

# REGULACIÓN DEL SUEÑO EN LA RATA.

## Transplantes en el Sistema Nervioso

María Fernanda Zavala Reynoso<sup>1</sup>  
Claudia Guadalupe Castillo Martín del Campo<sup>2</sup>  
Juan Mena Segovia<sup>2</sup>  
María Magdalena Giordano Noyola<sup>2</sup>

### RESUMEN

En este trabajo se evaluó la localización y condición de células productoras de GABA transplantadas en el Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino (NTPP) de la rata albina. Se realizaron las técnicas de violeta de cresilo, observación con microscopía de fluorescencia con el marcador bisbenzimidida, inmunohistoquímica para glutamato descarboxilasa (GAD67) y NADPH diaforasa, para la observación de células inmortalizadas productoras de ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) utilizadas para el transplante en el NTPP de la rata albina.

Los resultados obtenidos fueron favorables, ya que se pudo observar que las células GABAérgicas inmortalizadas

presentan una buena apariencia en los animales transplantados.

Dado que el NTPP juega un papel importante en la regulación del sueño, se prepararon animales para llevar a cabo un registro electrocorticográfico. Para ello se realizaron implantes de electrodos en el cerebro de la rata.

### INTRODUCCIÓN

Los transplantes neuronales permiten tanto el estudio de aspectos anatómicos y funcionales del cerebro durante el desarrollo, diferenciación y regeneración de diferentes sistemas neuronales, como resaltar la importancia de estructuras o sistemas de neurotransmisión en diversas funciones o patologías (Emerich, D.F., 1998). Existen marcadores histológicos o bioquímicos naturales que permiten diferenciar las células transplantadas y seguir su migración en el cuerpo de los organismos (Brailowsky & Stein, 1992). En este experimento se utilizó el marcador bisbenzimidida como una de las

técnicas utilizadas para la observación de las células transplantadas.

Los transplantes de células productoras de GABA se hicieron en el Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino, el cual es un núcleo pequeño que se encuentra ubicado en la región superior del tallo cerebral y guarda relación aferente con los ganglios basales, entre muchas otras estructuras (Parent & Hazrati, 1995). A este núcleo se le ha relacionado con el despertamiento tálamo-cortical, que se traduce en una regulación de la vigilia y el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) (Steriade, 1992), la locomoción (García-Rill *et al*, 1987), la cognición (Steckler, 1992) y la conducta de recompensa (Steininger *et al*, 1997). El inicio del sueño a partir de la vigilia está determinado por una serie de factores que conllevan la sincronización de la actividad eléctrica cerebral. En el ciclo sueño-vigilia el cerebro pasa de un estado de alerta, capaz de integrar señales externas, a un estado en el cual permanece relativamente aislado del ambiente exterior (Hobson, 1999).

1 Exbecaria del Tercer Verano de la Ciencia de la Región. Estudiante de Octavo Semestre de Biología, UAA.

2 Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla.

## EXPERIMENTO I

### Material y Métodos

Los cerebros de las ratas macho albinas que se usaron en este experimento y que fueron sometidos a diferentes técnicas histológicas, pertenecían a la cepa Sprague-Dawley; estas ratas fueron transplantadas con células de la línea celular M213-20 cl-4 previamente transfectadas con el ADN complementario de la enzima glutamato descarboxilasa 67 humana, e inmortalizadas por la incorporación del alelo tsA58 del antígeno T grande del SV40. Las células fueron marcadas con bisbenzimidida para su posterior observación por microscopía de fluorescencia. Los trasplantes fueron realizados bilateralmente por medio de la técnica estereotáxica, utilizando las coordenadas +2.0 anteroposterior, +/-2.0 mediolateral y +/-2.8 dorsoventral (interaural) de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986).

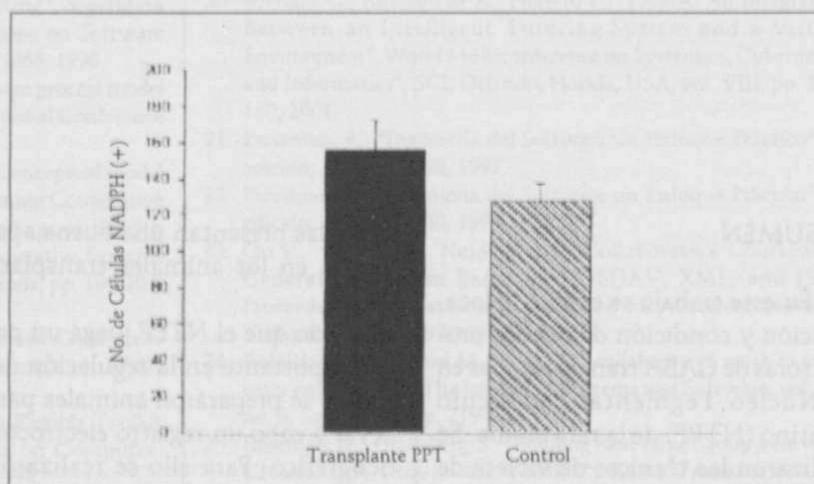
### Histología:

Para el análisis histológico del grupo transplantado con la suspensión celular se anestesiaron las ratas con una sobredosis de pentobarbital (>50 mg/kg) y fueron perfundidas por vía intracardiaca con solución salina (0.9%) seguido por paraformaldehído (4%) en amortiguador de fosfatos (0.1M pH 7.4). Se obtuvo el cerebro y se mantuvo en solución postfijadora (paraformaldehído 4%) durante 24 hrs. y posteriormente se almacenó en sacarosa al 35% a 4°C. Se realizaron cortes de los cerebros (40 µm) a nivel del NTPP en el microtomo. Posteriormente, se realizaron varias técnicas histológicas, tales como: tinción con violeta de cresilo, inmunocitoquímica para GAD, histoquímica para NADPH-diaforasa y marcado fluorescente con bisbenzimidida (descritas en el apéndice I) para observar el lugar del trasplante y para la realización del

conteo celular. Posteriormente, se realizó el conteo de las células transplantadas en la región del NTPP y se llevó a cabo la estadística correspondiente.

### Resultados

Las células transplantadas fueron observadas gracias a las diferentes técnicas realizadas. Los resultados fueron favorables ya que las células marcadas con bisbenzimidida se localizaron en la región deseada, el NTPP. Posteriormente, se realizó el conteo de las células positivas para NADPH-diaforasa en las ratas transplantadas y en las control (ratas transplantadas sólo con medio de cultivo) y al compararlas no se observó una diferencia importante, ya que todas las células están en un rango de entre 95-160 células en el lugar del trasplante (Gráfica 1).



GRAFICA 1. Comparación del número de células en la rata albina transplantada y control.

## EXPERIMENTO II

### Material y Métodos

Se realizaron implantes de electrodos en el cerebro de la rata albina macho, con el fin de registrar y estudiar posteriormente la actividad cerebral durante el ciclo sueño-vigilia. El primer paso fue la fabricación de cánulas y electrodos por medios de los cuales se evaluará la actividad cerebral, los electrodos fueron hechos con 5 pines (2 conectados a la corteza cerebral, 2 conectados al músculo y 1 para la tierra) y un tornillo, esto con el fin de registrar la

actividad tanto del cerebro como de los movimientos que realiza el animal durante el ciclo sueño-vigilia. Posteriormente, se realizaron los implantes en cuatro ratas basándose en el manual de laboratorio de Skinner, J.E. (1975): primero se pesó a la rata para la determinación de la dosis de anestésico barbitúrico; una vez que el animal estuvo anestesiado, se le afeitó la parte superior de la cabeza para reducir al mínimo la posibilidad de una infección y para facilitar la intervención quirúrgica; enseguida se montó al animal en el estereotáxico sujetándole la cabeza

por los conductos auditivos y por el maxilar superior con el fin de mantener la cabeza inmóvil, después se procedió a hacer una incisión para dejar visible el cráneo, se localizaron las suturas craneales bregma y lambda y se hizo el marcaje para el barrenado de los trépanos en los cuales se colocaron los tornillos, se utilizaron las coordenadas +1.5 anteroposteior, +/- mediolateral y -

4.5 dorsoventral con respecto a bregma; enseguida se hicieron cuatro trépanos en los cuales se colocaron tornillos, y dos más para las cánulas, se les colocóacrílico para fijarlas bien al cráneo y se colocó el electrodo insertando los cables en las partes correspondientes, se fijó conacrílico y se suturó la incisión. La rata se dejó recuperar bajo luz para mantener la temperatura corporal constante.

### Resultados

Los implantes de electrodos en el cerebro de la rata se realizaron sin ningún problema. Los electrodos y las cánulas fueron bien fabricados, ya que se pudieron implantar de una manera adecuada en la corteza cerebral y en el músculo. Esto permitirá que el electroencefalograma registre correctamente la actividad cerebral de la rata durante el ciclo sueño-vigilia.

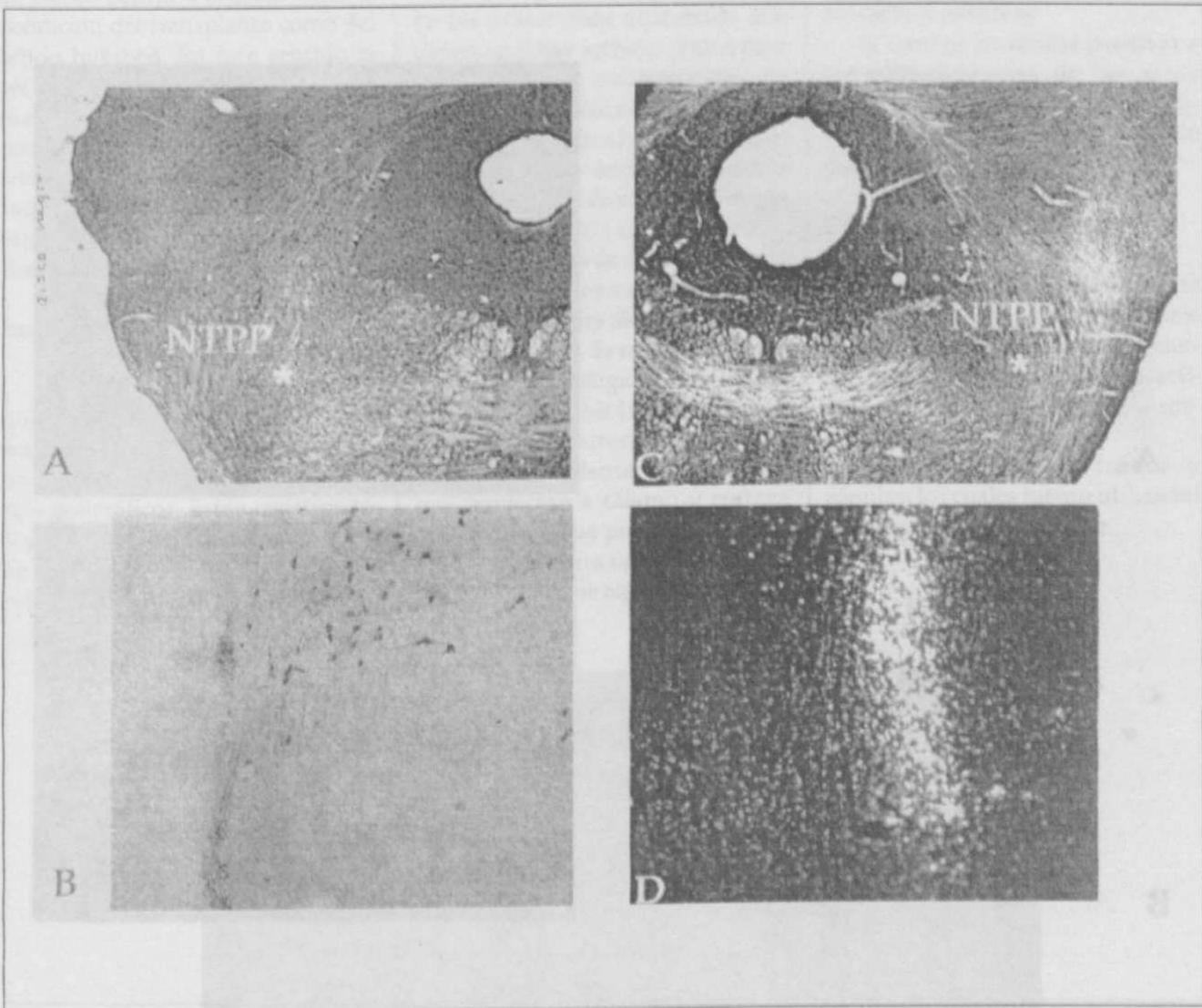


FIGURA 1. Cortes del NTPP para mostrar las diferentes técnicas histológicas.

A, localización anterior del Núcleo Tegmental pedúnculo Pontino con la técnica de violeta de cresilo; B, células transplantadas con la técnica de NADPH diaforasa donde se observan también las células marcadas con bisbenzimidida en la parte inferior izquierda; C, localización posterior del Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino con la técnica de inmunohistoquímica para GAD; D, células marcadas con bisbenzimidida en el lugar del transplante, y vistas por microscopía de fluorescencia.

DISCUSIÓN

Experimento I

Delgado, *et al* (1998) menciona que la aplicación de la inmunocitoquímica ha permitido ir más allá de la mera estructura haciendo posible el avance en el conocimiento de la localización y caracterización química

de poblaciones neuronales y de su imbricación en los circuitos cerebrales. Esto se pudo comprobar en este experimento ya que esta técnica nos permitió observar las células en el lugar del trasplante, incubando el tejido con una solución de anticuerpo primario que, como menciona este autor, se une a la molécula que se desea identificar, y después con

un anticuerpo secundario, que a su vez reconoce el anticuerpo primario. Este mismo autor nos dice que la obtención de anticuerpos contra neurotransmisores, o sus enzimas, ha permitido ubicar y caracterizar morfológicamente poblaciones neuronales que expresan un determinado neurotransmisor, la enzima productora de GABA.

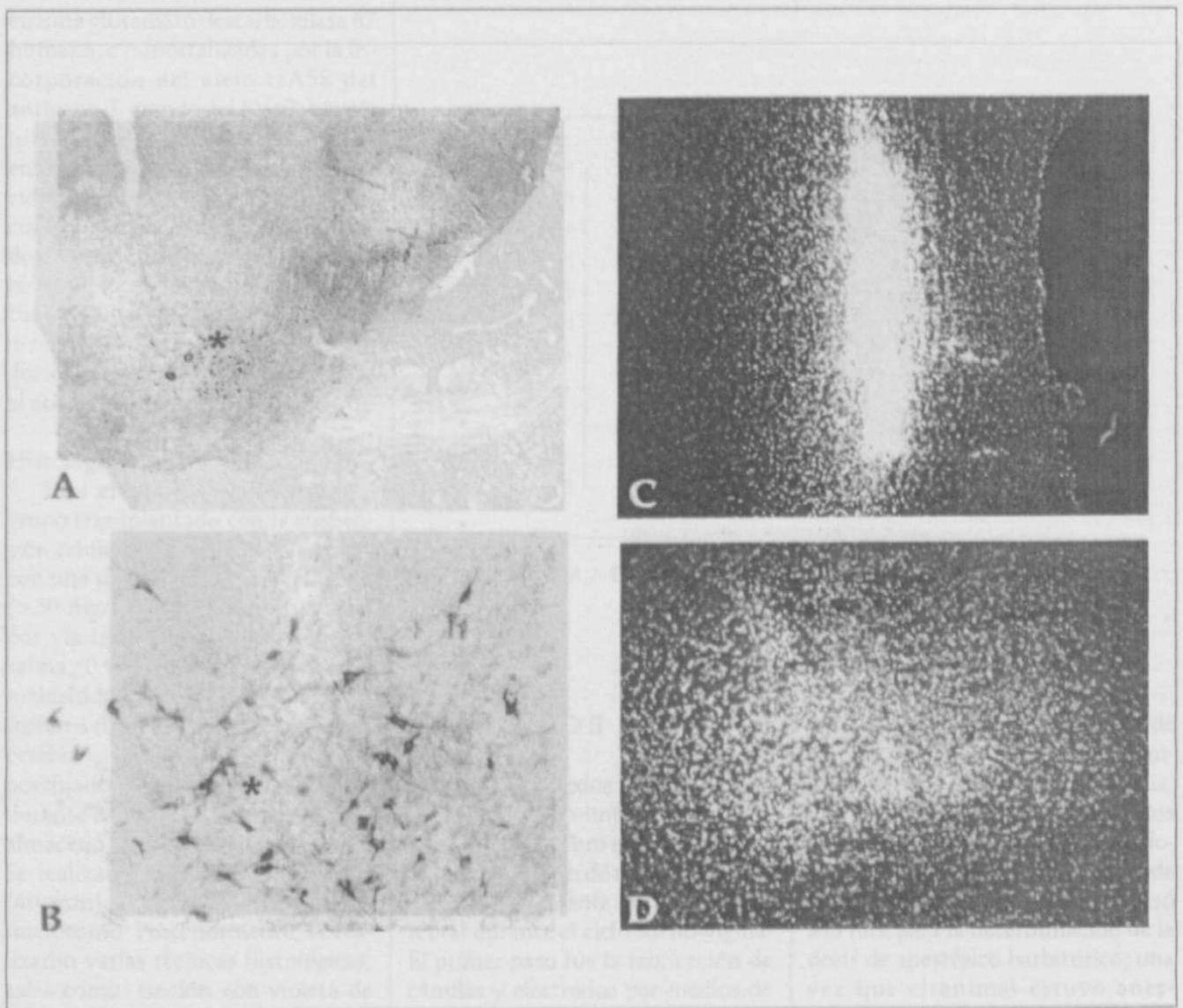


FIGURA 2. Cortes del NTPP para mostrar el lugar del trasplante.

A, células transplantadas en el Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino; B, se muestran las mismas células a un mayor aumento; C, microscopía de fluorescencia que muestra al trasplante marcado con bisbenzimidida fuera del Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino; D, microscopía de fluorescencia que muestra al trasplante marcado con bisbenzimidida en el Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino.

Por otro lado, la utilización del marcador bisbenzimidá al momento del trasplante permitió, gracias a la microscopía de fluorescencia, observar el lugar del trasplante y la migración de algunas células después de la operación. Esto fue de gran ayuda ya que se puede tener la certeza de que el trasplante fue realizado en el núcleo tegmental pedúnculo pontino y no en otra área del cerebro.

Asimismo, la técnica de violeta de cresilo permitió evaluar tanto la condición del trasplante como del tejido huésped. En este sentido la técnica histoquímica de NADPH-diaforasa indicó que no hubo diferencias en esta población celular entre los animales transplantados e intactos. Este resultado indica que el tejido huésped no fue afectado de manera adversa por el trasplante.

### Experimento II

Delgado, *et al* (1998) menciona que para la caracterización desde el punto de vista electrográfico del sueño y sus etapas se utilizan los registros poligráficos. Estos registros recogen simultáneamente indicadores de sueño, como lo son el electroencefalograma (para la actividad eléctrica

cerebral), el electroculograma (para los movimientos oculares) y el electromiograma (para la actividad muscular antigravitatoria). En este experimento se pretende evaluar la actividad electroencefalográfica y electromiográfica, por medio del polígrafo, durante el ciclo sueño-vigilia de la rata albina. El mismo autor menciona que los estados de vigilia y del sueño responden a la actuación e interrelación de poblaciones celulares del sistema nervioso central. En las poblaciones neuronales que tienen un papel activo y crítico para la generación de estos estados operan distintos sistemas de neurotransmisores. Respecto a las relaciones del GABA y el sueño lento, se considera que la actuación de este neurotransmisor puede ir más allá de la generación de los husos de sueño, ya que la proporción de neuronas que contienen GABA es muy alta en el sistema nervioso central. Es muy posible que neuronas GABAérgicas sean las encargadas de inhibir la transmisión y actividad de neuronas del sistema reticular ascendente de activación que proyectan a tálamo y corteza cerebral para que pueda aparecer el sueño. Es por esta razón que se cree que el NTPP tiene alguna relación en

la regulación de la vigilia y el sueño, ya que este núcleo recibe inervación de neuronas GABAérgicas.

## CONCLUSIONES

### Experimento I

Las técnicas utilizadas en este proyecto fueron de gran importancia para la localización de la población celular transplantada, así como para calcular el número de células NADPH-d positivas.

El total de las células positivas a NADPH-diaforasa de las ratas transplantadas y el de las ratas control a partir del nivel marcado osciló entre las 95 y 160 células.

### Experimento II

Se implantaron favorablemente cuatro electrodos en la superficie superior de la cabeza, para posteriormente realizar el registro de la actividad cerebral durante el ciclo sueño-vigilia de la rata albina.

Se fabricaron electrodos y cánulas, los cuales fueron utilizados en las cirugías de implante.



**APÉNDICE**  
**TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**

**Violeta de Cresilo:**

1. Montar los cortes histológicos en portaobjetos previamente gelatinizados y déjense secar de 3 a 5 días.
2. Incubar los cortes en clorofórmico absoluto durante 30 minutos bajo la campana de extracción.
3. Pasar los cortes por las siguientes soluciones:
  - a) Alcohol 25% 2 min.
  - b) Violeta de cresilo 7 min. (0.25 g. en 100 ml de alcohol al 25%).
  - c) Alcohol 50% 30 seg.
  - d) Alcohol 70% 5 min.
  - e) Solución diferenciadora (300 ml de alcohol al 70% con 10 gotas de ácido acético) hasta que vire el color.
  - f) Alcohol 95% 1 min.
  - g) Alcohol absoluto 1 min.
  - h) Alcohol: Xilol 2 min.
  - i) Xilol 2 min.
4. Cubrir los cortes con resina y observar al microscopio.

**Inmunohistoquímica para GAD:**

1. Someter los cortes a 4 lavados de 10 min. en TBS.
2. Pasar a Borohidrato de sodio 0.5% durante 15 min.
3. Repetir el paso 1.
4. Pasar a 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en TBS por 30 min.
5. Repetir el paso 1.
6. Pasar a 1% DMSO en TBS durante 10 min.
7. Repetir el paso 1.
8. Pasar a 3% Suero en TBS durante 30 min.
9. Hacer 2 lavados de 10 min. en TBS.

**Anticuerpo primario**

10. Poner en una dilución 1:1000 de GAD en 1% Suero en TBS. Agitar durante 48 hrs. a 4°C.

11. Hacer 4 lavados de 15 min. en TBS.
12. Incubar con ABC a temperatura ambiente durante 90 min.
13. Repetir el paso 11.
14. Incubar con DAB durante 10 minutos o hasta ver que ya reaccionó.
15. Hacer 4 lavados de 10 min. en TBS.
16. Observar al microscopio.

**Histoquímica para NADPH-diaforasa:**

1. Los cortes se enjuagan tres veces en un frasco de centelleo con una solución de Tris-HCl 0.1 M sustrayendo el exceso del Tris-HCl en cada enjuagada.
2. Pasar los cortes a la solución de reacción e incubar a 37°C a Baño María durante 90 minutos con agitación constante.
3. Al finalizar la reacción enjuagar los cortes con agua destilada y montar en portaobjetos previamente gelatinizados, se dejan secar y se cubren con permount y cubreobjetos.

**Bisbenzimida:**

1. Se preparan las células a transplantar y se realiza el conteo.
2. Se resuspenden las células en un volumen adecuado de medio de cultivo con una concentración de 5 mm de bisbenzimida.
3. Se incuban a 39.9°C por 30 minutos.
4. Se centrifugan y se hacen 3 lavados con medio de cultivo completo.
5. Se resuspenden en un volumen de medio adecuado para obtener una concentración de 400,000 cel/ml o la concentración adecuada.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Brailowsky S. y Stein, D.G. "El Cerebro Averiado. Plasticidad Cerebral y Recuperación Funcional", Fondo de Cultura Económica, México, 140-166, 1992.
- Delgado, J.M., et al. "Manual de Neurociencia", Síntesis, España, 802-821, 1998.
- Emerich, D.F. y Granholm, L., "Recent advances in neural transplant research. Cell Transplantation", Vol. 7, No. 2: 83-85, 1998.
- García-Rill, E., et al., "Posterior midbrain-induced locomotion", Brain Res., 24, 499-508, 1990.
- Hobson, J.A., "Fundamental Neuroscience", Academic Press, San Diego, 1207-1227, 1999.
- Parent, A., y Hazrati, L.N., "Functional anatomy of the basal ganglia-thalamo-cortical loop", Brain Res., 20, 91-127, 1995.
- Paxinos, G. y Watson, Ch., "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates", Academic Press, Inc. E.U.A., 1986.
- Skinner, J.E., "Neurociencia. Manual de Laboratorio", Trillas, México, 103-135, 1975.
- Steckler, T., et al., "The pedunculopontine tegmental nucleus: a role in cognitive processes?", Brain Res., 19, 298-318, 1984.
- Steriade, M., "Basic Mechanisms of sleep generation", Neurology, 42, 9-17, 1992.