de sueño MOR mediante el registro polisomnográfico en ratas durante el periodo de 20 horas de privación y 4 horas de oportunidad para dormir.

HIPÓTESIS

Las células endoteliales cerebrales del hipocampo presentaran cambios a nivel de los principales mecanismos de transporte inespecífico (uniones ocluyentes y vesículas pinocíticas) después de la restricción crónica de sueño MOR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (>3 meses) entre 250 y 500 gr. Se asignó al azar a los sujetos a una de las siguientes condiciones experimentales: restricción de sueño MOR (T0), restricción de sueño MOR con 40 minutos de oportunidad para dormir (T1), restricción de sueño MOR más 120 minutos de oportunidad para dormir (T2), controles de plataforma grande y controles intactos. Los animales experimentales estuvieron alojados en grupos de 5 sujetos por jaula habitación, en una sala con ciclo invertido de 12 horas de luz/oscuridad (luces encendidas a las 11pm) a temperatura ambiente entre 20-25°C, con agua y comida *ad libitum*.

Restricción de sueño MOR

El modelo propuesto para la restricción de sueño MOR consiste en un paradigma de 20 horas de privación selectiva de sueño MOR y 4 horas de oportunidad para dormir en un periodo de 10 días consecutivos. La privación selectiva de sueño MOR se realizó con la técnica modificada de plataforma múltiple (Figura 3), fundamentada en la pérdida del tono muscular característica del sueño MOR, en

donde se atenúan los efectos del estrés por aislamiento social e inmovilización reportados con otros métodos debido a que varios animales son privados de sueño de manera simultánea (Mendelson et al., 1974; Borges et al., 2004; Machado et al., 2004). Las ratas se colocaron en una caja de acrílico de 82cm x 59cm x 48cm con 3-5cm agua, sobre 3-5 plataformas de 7cm diámetro y 10 cm de alto. Los animales pueden moverse y tener libre acceso al alimento y agua; esta técnica suprime por completo el sueño MOR desde las primeras 24 horas (Borges et al., 2004; Borges et al., 2006) (Figura 3C). Para descartar la influencia de factores ambientales estresantes sobre la integridad de la barrera hematoencefálica, se empleó el control de plataforma grande, el cual se encuentra bajo las mismas condiciones que las ratas privadas de sueño pero las plataformas empleadas son de aproximadamente 15 cm, permitiendo que las ratas duerman (Figura 3B). Se empleó también un grupo control intacto, las ratas estuvieron en su caja habitación sin ningún procedimiento experimental (Figura 3A). Al término de cada periodo establecido se sacrificó a las ratas con una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal (0.8-1 mL). Las ratas del grupo de restricción de sueño MOR T0 se sacrificaron inmediatamente al final de las 20 horas de privación de sueño MOR en el día 10; las ratas restringidas de sueño MOR T1 se sacrificaron después de 40 minutos de oportunidad para dormir y las restringidas de sueño MOR T2 después de 120 minutos de oportunidad para dormir. Las ratas del grupo control de plataforma grande se sacrificaron inmediatamente después de las 20 horas en la caja de acrílico y los controles intactos se tomaron de su caja habitación y se sacrificaron inmediatamente. El sacrificio se realizó entre las 8am y las 11am.

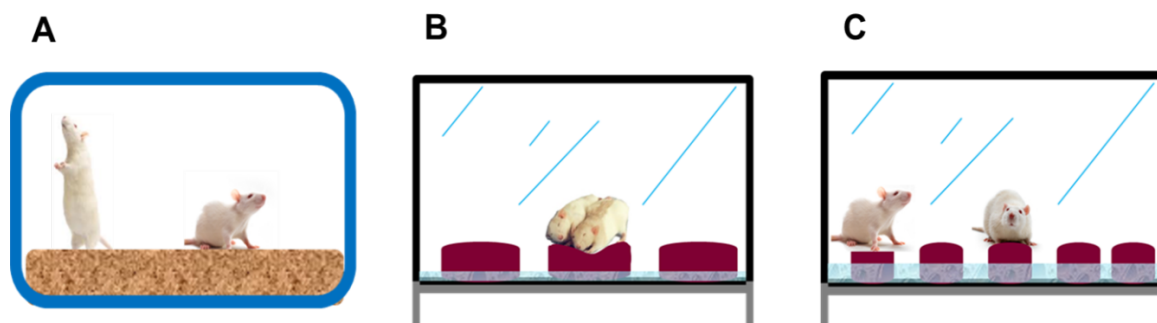


Figura 3. Grupos experimentales. Control intacto (A), Control de plataforma grande (B) y Restricción de sueño MOR por él método modificado de plataformas múltiples (C).

Estudio de la ultraestructura de la barrera hematoencefálica

En el día del sacrificio ocho ratas (dos por grupo: control intacto, restricción de sueño MOR T0, restricción de sueño MOR T1 y restricción de sueño MOR T2) se perfundieron con solución salina 0.9% durante 10 minutos y después con una solución de glutaraldehído 2%/paraformaldehído 4% durante 10 minutos. Se disectó el cerebro y se obtuvieron cubos de 1mm³ de la región CA3 de hipocampo. Las muestras se post-fijaron por inmersión en fijador de glutaraldehído 2%/paraformaldehído 4% durante una hora, se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos-salina (PBS) y se colocaron en el mismo amortiguador durante 24 horas a 4°C. Las muestras se procesaron para microscopia electrónica de transmisión (TEM). Los bloques del sector CA3 del hipocampo se post-fijaron en tetra-óxido de osmio durante 2 horas a 4°C, se deshidrataron progresivamente en alcoholes hasta llegar a acetonitrilo y se incluyeron en Epon. La resina se

polimerizó durante 48 horas a 60°C. Se obtuvieron cortes semifinos de 1µm y ultrafinos en un ultramicrotomo (LEICA ULTRACUT, UCT); los cortes ultrafinos se tiñeron con metales pesados y se observaron en un microscopio JEOL (1200EXII) a 60,000 kV a 2500 y 7000 aumentos (X2500, X7500). Las microelectrografías se adquirieron con una CCD (GATAN, JEOL) en formato TIFF.

Se tomaron microelectrografías de vasos sanguíneos hipocámpicos (10-20 microelectrografías por rata). La ultraestructura de las células endoteliales se analizó en cada microelectrografía determinando el área citoplasmática, la cantidad de vesículas pinocíticas (que tuvieran membrana definida y fueran menores de 100nm de diámetro) y las características de las uniones ocluyentes con el programa ImageJ. Se identificaron entre 5 y 16 uniones ocluyentes por grupo experimental y se determinó el tipo de unión ocluyente (tipo 1, tipo 2, tipo 3 o tipo 4) dependiendo de la complejidad de la unión, se cuantificó la longitud de la unión ocluyente, el tamaño y longitud de hendiduras en la unión ocluyente con el uso del programa ImageJ.

Determinación de la expresión de proteínas características de la unión ocluyente de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica

En el día del sacrificio se decapitaron tres ratas por grupo (control intacto, plataforma grande, MOR T0, MOR T1 y MOR T2) y se obtuvo el cerebro en frío (4°C) para disecar el hipocampo. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Obtención de proteínas totales del cerebro de rata

El hipocampo se homogenizó a bajo poder en 200 μ l de buffer RIPA adicionado con inhibidores de proteasas (1 mM EDTA, 150 mM NaCl, NP40 al 1%, SDS al 0.1%, 6.8 μ g/mL aprotinina, 4.0 μ g/mL leupeptina, 24.0 μ g/mL pepstatina-A, 2 mM PMSF); el homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se obtuvieron los sobrenadantes. El pellet fue resuspendido con 200 μ l de buffer RIPA+Tritonx10/0.1% para obtener proteínas transmembranales, se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm a 4°C y los sobrenadantes se mezclaron. Las muestras de proteínas totales se almacenaron a -80°C hasta el momento de llevar a cabo la cuantificación de proteínas.

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de las proteínas totales presentes en los sobrenadantes se realizó mediante el método de Bradford (BioRad cat. 500-0006). Se realizó una curva patrón de γ -globulina de bovino a concentraciones conocidas de 0.2, 0.6, 1.0 y 1.39 mg/mL, utilizando como solución blanco el amortiguador RIPA en el que se homogenizaron las muestras. Las muestras de proteínas de hipocampo se diluyeron en una proporción 1:20 con amortiguador RIPA y se agregó 1 mL de agente colorante, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm. Los valores de concentración fueron extrapolados con el ajuste lineal de la curva estándar obtenida para determinar el volumen de la muestra que se debía tomar para cargar una concentración de 100 μ g/ml. Las

proteínas totales se llevaron a un volumen final de 20 μ L con buffer RIPA, y se añadieron 20 μ L de buffer de muestra 2x (62.5 mM de Tris-HCl, 25% de glicerol, 2% de SDS, 5% de β -mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol, pH 6.8) para obtener un volumen de final de 40 μ L.

Western Blot

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) para la separación de proteínas totales, para ello, se preparó un gel separador de poliacrilamida al 10% (41% de ddH₂O, 25% Tris-HCl 1.5 M, 33% de acrilamida/bis-acrilamida, 1% de SDS, 0.5% de persulfato de amonio y 0.05% de TEMED; pH de 8.8) sobre una base de vidrio y se esperó hasta que el gel solidificó, se preparó sobre éste el gel concentrador de poliacrilamida al 5% (57% de ddH₂O, 25% Tris-HCl 0.5 M, 17% de acrilamida/bis-acrilamida, 1% de SDS, 0.5% de persulfato de amonio y 0.05% de TEMED; pH de 6.8).

Las muestras se hirvieron en baño María durante 1 minuto y se enfriaron a temperatura ambiente por 5 minutos, finalmente se cargaron en los pozos del gel; en el primer carril del gel se colocaron 12 μ L de marcador de peso molecular (Fermentas). El gel de poliacrilamida con las muestras ya cargadas en los respectivos pozos se colocó en la cámara electroforética con amortiguador de corrida frío (25 mM de tris, 190 mM glicina y 0.1% de SDS, pH 8.3). La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 60V (gel resolvedor) hasta que el frente de corrida llegó a la base del gel separador y el voltaje se cambió a

120V durante 1 hora; las proteínas embebidas dentro del gel separador se electrotransfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en un cartucho de transferencia, el cual se colocó de la siguiente manera: cátodo-cartucho-esponja-filtro-gel-membrana-filtro-esponja-cartucho-ánodo.

La electrotransferencia se llevó a cabo a 70V durante 2 horas en amortiguador de transferencia (25 mM de tris, 190 mM de glicina, 0.01% de SDS y 20% de metanol, pH 8.3). Al término de la electrotransferencia, la membrana se bloqueó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4 (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄, y 2 mM de KH₂PO₄) más 0.1% de tween 20 y 5% de leche descremada durante 1 hora con agitación constante. Una vez concluido el período de bloqueo, la membrana se colocó dentro de una bolsa de plástico y se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-ZO-1 (Invitrogen cat. 40-2200, 1:1000), anti Claudina-5 (Abcam cat. Ab53765, 1:1000), anti-occludina (Invitrogen cat. 40-4700, 1:1000), anti-Neuronal nuclei NeuN (Millipore cat. MAB77, 1:1000) y anti-actina (Abcam cat. Ab3280, 1:2000). Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS-T (PBS más 0.1% de tween 20); posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo (1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación constante. Transcurrido el periodo la membrana se lavó con PBS-T y se reveló mediante quimioluminiscencia con el uso del kit ECL plus (Amersham, RPN2232) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La membrana se expuso a una película radiográfica (Kodak) durante períodos variables (1 a 20 minutos) con el fin de obtener una exposición óptima. Las mismas membranas se emplearon

para detectar la señal de actina y NeuN. Las placas fotográficas se escanearon y la cuantificación de los blots se llevó a cabo con el uso del programa ImageJ.

Registro polisomnográfico

Para el implante de electrodos para el registro electroencefalográfico las ratas se anestesiaron intraperitonealmente con un coctel de ketamina (288.35 mg/mL), xilacina (10 mg/mL) y propiopromazina (0.5g/100mL), en una dosis de 1 mL/kg de peso corporal. Cuatro electrodos de acero inoxidable se colocaron bilateralmente en el hueso parietal anterior y posterior y uno en el hueso frontal para registrar la actividad EEG. Dos pares de electrodos de plata flexible se suturaron en el músculo dorsal de la nuca para el registro electromiográfico. Los electrodos se soldaron a un conector que se adosó al cráneo con acrílico dental. Después de la cirugía, se administró una dosis de antibiótico (penicilina g procaínica, 800 000 U, una sola dosis de 0.3 mL) por vía intramuscular y se dejó recuperar a las ratas durante 15 días en su caja habitación.

La señal electrofisiológica se registró en un polígrafo digital (Alice sleepware® Phillips, México). Los registros se analizaron en épocas de 30 segundos en la pantalla de la computadora y cada época se clasificó visualmente como vigilia, sueño no-MOR y sueño MOR. Tres días antes del registro EEG, los animales se habituaron a los cables empleados para el registro polisomnográfico, después de esto se realizó un registro EEG basal de 24 horas. Los grupos registrados fueron: control de plataforma grande (n=4) y ratas restringidas de sueño MOR (n=4). Se analizaron registros EEG de 24 horas en el primer día y en el día 10 de la

restricción de sueño MOR. Todos los grupos se registraron durante las 20 horas en la caja de plataformas múltiples y durante las 4 horas de oportunidad para dormir en su caja habitación. Se evaluaron los principales parámetros de sueño: período total de vigilia, período total de sueño, duración de sueño MOR, duración de sueño no-MOR, episodios de sueño MOR, latencia de sueño total, latencia de sueño no-MOR y latencia de sueño MOR.

Análisis estadístico

En el estudio polisomnográfico los datos cumplieron con los supuestos de normalidad, por lo que se realizó estadística paramétrica. Se empleó ANOVA de una vía para comparar los parámetros de sueño en los distintos grupos (basal, control de plataforma grande y restricción de sueño MOR) y una prueba de códigos de contraste ortogonales para comparar las diferencias específicas entre cada grupo. Debido al tamaño de muestra reducido en los experimentos de microscopía electrónica de transmisión no se realizaron análisis estadísticos de los datos.

RESULTADOS

Descripción de la ultraestructura de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica después de la restricción de sueño MOR

Los resultados de microscopía electrónica de transmisión muestran que los sujetos restringidos de sueño MOR tienen cambios importantes en la ultraestructura de las células endoteliales del hipocampo. El número de vesículas pinocíticas por área en las células endoteliales hipocámpicas de las ratas sin manipulación experimental fue de ≈ 5 vesículas/ μm^2 (Tabla 1, Figura 4). En las ratas restringidas de sueño MOR en T0 el número de vesículas pinocíticas por área en las células endoteliales del sector CA3 del hipocampo se incrementó hasta 300% y se mantuvo elevado en los animales con oportunidad para dormir de 40 y 120 minutos (Tabla 1, Figura 4). Como se observa en la Figura 4, los animales con restricción de sueño presentan numerosas vesículas pinocíticas con forma de Ω en la membrana luminal de la célula endotelial, así como caveolas cercanas a la membrana abluminal.

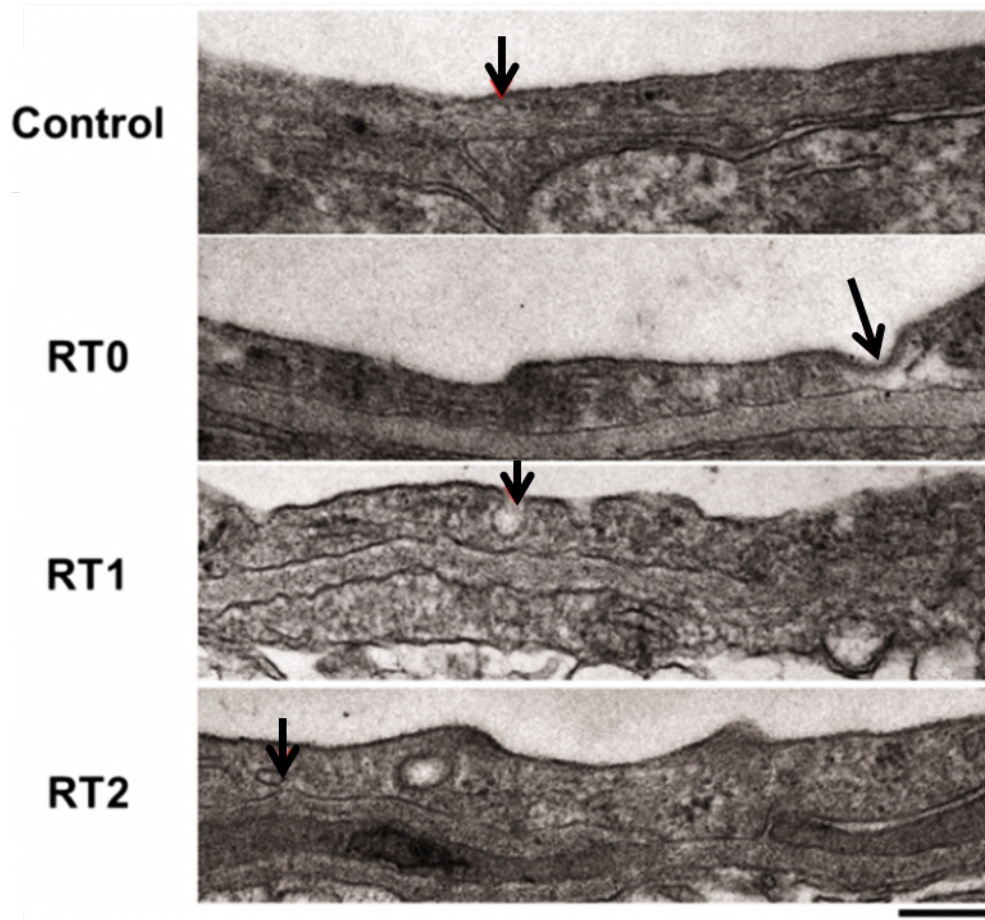


Figura 4. La restricción de sueño MOR incrementa el número de vesículas pinocíticas en las células endoteliales del hipocampo. Las flechas señalan vesículas pinocíticas en el citoplasma (control & RT2) y con forma de Ω , pegadas a la membrana luminal (RT0 & RT1). Abreviaturas: RT0, restricción de sueño MOR 10 días; RT1, restricción de sueño MOR 10 días más 40 minutos de oportunidad para dormir; RT2, restricción de sueño MOR 10 días más 120 minutos de oportunidad para dormir. Barra de escala 250nm, aumento X7500.

Adicionalmente, como se observa en la Tabla 1 y en la Figura 5, la ultraestructura general de la barrera hematoencefálica en el hipocampo de las ratas restringidas de sueño MOR estuvo evidentemente alterada. Los animales restringidos de sueño MOR presentaron aumento en el espesor de la lámina basal, aunque la pared endotelial se mantuvo sin cambios; adicionalmente, se observaron numerosas prolongaciones citoplasmáticas extendidas hacia el lumen de los capilares hipocámpicos de los animales restringidos de sueño en todos los tiempos estudiados (T0, T1, y T2) en comparación con las ratas control (Tabla 1). Las prolongaciones citoplasmáticas tienen una longitud promedio de 300nm y se observan en la cercanía de las uniones ocluyentes y en los sitios de formación de vesículas pinocíticas. Aunado a lo anterior, se observó la presencia de edema en la región perivascular de los animales restringidos de sueño MOR, especialmente con mayor magnitud en los animales con oportunidad para dormir de 40 y 120 minutos (Figura 5).

Tabla 1. Características ultraestructurales de las células endoteliales del hipocampo en ratas control y restringidas de sueño.

Condición experimental	Espesor CE μm	Espesor LB μm	No. de vesículas/ μm^2	No. de PC/ μm^2
Control intacto (n=20)	0.16 \pm 0.20	0.046 \pm 0.002	5.79 \pm 0.61	0.02 \pm 0.02
T0 (n=19)	0.15 \pm 0.10	0.057 \pm 0.002	21.62 \pm 3.08	1.49 \pm 0.43
T1 (n=15)	0.11 \pm 0.01	0.71 \pm 0.005	17.63 \pm 9.85	1.84 \pm 0.06
T2 (n=12)	0.16 \pm 0.03	0.046 \pm 0.005	20.39 \pm 3.50	0.33 \pm 0.41

Abreviaturas: CE, célula endotelial; LB, lámina basal; PC, Prolongación citoplasmática.

Media \pm error estándar.

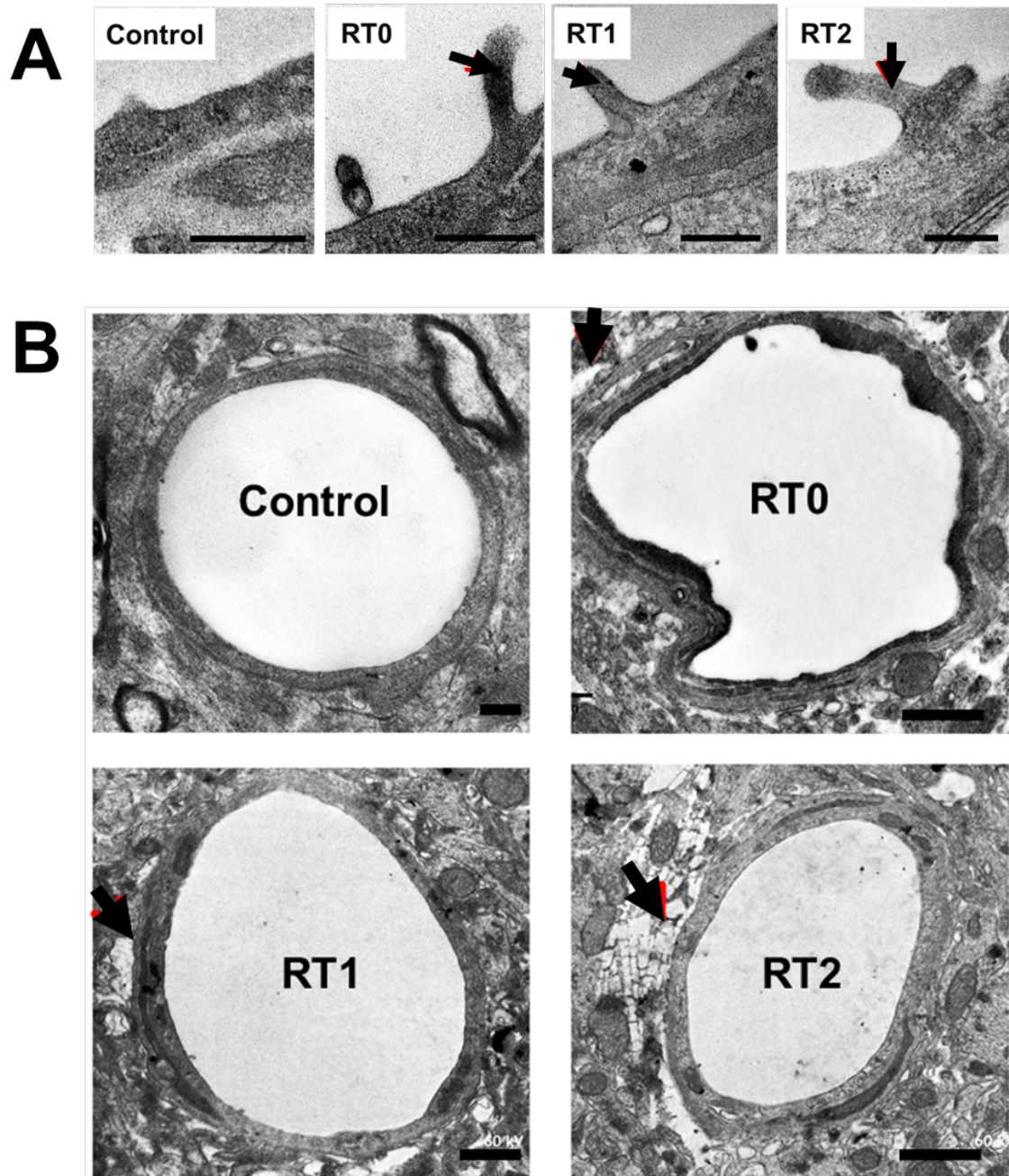


Figura 5. La restricción de sueño altera la ultraestructura general de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica en el hipocampo de la rata. La restricción de sueño MOR promueve la formación de prolongaciones citoplasmáticas (flechas en A) en las células endoteliales del hipocampo. (A) Barra de escala: 250nm, X7500. En B obsérvese el edema en la región circundante de la

célula endotelial en los animales restringidos de sueño (puntas de flecha) (B) Barra de escala: 1 μ m. X2500. Abreviaturas: RT0, restricción de sueño MOR 10 días; RT1, restricción de sueño MOR 10 días más 40 minutos de oportunidad para dormir; RT2, restricción de sueño MOR 10 días más 120 minutos de oportunidad para dormir.

Las uniones ocluyentes presentan cambios en su organización, siendo menos complejas en las células endoteliales del hipocampo de ratas restringidas de sueño MOR, aun con oportunidad de dormir, en comparación con los animales control (Tabla 2, Figura 6). Como se muestra en la Tabla 2, durante la restricción de sueño MOR y los períodos de oportunidad para dormir desaparecen las uniones ocluyentes complejas y predominan las uniones ocluyentes de tipo 1 y 2. Asimismo, la longitud de las uniones ocluyentes en las células endoteliales hipocámpicas después de la restricción de sueño MOR es menor en comparación con el grupo control, prevalece disminuida durante el período de 40 minutos de oportunidad para dormir (T1) y tiende a recuperarse después de 2 horas de oportunidad para dormir (Tabla 3). Aunque con los períodos de oportunidad para dormir (T1 y T2) las uniones ocluyentes tienden a recuperar su complejidad y longitud, las uniones ocluyentes presentan hendiduras que son de mayor espesor y longitud que las que pueden encontrarse ocasionalmente en uniones ocluyentes complejas de los animales del grupo control (Tabla 3, Figura 6).

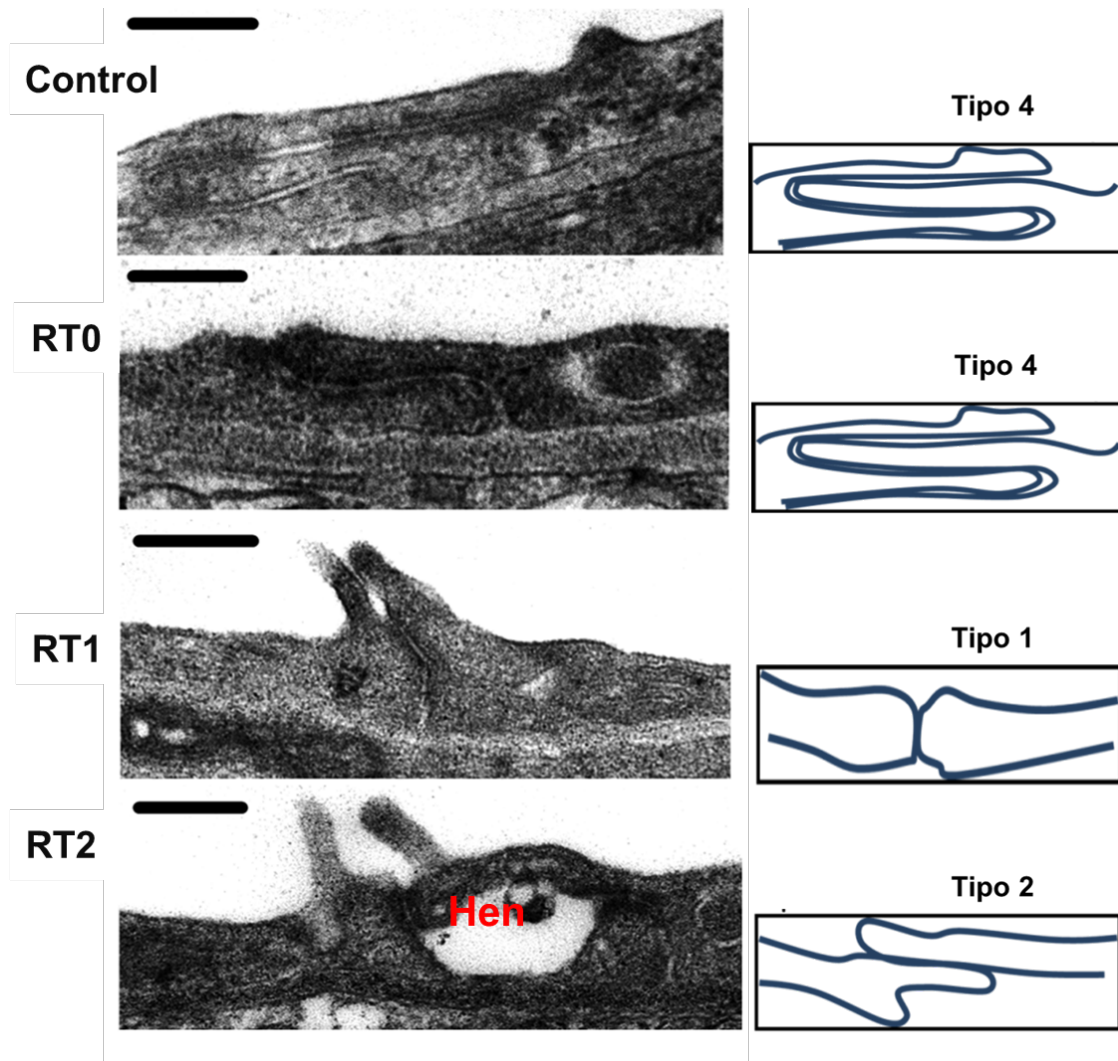


Figura 6. La restricción de sueño MOR disminuye la complejidad de las uniones ocluyentes y promueve la formación de hendiduras (Hen) en las uniones ocluyentes interendoteliales. Barra de escala: 200nm, X7500.

Tabla 2. Porcentaje de cada tipo de unión ocluyente (UO) por condición experimental.

Condición experimental	% UO tipo 1	% UO tipo 2	% UO tipo 3	% UO tipo 4
Control intacto				
(n=3)	0	0	33.4	66.6
T0				
(n=16)	37.5	56.25	6.25	0
T1				
(n=4)	25	75	0	0
T2				
(n=8)	37.5	25	37.5	0

Tabla 3. Características ultraestructurales de las uniones ocluyentes por condición experimental.

Condición experimental	Longitud UO μm	Promedio de hendiduras por UO	Longitud hendidura μm	% de la UO ocupada por hendiduras	Espesor de hendidura μm
Control intacto (n=3)	1.112 \pm 0.17	1	0.255 \pm 0.11	22.93	0.014 \pm 0.001
T0 (n=16)	0.82 \pm 0.15	1.68	0.440 \pm 0.11	53.65	0.044 \pm 0.006
T1 (n=4)	0.597 \pm 0.14	1.75	0.197 \pm 0.06	32.99	0.031 \pm 0.004
T2 (n=8)	1.001 \pm 0.25	0.87	0.178 \pm 0.03	17.78	0.085 \pm 0.01

Media \pm error estándar.

Expresión de proteínas de la unión ocluyente después de la restricción crónica de sueño MOR

El control para normalizar los blot de las proteínas de interés fue NeuN. Debido a que la densidad óptica relativa entre el control intacto y el control de plataforma grande no fueron diferentes, los valores se promediaron y se muestran en las gráficas como un solo grupo control con un error estándar considerando ambos grupos (Figura 7). La actina es una proteína importante para el mantenimiento de la integridad estructural de las células y es la proteína de anclaje para moléculas de la unión ocluyente (e. g. ZO-1). Como se muestra en la Figura 7, durante la restricción de sueño MOR los niveles de expresión de actina en el hipocampo disminuyeron y se mantuvieron reducidos con respecto al grupo control incluso en los animales con 40 y 120 minutos de oportunidad para dormir. Las proteínas transmembranales ocludina y Claudina-5 también se encuentran disminuidas en el hipocampo de todos los grupos experimentales sometidos a restricción de sueño MOR en comparación con el grupo control. De igual forma, la proteína citosólica ZO-1 se expresa menos en condiciones de restricción de sueño MOR, incluso con oportunidad para dormir, en comparación con el hipocampo del grupo control (Figura 7).

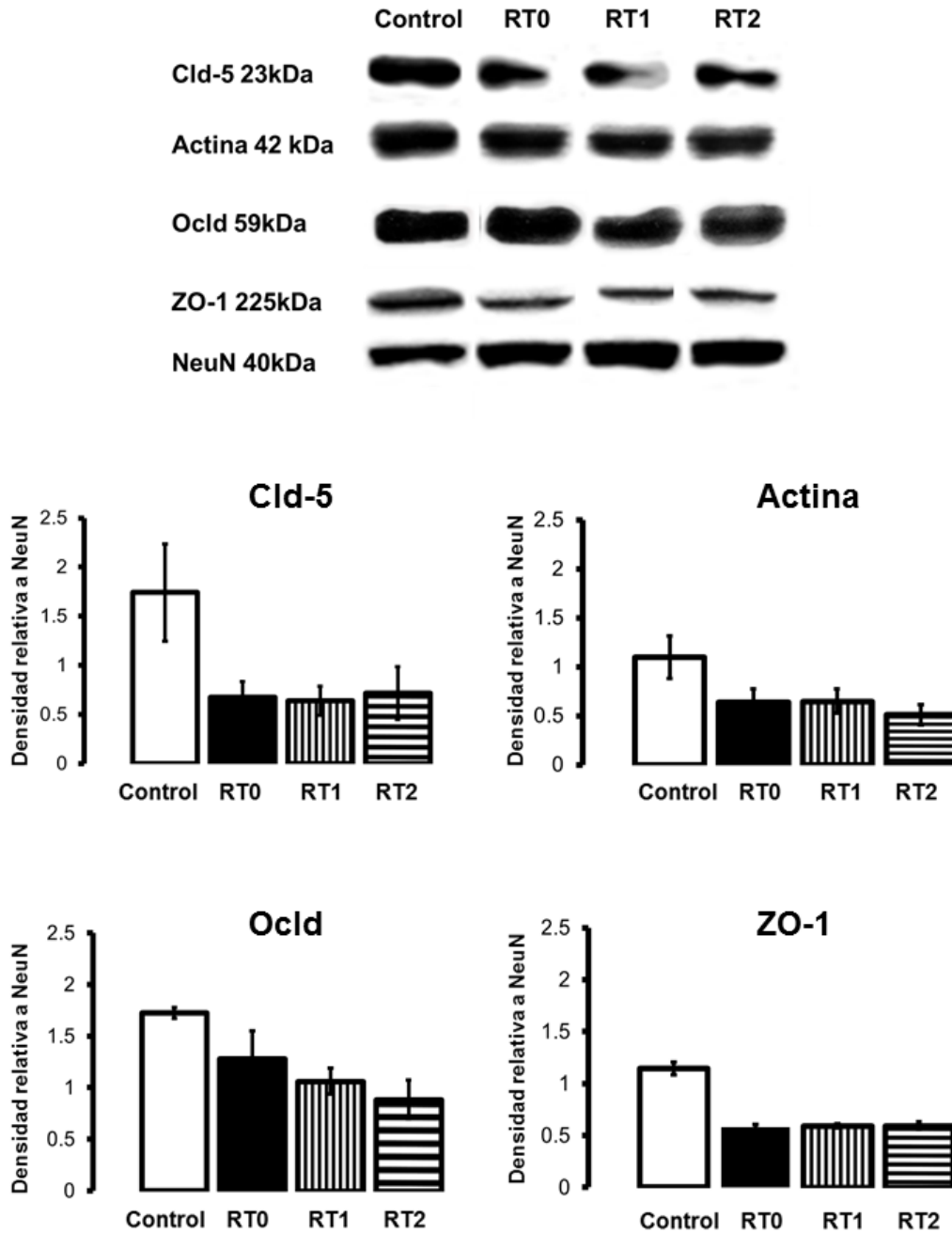


Figura 7. La restricción de sueño MOR disminuye la expresión de proteínas de la unión ocluyente en el hipocampo de la rata. Arriba: panel representativo de Western blot de ZO-1, Ocludina (Oclid), NeuN, actina, y Claudina 5 (Cld-5) en el hipocampo de ratas de los grupos control (Control intacto y control de plataforma grande); RT0, restricción de sueño MOR 10 días; RT1, restricción de sueño

MOR 10 días más 40 minutos de oportunidad para dormir; y RT2, restricción de sueño MOR 10 días más 120 minutos de oportunidad para dormir. Datos presentados como densidad relativa a NeuN. Media \pm error estándar.

Análisis del registro polisomnográfico durante la restricción de sueño MOR

La actividad EEG de las ratas sometidas a restricción crónica de sueño MOR y el control de plataforma grande se realizaron con el fin de determinar si el método empleado permite atribuir los cambios en el funcionamiento de la barrera hematoencefálica a la pérdida y subsecuente recuperación del sueño MOR. Durante las 20 horas de registro EEG en la caja de plataformas múltiples, las ratas restringidas de sueño MOR presentan un incremento en el tiempo total de vigilia en comparación con los controles ($p < 0.01$) (Figura 8). El método de plataforma múltiple disminuye el sueño no-MOR y abole por completo el sueño MOR desde el día 1 de restricción de sueño ($p < 0.005$). Asimismo, la supresión del sueño MOR, caracterizada por la reducción en el tiempo de sueño MOR y en el número de episodios MOR, se mantiene a lo largo de los 10 días de restricción de sueño. Como se observa en la Figura 8, los controles de plataforma grande presentan una ligera reducción en el porcentaje de sueño MOR y no-MOR, aunque nunca alcanzan los niveles observados en los animales restringidos de sueño.

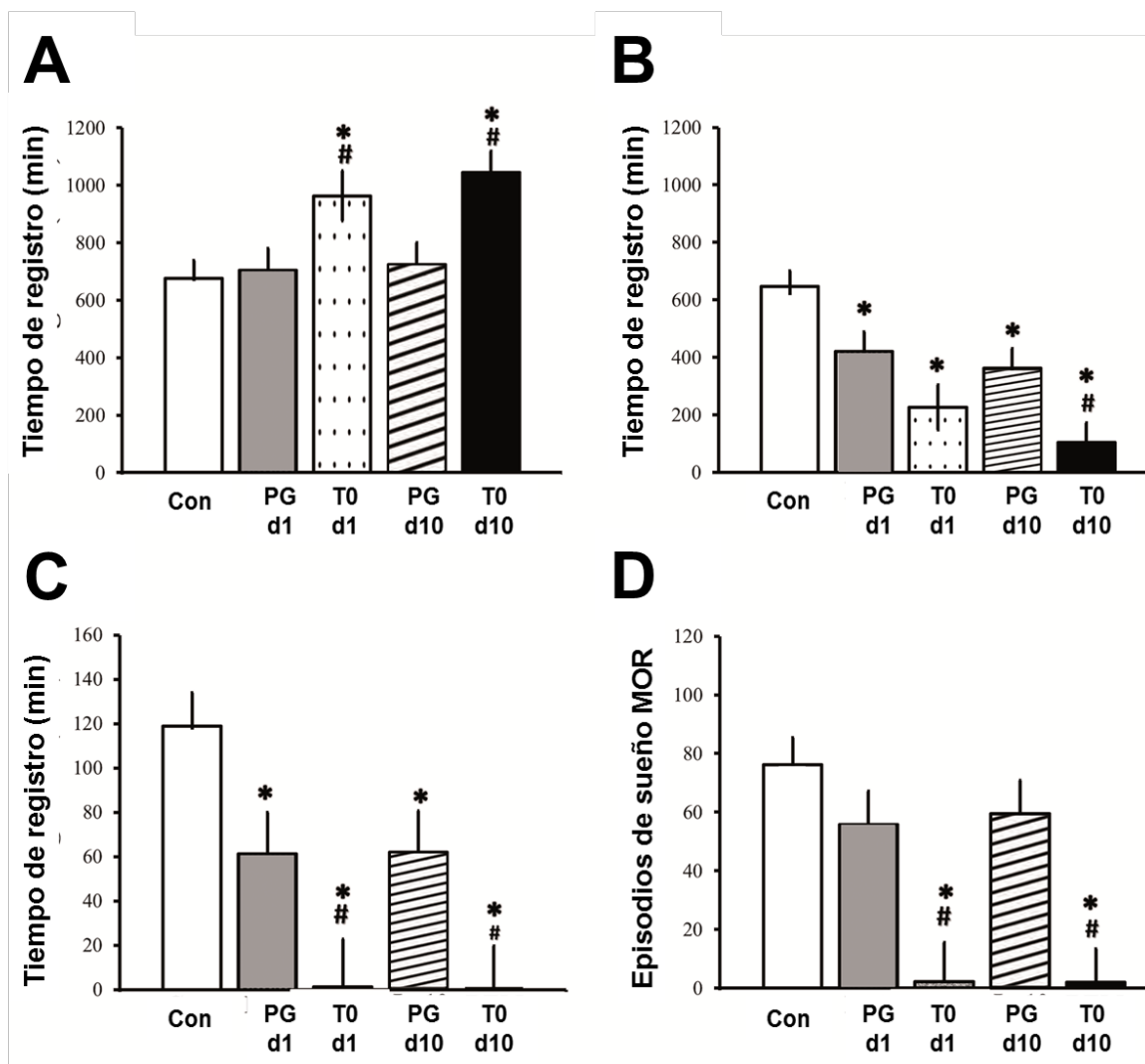


Figura 8. La técnica modificada de plataforma múltiple suprime el sueño MOR. Cambios en el patrón de sueño durante el periodo de restricción de sueño en la técnica modificada de plataforma múltiple. Las gráficas muestran el tiempo de vigilia (A), el tiempo de sueño no-MOR (B), el tiempo de sueño MOR (C) y el número de episodios de sueño MOR (D). Registro basal (Con), plataforma grande en el día 1 y 10 (PG d1 y PG d10), restricción de sueño en el día 1 y 10 (T0 d1 y T0 d10). *Diferencias significativas con respecto al control intacto ($p < 0.05$); #Diferencias significativas con respecto a la plataforma grande en el mismo día ($p < 0.05$).

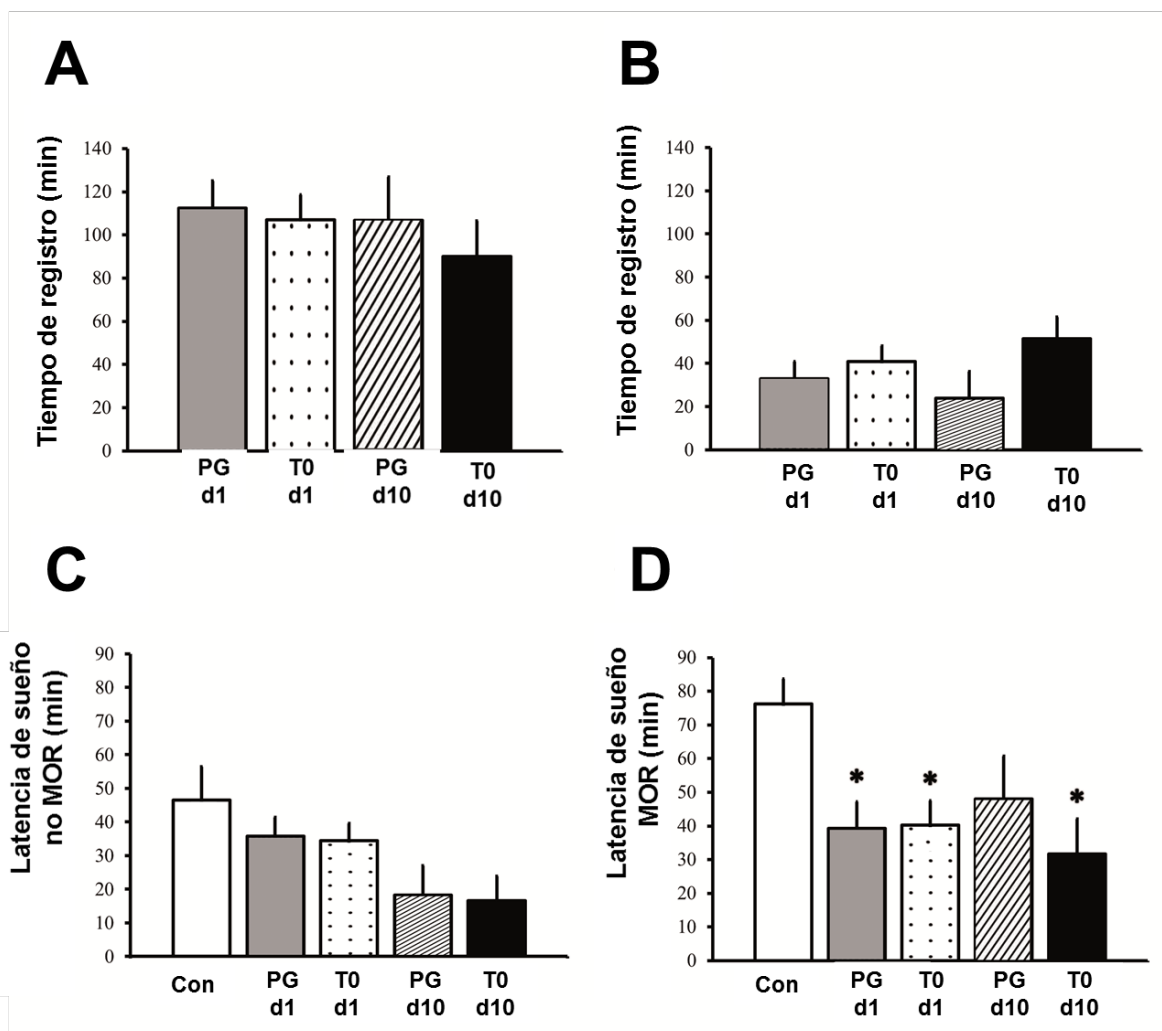


Figura 9. La técnica modificada de plataforma múltiple disminuye la latencia de sueño MOR. Cambios en el patrón de sueño durante el periodo de 4 horas de recuperación de sueño en la técnica modificada de plataforma múltiple. Las gráficas muestran el tiempo de sueño no MOR (A), el tiempo de sueño MOR (B), el tiempo de latencia de sueño no MOR (C) y la latencia de sueño MOR (D). Registro basal (Con), plataforma grande en el día 1 y 10 (PG d1 y PG d10), restricción de sueño en el día 1 y 10 (T0 d1 y T0 d10). *Diferencias significativas con respecto al control intacto ($p < 0.05$); #Diferencias significativas con respecto a la plataforma grande en el mismo día ($p < 0.05$).

Como se muestra en la Figura 9, durante las cuatro horas de oportunidad para dormir en la caja habitación las ratas restringidas de sueño MOR y los controles de plataforma grande presentan duraciones similares de sueño no-MOR. Las ratas restringidas de sueño MOR presentan una tendencia en el incremento de sueño MOR (rebote) y ambos grupos tienen una reducción en la latencia de sueño con respecto al registro EEG basal. Como se observa en la Figura 9, en el día 10 el grupo de restricción de sueño MOR presenta una tendencia a una latencia más corta de sueño MOR que el grupo control de plataforma grande.

DISCUSIÓN

La restricción de sueño MOR en un período de 10 días promueve la ruptura de la barrera hematoencefálica a través de la alteración de los dos mecanismos de transporte inespecífico, incremento en la densidad de vesículas pinocíticas y desacoplamiento de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales del hipocampo de la rata. Asimismo, los resultados de microscopía electrónica de transmisión muestran claramente que la restricción de sueño MOR altera la ultraestructura general de las células endoteliales del hipocampo de la rata. El incremento significativo en el número de vesículas pinocíticas puede estar relacionado con el incremento en el espesor de la lámina basal y con la formación de prolongaciones citoplasmáticas en el lumen de los capilares. De igual forma, se observa una relación estrecha entre el aumento en el número de vesículas pinocíticas y el desacoplamiento de las uniones ocluyentes, lo cual es congruente con reportes en la literatura especializada (Liu et al., 2008).

Las uniones ocluyentes de las células endoteliales del hipocampo de la rata son menos complejas en condiciones de restricción de sueño MOR en comparación con los animales con periodos de sueño normales. La disminución en la complejidad de la unión ocluyente se refleja en la reducción de la longitud de la unión y en la menor de la expresión de las proteínas de la unión ocluyente; en particular se encuentra reducida la expresión de la Claudina-5, que es la proteína crucial para limitar el transporte paracelular a nivel de la barrera hematoencefálica (Nitta et al., 2003). En el mismo sentido, se ha descrito en diversas patologías del sistema nervioso, que la disminución en la expresión de ZO-1 y ocludina correlaciona con el incremento en el número de vesículas pinocíticas (Liu et al., 2008). La escasa recuperación en el cierre de las hendiduras de la unión ocluyente concomitante con el alto número de vesículas pinocíticas puede ser el mecanismo responsable de la formación progresiva de edema observado en los modelos animales que son restringidos de sueño MOR.

Dado que durante el registro polisomnográfico se determinó que el método modificado de plataforma múltiple suprime selectivamente el sueño MOR, los resultados obtenidos en la regulación del funcionamiento de la barrera hematoencefálica pueden atribuirse específicamente a la disminución en la cantidad total de sueño MOR. Los hallazgos encontrados en el presente trabajo con relación al registro polisomnográfico son consistentes con reportes previos, donde se indica que además de la supresión de sueño MOR, la cantidad de sueño no-MOR disminuye aproximadamente en un 30% durante las primeras 24 horas de alojamiento en las plataformas múltiples (Machado et al., 2004). Asimismo, los

hallazgos en el grupo control de plataforma grande son similares a lo reportado por Machado y colaboradores (2004) quienes describen una disminución de aproximadamente del 30% en el tiempo de sueño no-MOR y una pérdida menor del tiempo de sueño MOR. Machado y colaboradores (2006) en un procedimiento de restricción de sueño MOR similar al empleado en el presente trabajo (18 horas diarias de privación de sueño MOR seguidas de 6 horas de oportunidad para dormir, aplicado durante 21 días) encontraron también que durante el período de oportunidad para dormir se presenta una tendencia al rebote de sueño MOR, que se caracteriza por reducción de la latencia a sueño MOR, incremento en el tiempo y número de episodios de sueño MOR desde el día 5 de restricción de sueño (Machado et al., 2004). Dado que el procedimiento de privación efectivamente suprime el sueño MOR y existe una tendencia a la recuperación del sueño durante las 4 horas de oportunidad para dormir, se puede afirmar que una de las funciones del sueño es mantener la integridad de la barrera hematoencefálica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con la hiperpermeabilidad constante en el hipocampo al colorante Azul de Evans previamente reportada en ratas restringidas de sueño MOR durante 10 días consecutivos (Gómez-González et al., 2013). El mantenimiento de la hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans de nuestro trabajo previo parece estar relacionado con el alto número de vesículas pinocíticas, la disminución de la complejidad de las uniones ocluyentes, así como la disminución en la expresión de las proteínas de la unión ocluyente en el hipocampo de los animales restringidos de sueño incluso con oportunidades para

dormir de 40 y 120 minutos. Dado que el hipocampo es una región crucial en la consolidación de la memoria y otros procesos cognitivos (Lagali et al., 2010). Las alteraciones en la integridad de la barrera hematoencefálica en esta región podrían explicar la génesis de las disfunciones moleculares y cognoscitivas reportadas después de periodos de privación/restricción de sueño MOR como decremento en la tasa de neurogénesis (Guzman-Marín et al., 2008; Mueller et al., 2008), reducción en el volumen del hipocampo (Novati et al., 2011), e incremento en la concentración de los neurotransmisores excitadores glutamato, aspartato y glutamina (Mohammed et al., 2011). No obstante, los mecanismos moleculares involucrados en los cambios de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica inducidos por la restricción de sueño MOR no se han reportado. Las características ultraestructurales y la disminución en la expresión de proteínas de la unión ocluyente en el hipocampo después de la restricción de sueño MOR se asemejan a lo reportado previamente en condiciones aversivas como el estrés, infecciones, trastornos metabólicos y enfermedades neurodegenerativas (Bouchard et al., 2002; Tasali et al., 2009; Mills et al., 2007; Gómez-González et al., 2011; Reynolds et al., 2012). El fenotipo de las células endoteliales cerebrales con incremento en vesículas pinocíticas, edema y formación de prolongaciones citoplasmáticas se ha reportado en distintas condiciones experimentales, como después de la alimentación crónica con una dieta rica en colesterol en un modelo murino, subsecuente a la administración de citocinas proinflamatorias en la rata y el ratón (Banks et al., 1991; Banks et al., 1995) así como en ratones deficientes de pericitos (Armulik et al., 2010). Lo anterior sugiere que los mediadores de la disrupción de la barrera hematoencefálica en ratas restringidas de sueño están

presentes en las condiciones previamente mencionadas y que la participación de otros componentes de la barrera hematoencefálica también puede desempeñar un papel importante en la ruptura de esta interfaz (e. g. pericitos). Los puntos en común entre la pérdida de sueño y la ruptura de la barrera hematoencefálica son mediadores inflamatorios, como: citocinas proinflamatorias, la adenosina y el óxido nítrico. Todos los componentes de la barrera hematoencefálica sintetizan estos mediadores inflamatorios en respuesta a alteraciones sistémicas o locales; asimismo son capaces de responder a cambios locales en la concentración de esos mediadores con modificaciones en el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Armulik et al., 2005). El cuadro de inflamación está presente en otras alteraciones fisiológicas que se acompañan de ruptura en la barrera hematoencefálica como la enfermedad de Alzheimer y procesos infecciosos en el sistema nervioso central. Adicionalmente, está ampliamente reportado que la pérdida de sueño induce un proceso inflamatorio que depende del tiempo y de la intensidad del modelo empleado. En humanos, períodos breves de pérdida de sueño (24-72 horas) incrementan la respuesta inflamatoria sistémica; sin embargo el aumento concomitante en altos niveles de cortisol, parece ejercer un efecto inmunoregulador negativo (van Leeuwen et al., 2009). Por otro lado, después de períodos crónicos de restricción de sueño se reporta elevación constante de citocinas proinflamatorias y resistencia a glucocorticoides. Datos aún no publicados de nuestro laboratorio muestran que la privación de sueño MOR durante 96 horas continuas no incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Lo anterior sugiere que la exposición temporal a mediadores inflamatorios en condiciones de privación y restricción de sueño podría mediar los

cambios en la integridad de la barrera hematoencefálica. La exposición crónica a mediadores inflamatorios (e. g. IL-1, IL-6, IL-17A y TNF- α) debido a la restricción de sueño y al tiempo insuficiente para la recuperación de sueño podría tener efectos de deterioro en la barrera hematoencefálica y en el organismo en general. Estos cambios sugieren una desregulación neuroinmunoendocrinológica que puede estar mediando la disrupción de la barrera hematoencefálica inducida por la restricción de sueño MOR.

CONCLUSIÓN

La restricción de sueño MOR induce el desarrollo de cambios ultraestructurales y moleculares en la barrera hematoencefálica. Los reportes de disfunciones cognitivas asociadas a las alteraciones de sueño pueden explicarse mediante la infiltración de moléculas potencialmente tóxicas y de mediadores inflamatorios que desencadenen cambios moleculares e histológicos en el sistema nervioso central. Dado que la pérdida de sueño es un factor que predispone a diversas patologías, la restricción crónica de sueño MOR puede ser un modelo de interés para descubrir los mecanismos que dan lugar a los cambios fisiopatológicos observados en la obesidad, diabetes y en un cuadro amplio de enfermedades que afectan el sistema nervioso central. Aunque este estudio muestra que la barrera hematoencefálica está comprometida después de la restricción de sueño MOR, es importante abundar en los mecanismos moleculares que median este proceso. La evaluación de la integridad de las células endoteliales es el estadio final ocasionado por la interacción de una red de moléculas provenientes de diferentes tipos celulares en el encéfalo. La participación de otros componentes de la barrera

hematoencefálica durante la restricción de sueño aún no ha sido dilucidada. El papel de los transportadores selectivos para solutos y nutrientes presentes en la célula endotelial de la barrera hematoencefálica deberá ser evaluado en detalle en estudios posteriores. El presente estudio podría ser considerado un eslabón importante para entender la aún enigmática función del sueño, en particular la del sueño MOR, que según nuestros hallazgos se relaciona con el mantenimiento de la integridad de la interfaz entre los sistemas nervioso, inmunológico y endocrino, la barrera hematoencefálica.

REFERENCIAS

- Abbott, N. J. (2002). Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat.* 200, 629–638.
- Abbott, N. J. (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 5–23.
- Abbot N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37, 13-25.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 97, 512–523.
- Armulik A., Genové G., Mäe M., Nisancioglu M.H., Wallgard E., Niaudet C., He L., Norlin J., Lindblom P., Strittmatter K., Johansson B.R & Betsholtz C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 25, 468:7323, 557-561
- Ballabh P., Braun A. & Nedergaard M. (2004). The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16, 1-13.3.
- Banks WA, Ortiz L, Plotkin SR & Kastin AJ. (1991). Human interleukin (IL)1 α , murine IL-1 α and murine IL-1 β are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 988–996.
- Banks W. A., Kastin A. J. & Broadwell R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, 2, 241-248.
- Begley, D.J., and Brightman, M.W. (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog. Drug Res.* 61, 39–78.

Biswas S., Mishra P. & Mallick B. N. (2006). Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience*, 142, 315-331.

Bleys R. L. A. W. & Cowen T. (2001). Innervation of cerebral blood vessels: morphology, plasticity, age-related, and Alzheimer's disease-related neurodegeneration. *Microscopy Research and Technique*, 53, 106-118.

Bouchard P, et al. 2002. Morpho-functional studies of the blood-brain barrier in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 45: 1017 – 1025.

Carman A. J., Mills J. H., Krenz A., Kim D. G. & Bynoe M. S. (2011). Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier. *J Neurosci*. Sep 14;31(37):13272-80.

Davisa C. J., Meighanc P. C., Taishib P., Krueger J. M., Hardinga J. W. & Wright J. W. (2006). REM sleep deprivation attenuates actin-binding protein cortactin: A link between sleep and hippocampal plasticity. *Neuroscience letters* Vol., 400 3; 191-196.

Davson H. (1976). Review lecture. The blood-brain barrier. *J. Physiol.* 255, 1–28.

Dempsey E. W., Wislocki G. B. (1955). An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *J biophysic and biochem cytol*, Vol. 1, No. 3

Ehrlich P. (1885). Das sauerstoff-bedürfnis des organismus. Eine Farbenanalytische Studie. Habilitation thesis, Berlin.

Gómez-González B. & Escobar A. (2009). Altered functional development of the blood-brain barrier after early life stress in the rat. *Brain Research Bulletin*, 79, 376-387.

Gómez-Gonzalez B., Hurtado-Alvarado G., & Velazquez-Moctezuma J. (2012). In *Blood-brain barrier: new research* Nova Science, 2012 ISBN: 978-1-62100-766-1.

Gómez-Gonzalez B., Hurtado-Alvarado G., Esqueda-León E, Santana-Miranda R, Rojas-Zamorano J. A. & Velazquez-Moctezuma J. (2013). REM sleep loss and recovery regulate the blood-brain barrier function. *Curr Neurovasc Res*. Vol. 10, No. 3.

Guillemin G. J., Brew B. J. (2004). Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J. Leukoc. Biol.* 75: 388–397.

Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Bashir, T., Nienhuis, R., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2008). Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep*, 31, 167-175.

Hawkins B. T. & Davis T. P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharm review* vol. 57 no. 2173-185.

Huang W. L., Harper C. G., Evans S. F., Newnham J. P., & Dunlop S. A. (2001). Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci.* 19(5):487-93.

Huber J. D., Egleton R. D. & Davis T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 24, 719-725.

Jaiswal M. K. & Mallick B. N. (2009) Prazosin modulates rapid eye movement sleep deprivation-induced changes in body temperature in rats. *J. Sleep Res.*, 18, 349-56.

Jodoin J., Demeule M., Fenart L., Cecchelli R., Farmer S., Linton K. L., Higgins C. F. & Béliveau. (2003) P-glycoprotein in blood–brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *Journal of Neurochemistry*, 2003, 87, 1010–1023

Kiyatkin E. A., & Sharma H. S. (2009) Permeability of the blood-brain barrier depends on brain temperature. *Neurosci.*, 161, 926-939.

Kovac A., Erickson E. A., Banks W. A. (2011) Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to Lipopolysaccharide. *J of Neuroinflammation* 8:139

Krueger J. M. (2008) The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des.* 14(32):3408-16

Kumar P., Shen Q., Pivetti C. D., Lee E. S., Wu M. H., & Yuan S. Y. (2009). Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, e19.

Lagali P. S., Corcoran C.P., & Picketts D. J. (2010). Hippocampus development and function: role of epigenetic factors and implications for cognitive disease. *Clin Genet.* 78(4):321-33.

Liu L. B., Xue Y. X., Liu Y. H., & Wang Y. B. (2008). Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci. Res.* 86(5):1153-68.

Lourenço C. F., Brites D., Brito M. A. (2010). Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews* 64; 328-363

Machado, R.B., Hipólido, D. C., Benedito-Silva, A. A. & Tufik, S. (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery, *Brain Res.* 1004, 45-51.

Meerlo P., Sgoifo A. & Suchecki D. (2008). Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med. Rev.*, 12, 197-210.

Mendelson W. B., Guthrie R. D., Frederick G. & Wyatt R. J. (1974). The Flower Pot Technique of Rapid Eye Movement (REM) Sleep Deprivation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 2, pp. 553-556.

Metha D. & Malik A. B. (2006). Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability *Physiol Rev* 86: 279–367.

Mills J. H., Thompson L. F., Mueller C., Waickman A. T., Jalkanen S., Niemela J., Airas L. & Bynoe M. S. (2008). CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8;105(27):9325-30.

Mills P. J., von Känel R., Norman., Natarajan L., Ziegler M. G. & Dimsdale J. E. (2007). Inflammation and Sleep in Healthy Individuals. *Sleep*, Vol. 30, No. 6.

Mohammed, H. S., Aboul, H. S, Khadrawy, Y. A., & Noor, N. A. (2011) Neurochemical and electrophysiological changes induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Behav. Brain Res.*, 225, 39-46.

Mueller, A. D., Pollock, M. S., Lieblich, S. E., Epp, J. R., Galea, L. A., & Mistlberger, R. E. (2008) Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294, 1693-1703.

Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M. & Tsukita S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 12;161(3), 653-60.

Novati A, Hulshof HJ, Koolhaas JM, Lucassen PJ, Meerlo P. 2011. Chronic sleep restriction causes a decrease in hippocampal volume in adolescent rats, which is not explained by changes in glucocorticoid levels or neurogenesis. *Neuroscience* 190: 145-155.

Paolinelli R., Corada M., Orsenigo F. & Dejan E. (2011). The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? *Pharmacological Research* 63:165–171

Persidsky Y., Ramirez S. H. & Haorah J. (2006). Blood–brain Barrier: Structural Components and Function under Physiologic and Pathologic Conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* (2006) 1: 223–236

Poe R., Walsh C. M. & Bjorness T. E. (2010) Cognitive neuroscience of sleep. *Progress in Brain Research* Volume 185, 2010, s 1–19

Radisavljevic Z., Avraham H. & Avraham S. (2000) Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* Jul 7;275(27):20770-4.

Rechtschaffen A. & Bergmann B. M. (2002). Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*, 25, 18–24.

Rechtschaffen A., Bergmann B. M., Everson C. A., Kushida C. A. & Gilliland M. A. (1989). Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*, 12, 68-87.

Reynolds A. C., Dorrian J., Liu P. Y., Van Dongen H. A., Wittert G. A. (2012). Impact of Five Nights of Sleep Restriction on Glucose Metabolism, Leptin and Testosterone in Young Adult Men. *PLoS ONE* 7(7)

Sharma H. S. (2004). Blood-brain and spinal cord barriers in stress. In H. S. Sharma, J. Westman (Eds.), *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease* (pp. 231-298). San Diego, CA: Elsevier.

Sharma H. S. & Alm P. (2004). In H. S. Sharma, J. Westman (Eds.), *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease* (pp. 191-231) San Diego, CA: Elsevier

Siegel J. M. (2010). Do all animals sleep? *Trends Neurosci.*, 31, 208-213.

Tasali E., Leproult R. & Spiegel K. (2009). Reduced sleep duration or quality: Relationships with insulin resistance and type 2 diabetes. *Prog Cardiovasc Dis* 51: 381–391.

Ueno M. (2007) Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1199-1206.

van Leeuwen W. M. A., Lehto M., Karisola P., Lindholm H. & Luukkonen R. (2009). Sleep Restriction increases the risk of developing Cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *Plos One* 4(2): e4589.

Weiss N., Miller F., Cazaubon S., & Couraud P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1788(4):842-57.

Wittchen E. S., Haskins J, Stevenson B. R. (1999). Protein Interactions at the Tight Junction. *J Biol Chem* Vol. 274, 35179–35185

Yehuda S., Sredni B., Carasso R. L. & Kenigsbuch-Sredni D. (2009). REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J. Interf. Cytok. Res.*, 29, 393-398.

Zlokovic B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 178-201.

REM Sleep Loss and Recovery Regulates Blood-Brain Barrier Function

Beatriz Gómez-González^{#,*}, Gabriela Hurtado-Alvarado[#], Enrique Esqueda-León, Rafael Santana-Miranda, José Ángel Rojas-Zamorano and Javier Velázquez-Moctezuma

Area of Neurosciences, Department of Biology of Reproduction, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

Abstract: The functions of rapid eye movement (REM) sleep have remained elusive since more than 50 years. Previous reports have identified several independent processes affected by the loss and subsequent recovery of REM sleep (hippocampal neurogenesis, brain stem neuronal cell death, and neurotransmitter content in several brain regions); however, a common underlying mechanism has not been found. We propose that altered brain homeostasis secondary to blood-brain barrier breakdown may explain all those changes induced by REM sleep loss. Therefore, the present report aimed to study the consequences of REM sleep restriction upon blood-brain barrier permeability to Evans blue. REM sleep restriction was induced by the multiple platform technique; male rats were REM sleep restricted 20h daily (with 4h sleep opportunity) during 10 days; control groups included large platform and intact rats. To study blood-brain barrier permeability Evans blue was intracardially administered; stained brains were sliced and photographed for optical density quantification. An independent experiment was carried out to elucidate the mechanism of blood-brain barrier breakdown by transmission electron microscopy. REM sleep restriction increased blood-brain barrier permeability to Evans blue in the whole brain as compared to both control groups. Brief periods of sleep recovery rapidly and effectively restored the severe alteration of blood-brain barrier function by reducing blood-to-brain transfer of Evans blue. The mechanism of blood-brain barrier breakdown involved increased caveolae formation at brain endothelial cells. In conclusion, our data suggest that REM sleep regulates the physical barrier properties of the blood-brain barrier.

Keywords: BBB, EEG, REM sleep restriction, REM sleep function, transmission electron microscopy.

INTRODUCTION

Sleep is a widespread phenomenon among vertebrates; it is characterized by a rapidly reversible immobility, reduced awareness to environmental stimuli, acquisition of species' specific postures, and distinctive brain electrical activity [1]. In mammals, sleep is divided into two major stages, rapid eye-movement sleep (REM) and non-REM sleep. REM sleep is characterized by fast desynchronized electroencephalographic (EEG) activity and muscle atonia, while non-REM sleep is characterized by slow wave EEG activity and slight muscle tone reduction [2]. Although highly studied since more than 50 years, the function of sleep remains elusive; pioneer works proved that sleep is important to preserve life, because chronic sleep loss induced progressive health deterioration until death of the experimental animals [3, 4]. Therefore, sleep function is hypothesized to preserve the integrity of the systems controlling the constancy of the internal *milleu* (the endocrine and immune systems) [5]; in particular Korth [6] suggested that sleep could maintain the function of the system that keeps brain homeostasis, the blood-brain barrier, but until now no evidence has been given to support such sleep function.

The blood-brain barrier is constituted by endothelial cells, pericytes, astroglia and microglia, whose functions include selective transport of molecules from blood-to-brain and *vice versa*, metabolism of blood- and brain-borne molecules, as well as protection to the brain from potentially neurotoxic blood-borne molecules (e.g. glutamate and albumin) [7]. Proper blood-brain barrier function is needed to guarantee normal physiology of both neuronal and glial cells, indeed direct neural exposure to blood-borne proteins may induce apoptosis and glial reactivity [8-10]. The altered function of the blood-brain barrier would explain the diverse independent effects of REM sleep loss previously reported, such as reduced hippocampal neurogenesis [11, 12], increased concentration of the excitatory amino acids glutamate, aspartate and glutamine in the hippocampus and cerebral cortex [13], and increased apoptosis in the REM-sleep controlling nuclei of the brain stem [14]. Therefore it seems plausible that REM sleep may be preserving blood-brain barrier integrity. Hence, this study aimed to elucidate the effect of REM sleep loss and subsequent recovery upon blood-brain barrier permeability to a blood-circulating dye, Evans blue.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Three month-old male Wistar rats (n=39) were used. Rats were caged in groups of 6-8 in our laboratory vivarium under a 12h light/dark cycle (lights on at 23 hour) at room temperature of 20-25°C. Commercial rat chow and tap water were available *ad libitum* to all rats throughout the

*Address correspondence to this author at the Area of Neurosciences, Department of Biology of Reproduction, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, Mexico City, Mexico, Zip Code. 09340; Tel/Fax: 52 55 58046559; E-mails: bgomezglez@gmail.com, bgomez@xanum.uam.mx

[#]Both authors contributed equally to the work

Received: April 22, 2013 Revised: May 10, 2013 Accepted: May 15, 2013

experiment. Rats were randomly assigned to the following groups: intact control, 10-day large platform control, and 10-day REM sleep restriction. Because previous reports on blood-brain barrier breakdown after acute stress exposure showed that blood-brain barrier mending occurs rapidly after the end of stress [15], we tested whether brief periods of REM sleep recovery induced a recuperation of normal blood-brain barrier permeability; therefore rats subjected to 10 days of REM sleep restriction were allowed to sleep for 0 minutes (T0, n=5), 40 minutes (T1, n=5), and 120 minutes (T2, n=5) in their home-cage and then tested for blood-brain barrier permeability to Evans blue. Independent experiments were carried out to determine the route used by Evans blue to cross the blood-brain barrier by transmission electron microscopy (n=4) and to show Evans blue deposition inside brain parenchyma by fluorescence microscopy (n=2). Additionally, a fourth independent experiment was carried out to evaluate the loss of each sleep stage induced by the procedure of sleep deprivation, therefore EEG recording was done for 10-day large platform controls (n=4) and 10-day REM sleep restricted rats (n=4). Experiments were carried out following the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research [16].

Materials

For the REM sleep restriction procedure an acrylic water tank (82cm x 59cm x 48cm) and 7cm or 15cm diameter platforms were used. To study blood-brain barrier permeability Evans blue (Sigma, E2129) was used. Quantification of Evans blue extravasation and morphological measures were carried out blind using ImageJ software version 1.44 for Windows [17]. Transmission electron microscopy images were acquired on a JEOL microscope (JEM1200ex II) using a CCD camera (GATA, JEOL), and fluorescence microscopy images were acquired on a Zeiss microscope (AxioImager.A1) using a digital camera (AxioCam MRc), and the AxioVision software version 4.6.3. For EEG recording stainless steel electrodes for cortical recording and silver electrodes for muscle activity were used. EEG recording was performed on the digital polygraph Alice 5 System (Phillips Co.). Statistical tests were carried out using SPSS version 15 for Windows.

Procedure

REM Sleep Restriction

REM sleep restriction was carried out by the multiple platform technique, which deprives selectively REM sleep by caging rats over small platforms (7cm diameter) surrounded by water; rats living in those conditions may be awake and in non-REM sleep, but when they enter REM sleep they lost their muscle tone and fall into the water [18, 19]. The platform technique characteristically involves numerous awakenings during the REM sleep phase, although a slight loss of non-REM sleep is also observed. Because of the full suppression of REM sleep, we deemed the procedure as adequate to investigate the effects of REM sleep loss, as has also been considered previously by others [18, 19]. In the multiple platform technique 3-4 rats belonging to the same socially stable group are simultaneously REM-sleep deprived to avoid social isolation stress [19]. In our

experiment, rats were kept in the conditions of the multiple platform technique during 20 hours daily for 10 consecutive days, allowing them to sleep 4 hours in their home-cages during the last 4 hours of the light phase; in both conditions, REM sleep deprivation and sleep opportunity, rats remained in their socially stable group. Because the platform technique for REM sleep deprivation involves exposure of animals to stressful conditions (e.g. wet environment), the standard internal control involves caging animals in large platforms (15cm diameter) surrounded by water. Large platforms allow the subjects to reach the REM sleep stage and equal stress conditions as REM sleep deprived rats [19]. In our experiment, rats were caged in large platforms during 10 consecutive days following the same schedule as REM sleep restricted rats; in brief, large platform controls were caged 20 hours daily in the large platforms in groups of 3-4 subjects and during the last 4 hours of light phase they were allowed to rest in their home-cages. Intact controls slept *ad libitum* in their home cages during the 10 days of the experiment.

Quantification of Blood-Brain Barrier Permeability to Evans Blue

Evans blue is a vital dye that once in circulation forms stable conjugates with the serum protein albumin; therefore, the passage of Evans blue throughout the blood-brain barrier indicates increased transport of blood-borne proteins [20]. Evans blue administration was performed under sodium pentobarbital anesthesia (ip. 0.063 g/kg body weight) at the end of the 10th day of REM sleep restriction, immediately upon removal of the multiple platform cage (T0), and after brief periods of sleep recovery in the home-cage (40 min - T1, and 120 min -T2). Large platform controls received Evans blue also at the 10th day of caging in the multiple platform technique immediately upon removal of the multiple platform cage; Evans blue was administered to intact controls the same day the experiments were carried on REM sleep restricted rats and large platform controls. Evans blue was diluted at 2% in distilled water and intracardially administered between 9-11 hours. A 5 mm thoracic incision was done on the left side of each subject, the heart was partially exposed, and 0.2mL/100g body weight of Evans blue was administered in the left heart ventricle as previously reported by Gómez-González and Escobar [21]. Evans blue was left in circulation during 10 minutes; heart rate and respiratory movements persisted until the end of that period. At the end of the 10-minute Evans blue circulation period all subjects were perfused with saline solution (0.9%) during 5 minutes at a rate of 15mL/min, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M saline-phosphate buffer during another 5 minutes at a rate of 15mL/min. Brains from all subjects were dissected, post-fixed 24 hours by immersion in the same fixative at 4°C and hand-sectioned into 2 mm coronal sections. Evans blue-stained slices were photographed without magnification with a digital camera (Lumix, Panasonic) under identical artificial light conditions and with the same white background. To verify that all photographs had similar illumination intensity a one-way ANOVA test of the background optical density was carried out; the statistical test revealed that all groups of rats presented equal background illumination ($F_{4,24}=2.308$, $P=0.093$).

Evans blue extravasation was quantitatively analyzed by measuring mean optical density of each of the following brain regions: cingulate gyrus, retrosplenial, orbitofrontal, frontal, insular, rhinal, parietal, somatosensory, visual, auditory, and motor cortices, hippocampus, amygdala, basal nuclei, septal area, thalamus, preoptic area, hypothalamus, cerebellum, and brain stem regions. Regions of interest were identified using landmarks of Paxinos and Watson Atlas [22]. Images of brain slices were acquired in RGB format and then transferred to black/white to quantify the absorbance by optical density using ImageJ software. Color to black/white transformation was carried out using the formula: $\text{Gray} = 0.299(\text{red}) + 0.587(\text{green}) + 0.114(\text{blue})$ by ImageJ software. Optical density was quantified using the calibrated optical density step tablet and the Rodbard function provided by ImageJ software. In a previously validated study, Fry [23] derived an empirical relationship between the amount of Evans blue per unit area (nmol/cm^2) and the optical density; previous reports used that formula to quantify Evans blue concentration in the brain and periphery [21, 24]. Therefore, in the present study Evans blue extravasation was measured in terms of optical density units. To verify Evans blue deposition in brain parenchyma and to discard possible skewness associated to Evans blue remnants in the vessel wall after perfusion, 40- μm brain coronal slices were obtained on a freezing microtome for REM sleep restricted and large platform control groups. Sections were observed in the AxioImager A1 microscope using fluorescence optics with excitation at 546nm and emission at 575-640nm.

Ultrastructure of the Blood-Brain Barrier

To characterize the route of Evans blue extravasation, transmission electron micrographs were obtained from an intact control ($n=1$), and REM sleep restricted rats at T0 ($n=1$), T1 ($n=1$), and T2 ($n=1$). Between 9-11 hours rats were ip. anesthetized with sodium pentobarbital (0.063 g/kg body weight). Thereafter, rats were perfused with normal saline solution (0.9%) during 5 minutes, followed by 2% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4 during 10 minutes. Brains were removed, hand-sectioned in 2mm thick coronal slices and fixed by immersion in the same fixative during 12 hours at 4°C. After that period, slices containing the hippocampus were rinsed in sodium phosphate buffer and a 1mm³ block containing the CA3 region was obtained. The block was post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were post-stained with heavy metals and observed under a JEOL electron microscope (JEM1200ex II). Ten to fifteen micrographs of brain capillaries (<10- μm diameter) per each subject were obtained, and the density of caveolae (<100nm diameter) per endothelial cell area was quantified using ImageJ software.

EEG Recording

For the surgery to implant electrodes for EEG recording, rats were ip. anesthetized with a cocktail containing ketamine (288.35 mg/mL), xylazine (10 mg/mL), and propiopromazine (0.5g/100mL), at a dose of 1 mL/kg body weight. Four stainless-steel electrodes were placed bilaterally

in the anterior and posterior parietal bone and one in the frontal bone to record EEG activity. Two pairs of silver flexible fine wires were sutured to the dorsal neck muscle for EMG recording. Electrodes were soldered to a connector and attached to the rat's cranium through acrylic dental cement. After the surgical procedure, antibiotic was once administered intramuscularly; rats were allowed a post-surgery recovery of 15 days before EEG recording.

Electrophysiological signals were recorded on the digital polygraph Alice 5 System (Phillips Co). Recordings were displayed at 30 s epochs on a PC; each epoch was visually classified as wakefulness, non-REM sleep and REM sleep [25]. For 3 days before EEG recording, animals were habituated to the polygraph setup; thereafter, a 24-hour basal EEG recording began in all subjects. Animals were randomly assigned to one of two groups: large platform controls ($n=4$) and REM-sleep restricted rats ($n=4$). Twenty-four hour EEG recordings were acquired in days 1 and 10 of REM sleep restriction; all groups were recorded during the 20 hours of multiple platform caging and during the 4 hours of sleep opportunity in their home cages.

Statistical Analyses

Because data from all groups fulfilled normality and independence requirements to perform statistical parametric analysis, a mixed ANOVA test was used to compare blood-brain barrier transport of Evans blue among groups. The mixed ANOVA test used experimental groups as between-subjects factor and regions of interest as within-subjects factor. The Huynh-Feldt epsilon ($\epsilon=0.428$) was applied to the degrees of freedom to account for violation of the sphericity assumption in the mixed ANOVA test [26]. The alpha level was maintained at 0.05 in all the ANOVA tests. To reduce the probability of type I statistical error associated with multiple comparisons, pair wise differences between sleep restricted groups and controls were tested on using orthogonal contrasts codes (C_i); contrast coefficients of 1 and -1 were assigned to experimental groups (REM sleep restricted at T0, T1, T2) and control groups, respectively. A one-way ANOVA test was used to compare differences between groups in the sleep parameters obtained during EEG recording, pair wise differences between REM sleep restricted, large platform and intact control groups were also tested by using orthogonal contrasts codes; contrast coefficients of 1 and -1 were assigned to REM sleep restricted group and control groups (large platform and intact controls), respectively.

RESULTS

Quantification of Blood-Brain Barrier Permeability to Evans Blue

This study aimed to evaluate the effect of REM sleep loss and recovery upon blood-brain barrier permeability to Evans blue as an attempt to test the hypothesis proposed by Korth [6] regarding the function of sleep. As it is shown on Figure 1, both control groups, large platform and intact, presented equal null blue staining of the brain ($P>0.05$), proving an intact blood-brain barrier even under conditions of sleep fragmentation characteristic of the large platform control. Chronic REM sleep loss induced by the multiple platform

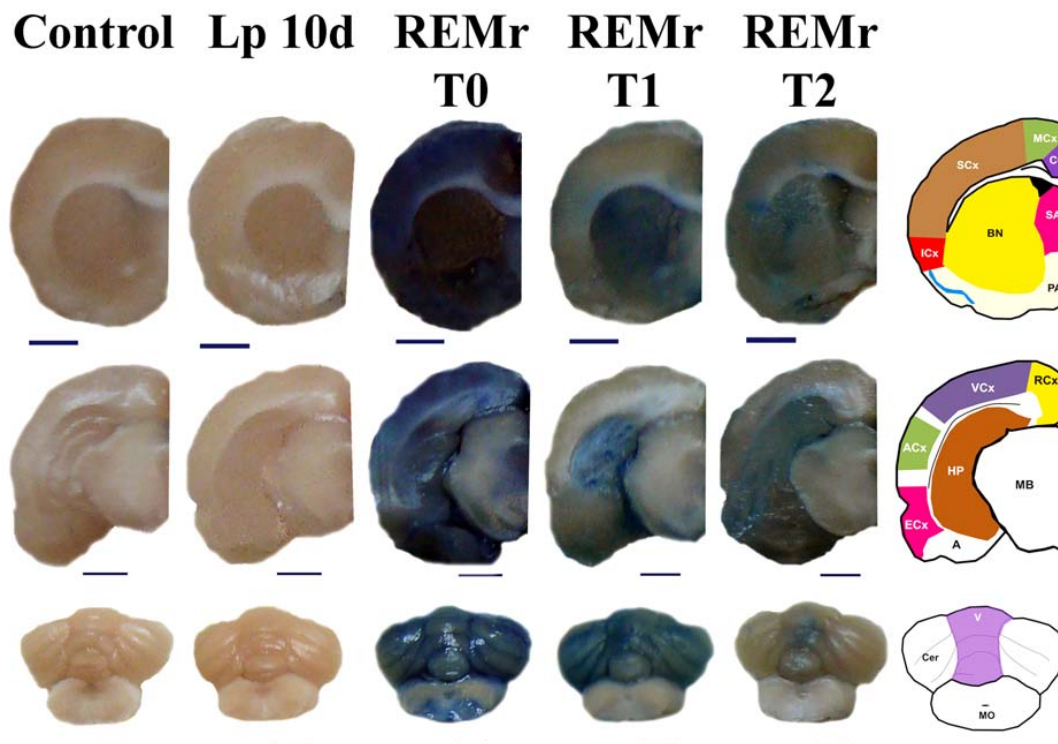


Fig. (1). REM sleep restriction effects upon blood-brain barrier permeability to Evans blue. Photographs of coronal sections of the brain showing changes in blood-brain barrier permeability to Evans blue in the cingulate gyrus (CG), motor (MCx), somatosensory (SCx), insular (ICx), retrosplenial (RCx), visual (VCx), auditory (ACx), and entorhinal cortices (RhCx), hippocampus (HP), basal nuclei (BN), septal (SA) and preoptic areas (PA), midbrain (M), amygdala (A), cerebellum (Cer), vermis (V), and medulla oblongata (MO) of REM sleep restricted rats (REMr) at 0 (T0), 40 (T1) and 120 minutes (T2) of sleep recovery as compared to intact and large platform controls (LP 10d). Scale bar: 25 mm.

technique increased blood-brain barrier permeability to Evans blue almost in the whole brain as compared to both controls (mixed ANOVA test, experimental condition \times region, $F_{9,842-196,838}=1.479$, $P=0.044$). REM sleep restricted rats presented a dark blue staining of all brain regions studied as compared to controls (Fig. 1). Ten-day REM sleep restricted rats presented a $\approx 40\%$ increase in optical density in all brain regions studied as compared to homologous regions of large platform and intact controls (Figs. 2 and 3).

Generally, brief periods of REM sleep recovery induced a progressive recouping of normal blood-brain barrier permeability to Evans blue, although regional differences were observed during the time of sleep opportunity. In several brain regions, sleep recovery induced a gradual decrease in Evans blue staining (Fig. 1). Brain regions at which 120 minutes of sleep opportunity promoted a full recovery of normal blood-brain barrier permeability included the cingulate gyrus, parietal, and insular cortices, hypothalamus, basal nuclei, amygdala, thalamus, septal and preoptic areas (Fig. 2). On the other hand, regions such as the hippocampus, rhinal, somatosensory, motor, auditory, orbitofrontal, and retrosplenial cortices showed a slow reduction in blood-to-brain transport of Evans blue along the period of sleep opportunity in 10-day REM sleep restricted rats, but optical density values were still significantly higher

than both control groups at 120 minutes of sleep recovery ($P<0.05$) (Fig. 3). Finally, in the chronically REM sleep restricted rats there was a group of brain regions whose Evans blue staining was maintained homogeneously high throughout the period of sleep recovery; regions like the olfactory bulb, midbrain, pons, cerebellum, frontal and visual cortices presented similar optical density values from T0 to T2 ($P>0.05$), which were significantly higher than those observed in homologous regions of both large platform and intact controls ($P<0.05$) (Fig. 3). Fluorescence microscopy showed that in REM sleep restricted rats Evans blue accumulated inside the brain parenchyma with some residual dye deposits on the brain vessel network (Fig. 4). As it is shown in Fig. (4), the hippocampus and basal nuclei of a REM sleep restricted rat presented homogeneous red fluorescence as compared to a large platform control, which was characterized by slight Evans blue deposits in brain vessels.

ULTRASTRUCTURE OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER

As it is shown in Fig. (5), REM sleep restriction increased the density of caveolae in hippocampal endothelial cells as compared to the intact control. Fig. (5) shows the mean number of caveolae present in 10-15 capillary profiles of 10-day REM sleep restricted rats in T0, T1 and T2 and in

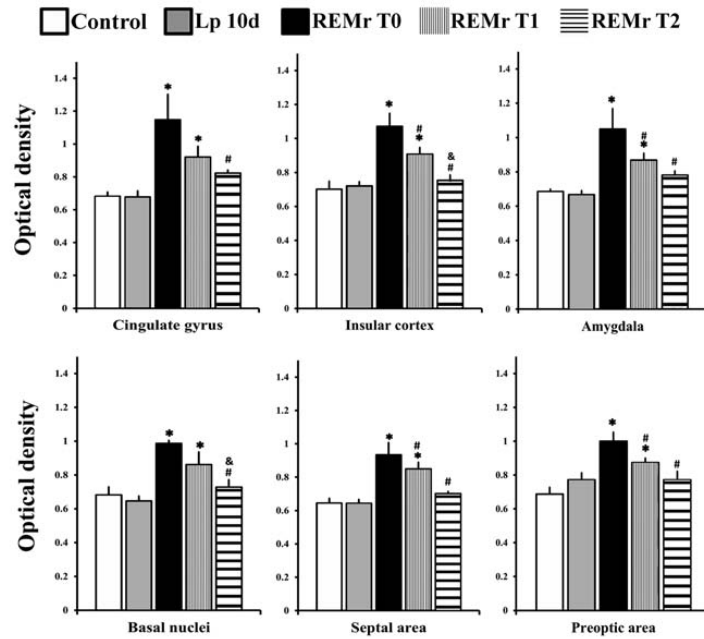


Fig. (2). Regional differences in blood-brain barrier mending associated with REM sleep recovery. Graphs show the magnitude of Evans blue extravasation (optical density units) in some brain regions with full recovery of normal blood-brain barrier permeability after 120 minutes of sleep opportunity at the home cage. mean \pm s.e.m. *significant differences as compared to controls ($p<0.05$); #significant differences as compared to T0 ($p<0.05$); & significant differences as compared to T1 ($p<0.05$).

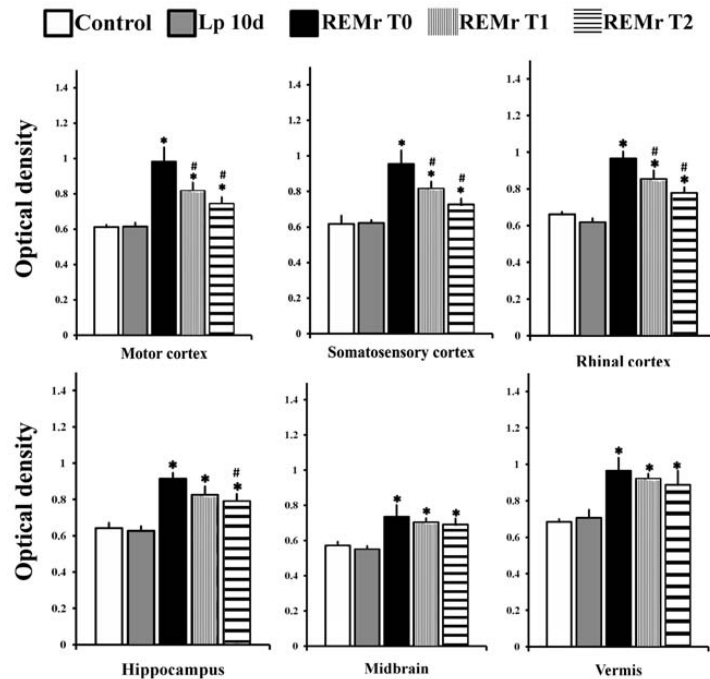


Fig. (3). Regions with poor recovery of normal blood-brain barrier permeability to Evans blue after sleep opportunity. Graphs show the magnitude of Evans blue extravasation (optical density units) in 10-day REM sleep restricted rats at 0, 40, and 120 minutes of sleep recovery as compared to intact and large platform controls. Mean \pm s.e.m. *Significant differences as compared to controls ($p<0.05$); #Significant differences as compared to T0 ($p<0.05$).

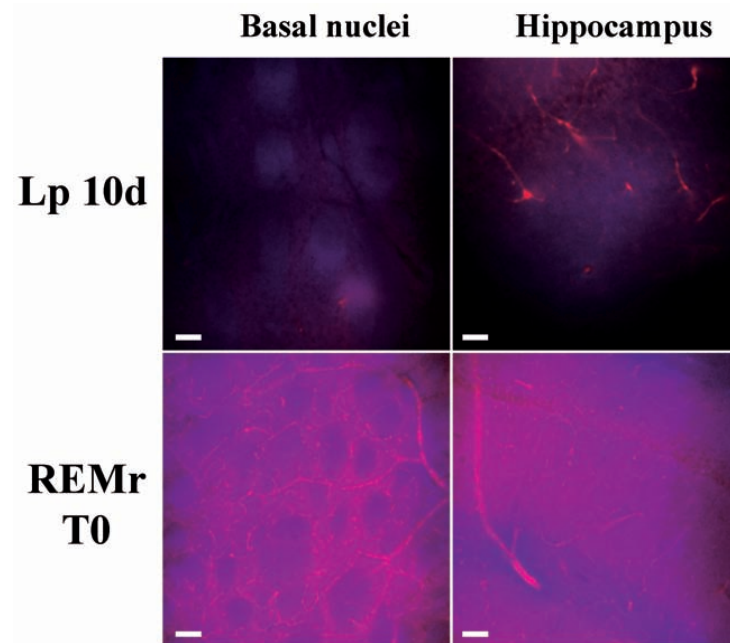


Fig. (4). Fluorescence microscopy of Evans blue extravasation in the brain. Photographs depict Evans blue deposits in brain vessels of a large platform control (Lp 10d) and large Evans blue extravasation and deposition in brain parenchyma of a REM sleep restricted (REMr T0) rat. Note Evans blue accumulation in the extracellular matrix of basal nuclei and hippocampus of a 10-day REM sleep restricted rat. Scale bar: 25 μm .

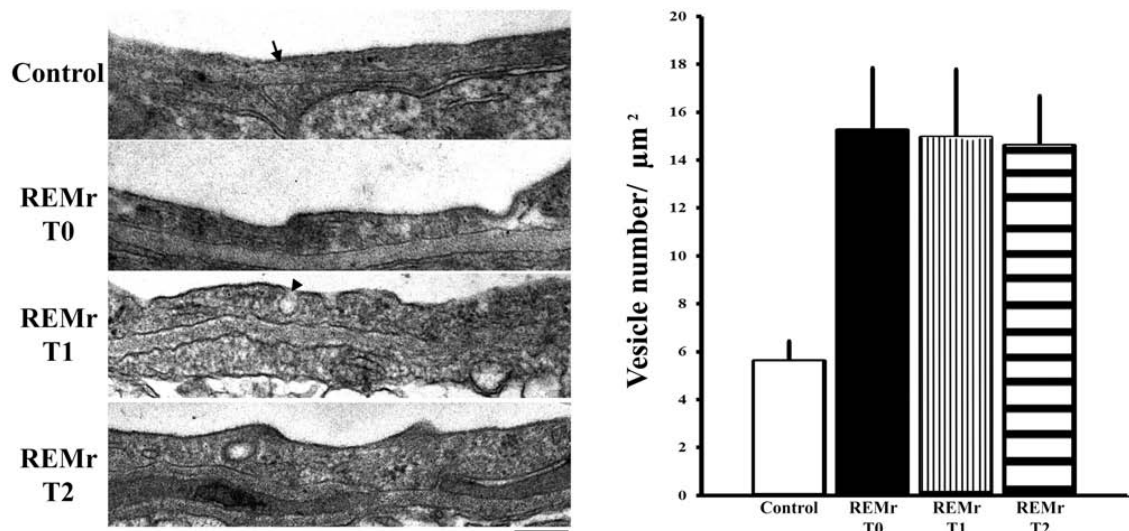


Fig. (5). Chronic REM sleep loss increases caveole density in hippocampal endothelial cells. Transmission electron microscopy of CA3 hippocampal region in the intact control (Control), 10-day REM sleep restricted rat at T0 (REMr T0), 10-day REM sleep restricted rat with 40 minutes of sleep recovery (REMr T1), and 10-day REM sleep restricted rat with 120 minutes of sleep recovery (REMr T2) showing Ω -shaped invaginations (arrowhead) and some plasmalemmal vesicles (arrow) in brain endothelial cells. The graph depicts the quantification of caveolae number per cytoplasmic area (μm^2) in capillary profiles (Control n=10; REMr T0 n=15; REMr T1 n=13; REMr T2 n=12). Mean \pm s.e.m. Scale bar: 250 nm

the intact control. In some microvessel profiles caveolae were seen as Ω -shaped cell-surface invaginations in the luminal wall (Fig. 5 arrowhead), as detached plasmalemmal vesicles near the luminal wall (Fig. 5 arrow) or in the proximity of the abluminal surface of the endothelial cells.

EEG Recording

To ascertain that the observed changes in blood-brain barrier permeability to Evans blue were a consequence of REM sleep loss and recovery, a EEG recording was carried

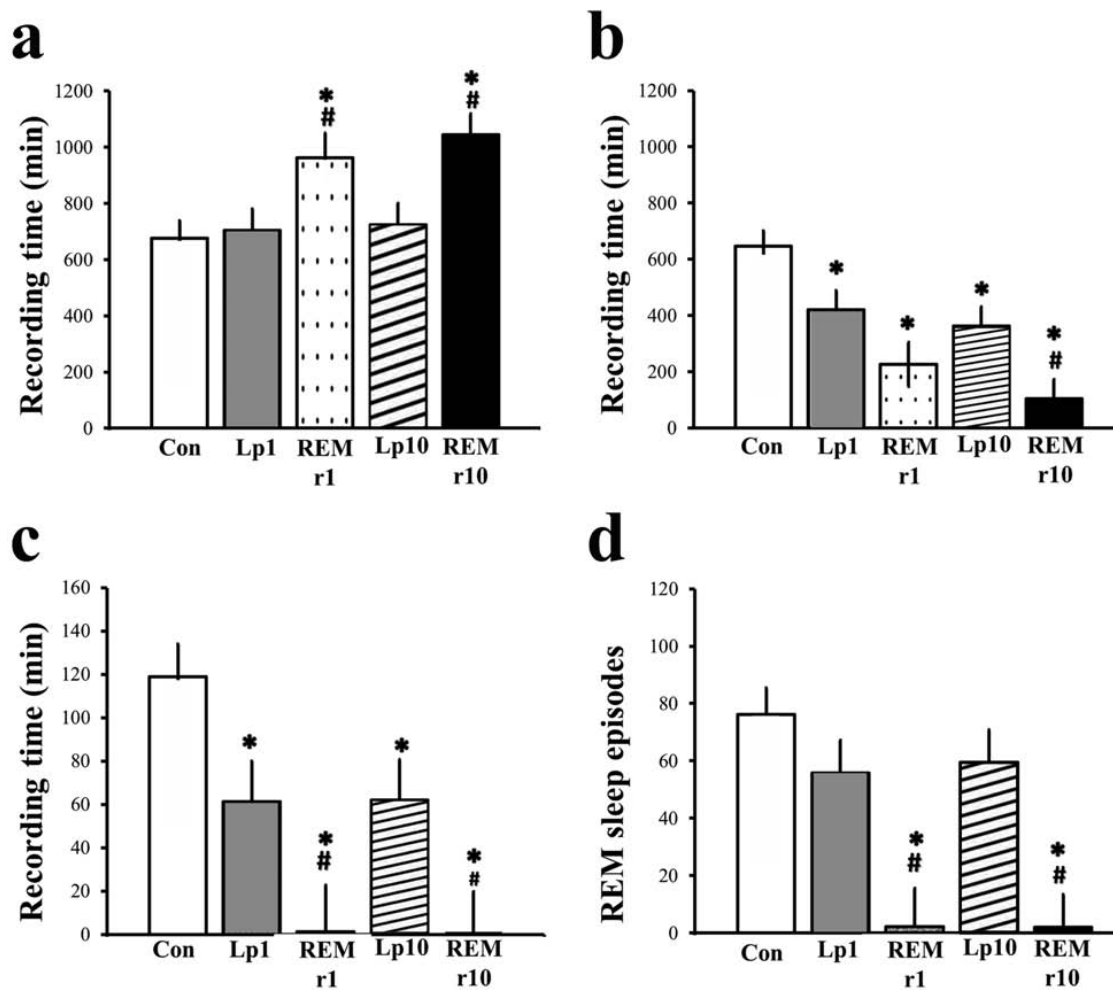


Fig. (6). Changes in sleep pattern during the period of sleep restriction in the multiple platform technique. Graphs show the waking time (a), non-REM sleep time (b), REM sleep time (c), and number of REM sleep episodes (d) in intact controls, large platform controls at days 1 and 10, and REM sleep restricted rats at days 1 and 10. Mean \pm s.e.m. *Significant differences as compared to intact control ($p < 0.05$); #Significant differences as compared to same day large platform controls.

out in the 1st and 10th day of caging in the multiple platform technique in both REM sleep restricted and large platform control groups. As it is shown in Fig. (6a) REM sleep restricted rats presented increased waking time during the 20 hours of caging in the multiple platform technique as compared to large platform and intact controls (one-way ANOVA test, experimental condition $F_{4,20}=5.145$, $P=0.007$). Regarding sleep stages, both large platform controls and REM sleep-restricted rats had diminished durations of non-REM sleep as compared to their basal recordings, although REM sleep-restricted rats had a greater loss of non-REM sleep ($F_{4,20}=10.941$, $P < 0.001$) (Fig. 6b). Only the REM sleep-restricted group showed a full suppression of REM sleep since the first day of caging in the multiple platform technique and the large platform controls presented a stable $\approx 50\%$ reduction in REM sleep duration along the 10 days ($F_{4,20}=8.056$, $P < 0.001$) (Fig. 6c). As shown in Fig. (6d), despite the reduced REM sleep time in the large platform

controls the number of REM sleep episodes was similar to the basal recording, while REM sleep episode number was largely reduced in the REM-sleep restricted group ($F_{4,20}=9.614$, $P < 0.001$).

During the 4-hour sleep opportunity period in the home-cage, both REM-sleep restricted and large platform control rats presented similar durations of non-REM sleep (Fig. 7a); the REM-sleep restricted group presented a trend toward increased REM sleep duration (REM sleep rebound) only in the 10th day of caging in the multiple platform technique as compared to the same-day large platform control ($P > 0.05$) (Fig. 7b). Both groups showed reduced sleep latencies (non-REM and REM sleep latencies) as compared to the intact controls ($F_{4,20}=4.548$, $P=0.011$), and the 10-day REM-sleep restricted rats had a trend toward a shorter REM-sleep latency than their large platform controls ($P > 0.05$) (Figure 7c and 7d). REM sleep latency in the 10th day of caging in the multiple platform technique was reduced to 31.66 ± 10.33 min

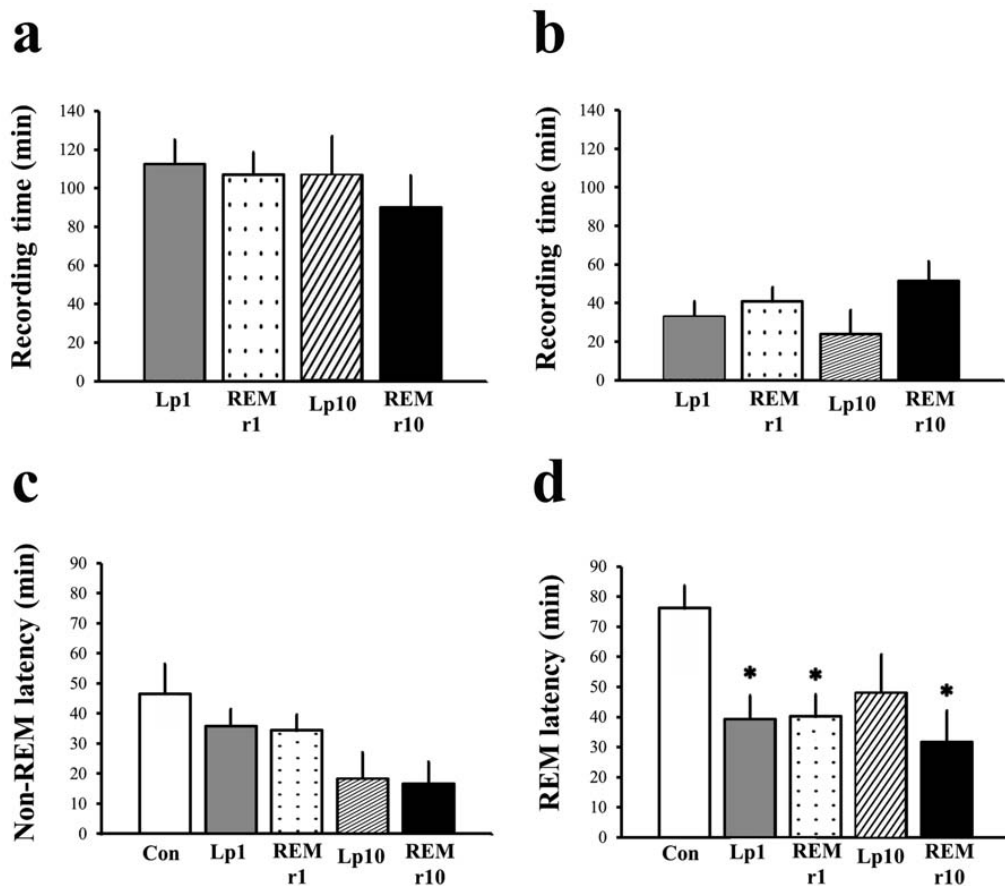


Fig. (7). Changes in sleep pattern during the 4-hour sleep opportunity period. Graphs show the non-REM sleep time (a), REM sleep time (b), non-REM sleep latency (c), and REM sleep latency (d) in intact controls, large platform controls at days 1 and 10, and REM sleep restricted rats at days 1 and 10. Mean \pm s.e.m. *Significant differences as compared to intact controls ($p < 0.05$).

in the REM-sleep restricted rats, and the mean duration of each REM sleep episode was increased from 1.525 ± 0.194 in the intact control and 1.691 ± 0.631 in the 10-day large platform control to 3.422 ± 0.516 in the 10-day REM-sleep restricted rats ($P > 0.05$).

DISCUSSION

This study aimed to elucidate REM sleep function by analyzing the effect of REM sleep loss and recovery upon blood-brain barrier permeability to a vital dye, Evans blue. Chronic REM sleep loss by subjecting rats to a protocol of 20 hours REM sleep deprivation plus 4 hours of sleep opportunity during 10 consecutive days induced a widespread breakdown of the blood-brain barrier in the whole brain. Importantly, periods of only 40 to 120 minutes of sleep opportunity in the home-cage induced a progressive recovery of blood-brain barrier permeability to Evans blue in the majority of brain regions studied; however, other regions presented a prolonged increase in blood-to-brain transfer of Evans blue despite the recovery of sleep. The route of Evans blue extravasation was related to increased caveolae

formation in brain endothelial cells. We showed that caveolae number was maintained constantly high in the hippocampus of REM sleep restricted rats at 0, 40, and 120 minutes of sleep recovery as compared to intact controls, which correlates with the maintenance of blood-brain barrier high permeability to Evans blue in that region, even after REM sleep opportunity. In addition, we showed that the multiple platform technique effectively suppressed REM sleep, and also showed that a slight REM sleep rebound, characterized by a trend toward a shorter latency and a trend toward an increased mean duration of REM sleep episodes, occurred during the period of sleep opportunity; therefore, REM sleep loss and recovery seems to be regulating blood-brain barrier permeability to Evans blue. This is the first time that blood-brain barrier function after REM sleep loss is studied and the findings here described confirm the putative blood-brain barrier-sleep relationship hypothesized by Korhonen more than 15 years ago [6].

Classically, the multiple platform technique has been shown to abolish REM sleep and reduce non-REM sleep time up to 30% over the first 24 hours; while large platform

controls present variable loss of REM sleep and around 30% reduction in non-REM sleep [19]. Those studies have also shown that after REM sleep deprivation a REM sleep rebound is observed, while large platform controls present a smaller REM sleep rebound without changes in non-REM sleep [19]. Similar to our findings, Machado et al. [27] found that REM sleep restriction during 21 days in a protocol of 18 hours in the multiple platform technique plus 6 hours of sleep opportunity in the home-cage, induced a slight REM sleep rebound during the daily 6 hours of sleep opportunity; in that study the REM sleep rebound was characterized by a trend toward a shorter REM sleep latency, an increased percentage of REM sleep, and an increased duration of REM sleep episodes beginning on day 5 of REM sleep restriction [27]. Because our REM sleep restricted rats presented full suppression of REM sleep and a REM sleep rebound on day 10, it is reasonable to assume that REM sleep full suppression and not sleep fragmentation with slight REM sleep reduction (observed in the large platform controls) accounts for the increased blood-brain barrier permeability to Evans blue.

Evans blue is a vital dye that bounds albumin when intravenously administered, therefore its passage from blood-to-brain signals the increased transport rate of albumin and other serum proteins like pro-thrombin and plasminogen [20]. Albumin is transported by adsorptive endocytosis through brain endothelial cells [28]; indeed we showed that REM sleep restriction increased pinocytotic vesicle density in hippocampal endothelial cells. Under normal physiological conditions caveolae density is around 5 vesicles/ μm^2 and chronic REM sleep loss increased caveolae density until levels observed in peripheral endothelial cells (15-20 vesicles/ μm^2) [29]. It seems that increased caveolae formation is a common mechanism underlying altered blood-brain barrier permeability by several conditions, such as chronic stress [30, 31], hyperthermia [32], acute brain injury [33], and metabolic diseases [34]. All those altered physiological conditions and sleep loss share a common inflammatory component [35, 36]. Several studies report that sleep loss upregulates molecules that may induce blood-brain barrier breakdown, including blood-flow modulators, growth factors, and inflammatory mediators; sleep loss has been shown to increase levels of endothelin-1 [37], C-reactive protein (CRP) [38], vascular endothelial growth factor (VEGF) [39], and the pro-inflammatory cytokines interleukin 1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-17 and tumor necrosis factor α (TNF α) [40].

The diversity in the regional recovery pattern of blood-brain barrier integrity after brief periods of sleep opportunity may be related to regional differences in the susceptibility to canonic molecules that participate in blood-brain barrier disruption after REM sleep restriction. Moreover, regional differences in blood-brain barrier breakdown and recovery may also arise from differences in cerebral blood-flow between brain regions; indeed, along the sleep/wake cycle local cerebral blood-flow varies from one stage to another. During REM sleep the high electrical brain activity is accompanied by concurrent changes in cerebral blood-flow [41]. In addition, a recent study shows that sleep restriction decreases cerebral blood-flow with differences from one brain region to another in humans [42].

Increased caveolae formation may promote the leakage of molecules such as albumin, pro-thrombin, plasminogen, and glutamate from blood to brain [28]; molecules that once in the brain parenchyma may induce epileptiform activity [9], neuronal apoptosis [8], and promote activation of both microglial and astroglial cells [9, 10]. The altered brain homeostasis induced by the blood-brain barrier breakdown to circulating molecules may thus constitute the underlying mechanism by which REM sleep deprivation decreases neurogenesis in the hippocampus [11, 12], induces neuronal cell death in the sleep-related brain stem nuclei [14], increases glutamate concentration in brain parenchyma [13], and alters learning and other behavioral processes in both rodents and humans [43]. In conclusion, this study clearly shows that REM sleep regulates the physical and chemical barrier properties of the blood-brain barrier.

LIST OF ABBREVIATIONS

Abbreviations in the Manuscript

EEG	=	electroencephalography
IL	=	interleukin
REM	=	rapid eye movement sleep
TNF	=	tumor necrosis factor

Abbreviations in the Figures

CG	=	Cingulate gyrus
MCx	=	Motor cortex
SCx	=	Somatosensory cortex
ICx	=	Insular cortex
RCx	=	Retrosplenial cortex
VCx	=	Visual cortex
ACx	=	Auditory cortex
RhCx	=	Entorhinal cortex
HP	=	Hippocampus
BN	=	Basal nuclei
SA	=	Septal area
PA	=	Preoptic area
M	=	Midbrain
A	=	Amygdala
Cer	=	Cerebellum
V	=	Vermis of cerebellum
MO	=	Medulla oblongata
REMr	=	REM sleep restriction

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Edith Monroy for her expert review of the language of the manuscript.

To Dr. José David Sepúlveda and Jorge Sepúlveda for their valuable help in processing hippocampal blocks for transmission electron microscopy and for their valuable help in the acquisition of the transmission electron microscopy images.

To Dr. Fernando García Hernández for kindly providing access to the Microscopy Laboratory of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

To Dr. Guadalupe Flores Cruz for kindly providing access to the epifluorescence microscope in the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Partially supported by Grant 14412025 from CONACyT-SEP to BGG and by CONACyT master fellowship to GHA.

REFERENCES

- [1] Siegel JM. Do all animals sleep? *Trends Neurosci* 2010; 31: 208-213.
- [2] Datta S, MacLean RR. 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.
- [3] Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep* 2002; 25: 18-24.
- [4] Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 1989; 12: 68-87.
- [5] Gómez-González B, Domínguez-Salazar E, Hurtado-Alvarado G, *et al.* Role of sleep in the regulation of immune system and the pituitary hormones. *Ann NY Acad Sci* 2012; 1261: 97-106.
- [6] Korth C. A co-evolutionary theory of sleep. *Med. Hypoth* 1995; 45: 304-310.
- [7] Gómez-González B, Sánchez-Alegria K, Velázquez-Moctezuma J. From blood-to-brain: regulating the permeability of the blood-brain barrier. *Curr. Psychopharmacol* 2012; 1: 214-227.
- [8] Gingrich MB, Traynelis SF. Serine proteases and brain damage – is there a link? *Trends Neurosci* 2000; 23: 399-407.
- [9] Tomkins O, Friedman O, Ivens S, *et al.* Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Dis* 2007; 25: 367-377.
- [10] Hooper C, Pinteaux-Jones F, Fry VAH, *et al.* Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *J Neurochem* 2009; 109: 694-705.
- [11] Guzman-Marin R, Suntsova N, Bashir T, Nienhuis R, Szymusiak R, McGinty D. Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep* 2008; 31: 167-175.
- [12] Mueller AD, Pollock MS, Lieblich SE, Epp JR, Galea LA, Mistlberger RE. Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: 1693-1703.
- [13] Mohammed HS, Aboul HS, Khadrawy YA, Noor NA. Neurochemical and electrophysiological changes induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Behav Brain Res* 2011; 225: 39-46.
- [14] Biswas S, Mishra P, Mallick BN. Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience* 2006; 142: 315-331.
- [15] Esposito P, Gheorghe D, Kandere K, *et al.* Acute stress increases permeability of the blood-brain barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res* 2001; 888: 117-127.
- [16] National Research Council. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. Washington DC: The National Academies Press, 2010.
- [17] Rasband WS. ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2010, available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/1997-2010>.
- [18] Coenen AM, van Luijtelaar EL. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiol Behav* 1985; 35: 501-504.
- [19] Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 2004; 1004: 45-51.
- [20] Freedman FB, Johnson JA. Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. *Amer J Physiol* 1969; 216: 675-681.
- [21] Gómez-González B, Escobar A. Altered functional development of the blood-brain barrier after early life stress in the rat. *Brain Res. Bull* 2009; 79: 376-387.
- [22] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press-Elsevier, San Diego, 1998.
- [23] Fry DL. Aortic Evans blue dye accumulation: its measurement and interpretation. *Amer J Physiol* 1977; 232: H204-H222.
- [24] LaMack JA, Humberg HA, Friedman HM. Effect of hypercholesterolemia in transendothelial EBD-albumin permeability and lipid accumulation in porcine iliac arteries. *Atherosclerosis* 2006; 184: 255-263.
- [25] Timo-Iaria C, Negro N, Schmidek WR, *et al.* Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav* 1970; 5: 1057-62.
- [26] Huck SW. Fully repeated measures analyses of variance. In: Huck SW, Ed. *Reading statistics and research*. New York: Longman, 2000, pp. 467-500.
- [27] Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Comparison of the sleep pattern throughout a protocol of chronic sleep restriction induced by two methods of paradoxical sleep deprivation. *Brain Res. Bull* 2006; 70: 213-220.
- [28] Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729-736.
- [29] Nag S. Morphology and properties of brain endothelial cells. *Methods Mol Biol* 2011; 686: 3-47.
- [30] Nag S, Kapadia A, Stewart DJ. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 3-23.
- [31] Sharma HS, Westman J, Navarro JC, Dey PK, Nyberg F. Probable involvement of serotonin in the increased permeability of the blood-brain barrier by forced swimming. An experimental study using Evans blue and 131I-sodium tracers in the rat. *Behav Brain Res* 1995; 72: 189-196.
- [32] Gómez-González B, Escobar A, Merchant-Larios H. Increased transvascular transport of WGA-peroxidase after chronic perinatal stress in the hippocampal microvasculature of the rat. *Int. J. Devel. Neurosci* 2011; 29: 839-846.
- [33] Kiyatkin EA, Sharma HS. Permeability of the blood-brain barrier depends on brain temperature. *Neurosci* 2009; 161: 926-939.
- [34] Acharya NK, Levin EC, Clifford PM, *et al.* Diabetes and hypercholesterolemia increase blood-brain barrier permeability and brain amyloid deposition: beneficial effects of the LpPLA2 inhibitor Darapladib. *J Alzheimers Dis* 2013; 35: 179-198.
- [35] Jaiswal MK, Mallick BN. Prazosin modulates rapid eye movement sleep deprivation-induced changes in body temperature in rats. *J Sleep Res* 2009; 18: 349-56.
- [36] Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK. Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 51: 294-302.
- [37] Weil BR, Mestek ML, Westby CM, *et al.* Short sleep duration is associated with enhanced endothelin-1 vasoconstrictor tone. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88: 777-781.
- [38] Jackowska M, Kumari M, Steptoe A. Sleep and biomarkers in the English Longitudinal Study of Ageing: Associations with C-reactive protein, fibrinogen, dehydroepiandrosterone sulfate and hemoglobin. *Psychoneuroendocrinology* 2013 (in press) doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.12.015.
- [39] Ibrahim L, Duncan W, Luckenbaugh DA, Yaun P, Machado-Vieira R, Zarate CA Jr. Rapid antidepressant changes with sleep deprivation in major depressive disorder are associated with changes in vascular endothelial growth factor (VEGF): a pilot study. *Brain Res Bull* 2011; 86: 129-133.

REM Sleep Regulates Blood-Brain Barrier Function*Current Neurovascular Research, 2013, Vol. 10, No. 3 207*

- [40] Yehuda S, Sredni B, Carasso RL, Kenigsbuch-Sredni D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J Interf Cytok Res* 2009; 29: 393-398.
- [41] Abrams RM, Post JC, Burchfield DJ, Gomez KJ, Hutchison AA, Conlon M. Local cerebral blood flow is increased in rapid-eye-movement sleep in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 278-81.
- [42] Poudel GR, Innes CR, Jones RD. Cerebral perfusion differences between drowsy and nondrowsy individuals after acute sleep restriction. *Sleep* 2012; 35: 1085-96.
- [43] Meerlo P, Sgoifo A, Suchecki D. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med Rev* 2008; 12: 197-210.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00115

Matrícula: 2113801355

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL INCREMENTO DE LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFALICA DESPUES DE LA RESTRICCIÓN CRÓNICA DE SUEÑO MOR

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 20 del mes de agosto del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. EMILIO DOMINGUEZ SALAZAR
DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ
DRA. JANET MURBARTIAN AGUILAR
DR. LENIN PAVON ROMERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GABRIELA HURTADO ALVARADO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Gabriela Hurtado Alvarado

GABRIELA HURTADO ALVARADO
ALUMNA

REVISÓ

Julio César de Lara Isassi
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

Ruben Roman Ramos
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

Emilio Dominguez Salazar
DR. EMILIO DOMINGUEZ SALAZAR

VOCAL

Beatriz Gomez Gonzalez
DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

VOCAL

Janet Murbartian Aguilar
DRA. JANET MURBARTIAN AGUILAR

SECRETARIO

Lenin Pavon Romero
DR. LENIN PAVON ROMERO