

## Adenosina y control homeostático del sueño. Acciones en estructuras diana de los circuitos de vigilia y sueño

Marta Carús-Cadavieco, Isabel de Andrés

**Resumen.** La homeostasis del sueño se manifiesta ante situaciones de vigilia prolongada de forma natural o experimentalmente. En estos casos, se presenta somnolencia (o presión de sueño) y, cuando se permite dormir, hay un rebote del sueño en duración e intensidad que compensa la pérdida del mismo. Entre las moléculas que pueden intervenir en la regulación homeostática del sueño, se encuentra la adenosina, cuyos antagonistas, la cafeína y la teofilina, consume la población humana ampliamente como estimulantes. La adenosina es un factor endógeno resultante del metabolismo del ATP en neuronas y glía que se acumula en el medio extracelular y que es capaz de ejercer acciones reguladoras sobre circuitos del ciclo vigilia sueño. Actúa a través de los receptores purinérgicos  $A_1$  y  $A_2$ . En este trabajo se presenta una revisión de las vías metabólicas de la adenosina cerebral y de su liberación por neuronas y glía, y se exponen las acciones de la adenosina y de sus antagonistas en regiones del sistema nervioso central de naturaleza hipnagénica y relacionadas con la vigilia. Se exponen, además, los mecanismos sinápticos involucrados en estas acciones.

**Palabras clave.** Acetilcolina. Hipotálamo. Orexinas/hipocretinas. Proscéfalos basales. Receptores purinérgicos.

### Introducción: control homeostático del sueño

El sueño y la vigilia son estados interdependientes que presentan mecanismos fisiológicos para mantener un equilibrio dinámico entre sus proporciones, existe pues una regulación homeostática entre estos estados que se pone especialmente de manifiesto en situaciones de privación de sueño. En estas condiciones, se expresan dos procesos reguladores, como son la presión de sueño y el sueño de recuperación o rebote.

La presión de sueño es la necesidad imperiosa de dormir a medida que progresa la privación o crece el periodo de vigilia. El sueño de rebote es aquel que, tras la privación, se manifiesta en exceso y que compensa la pérdida del mismo. La vigilia previa está también directamente relacionada con la intensidad del sueño de recuperación, intensidad que se expresa por un aumento de la potencia de las ondas  $\delta$  del sueño no REM (NREM) profundo. Además, no sólo aumenta de forma generalizada potencia  $\delta$  en el electroencefalograma, se ha demostrado también que la potencia  $\delta$  aumenta específicamente en las áreas corticales que han tenido una mayor actividad durante la vigilia previa [1].

¿Qué factores contribuyen a que haya un control homeostático del sueño?

Aunque el sueño y la vigilia tienen circuitos neuronales propios para su generación, también es cierto que, en la vigilia, una mayor actividad neuro-

nal conlleva un mayor metabolismo y se ha demostrado que éste causa una acumulación proporcional de factores metabólicos que pueden influir en el sueño. La acumulación de estos factores metabólicos hasta un nivel crítico estaría implicada en la iniciación del sueño, específicamente al promover el sueño NREM; durante el sueño, estos metabolitos se reducirían a niveles basales [2]. Entre las moléculas que cumplen estas condiciones se encuentra la adenosina. La cafeína y la teofilina, de amplio consumo por parte de la población humana como estimulantes [3], son potentes bloqueadores de los receptores de adenosina.

El presente trabajo tiene como objetivo examinar las fuentes de la adenosina en el sistema nervioso central y sus acciones como compuesto implicado en la homeostasis del sueño al analizar sus acciones comportamentales y sinápticas cuando interaccionan con regiones del sistema nervioso de naturaleza hipnagénica y relacionadas con la vigilia.

### Transmisión purinérgica

El trifosfato de adenosina o adenosintrifosfato (ATP) es la molécula utilizada por los organismos vivos como fuente de energía. La molécula está formada por una base purinérgica (adenina) unida a un azúcar pentosa, a la que también se unen tres grupos fosfato con enlaces de alta energía entre sí (Fig. 1).

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Universidad Autónoma de Madrid. Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IDIPAZ). Madrid, España.

#### Correspondencia:

Dra. Isabel de Andrés. Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Arzobispo Morcillo, 4. E-28029 Madrid.

#### Fax:

+34 914 975 338.

#### E-mail:

isabel.deandres@uam.es

#### Financiación:

Ayuda FPU2009-06991 del Ministerio de Ciencia e Innovación. M.C.C. tiene una beca de iniciación de estudios de posgrado concedida por la Universidad Autónoma de Madrid.

#### Agradecimientos:

A Basilio Cáceres e Iñigo Arsuaga, por su ayuda durante la elaboración de este trabajo.

#### Aceptado tras revisión externa:

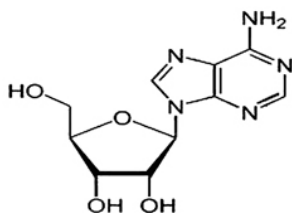
17.07.12.

#### Cómo citar este artículo:

Carús-Cadavieco M, De Andrés I. Adenosina y control homeostático del sueño. Acciones en estructuras diana de los circuitos de vigilia y sueño. Rev Neurol 2012; 55: 413-20.

© 2012 Revista de Neurología

**Figura 1.** La adenosina es un nucleósido endógeno de purina compuesto de una molécula del nucleótido adenina unida a una molécula de azúcar (ribofuranosa) mediante un enlace a  $\beta$ -N<sub>9</sub>-glicosídico.



La hidrólisis de estos enlaces es lo que produce la liberación de energía y da lugar al ADP y al AMP sucesivamente.

Sirve además como bloque de construcción de desoxirribonucleótidos y como molécula señalizadora extra e intracelular. Su papel en la señalización extracelular es el que interesa en este estudio, ya que los receptores purinérgicos lo reconocen en el sistema nervioso para inducir somnolencia [4].

### Almacenamiento, liberación y procesamiento del ATP

Hasta hace poco, se pensaba que la única fuente de extracelular del ATP capaz de actuar sobre los purinoreceptores provenía de células dañadas, pero actualmente ya se ha reconocido la liberación del ATP por parte de células sanas como proceso fisiológico. Puede ser liberado por neuronas y también por otros tipos celulares no neuronales en respuestas a varios agentes [4,5].

De acuerdo Burnstock [6], el citoplasma de la mayoría de neuronas contiene una concentración de entre 2-5 mM de ATP y, a concentraciones más altas (de hasta 100 mM), se almacena en las vesículas sinápticas, que también pueden contener otros nucleótidos pero en concentraciones menores.

Las revisiones más recientes se centran en el papel de las ectonucleotidasas en el sistema nervioso, que hidrolizan el ATP a adenosina en el espacio extracelular (Fig. 2).

Los receptores purinérgicos se definieron en 1976 y, dos años después, se propusieron dos subtipos, los P1 y P2, para la adenosina y el ATP/ADP respectivamente. En 1985, se propusieron las bases farmacológicas para distinguir los dos tipos de receptor P2 (P2X y P2Y) (Tabla I).

En el cerebro de rata, los niveles de ATP aumentan durante las primeras horas del sueño en zonas que son activas durante la vigilia [7]. Este aumento

del ATP se correlaciona positivamente con la potencia de las ondas  $\delta$ . Estos experimentos indican el papel del sueño a la hora de proporcionar al cerebro la oportunidad de recuperar sus reservas de energía y aumentar la biosíntesis de moléculas consumidas durante el día puesto que una elevada concentración de ATP está asociada a procesos anabólicos [7].

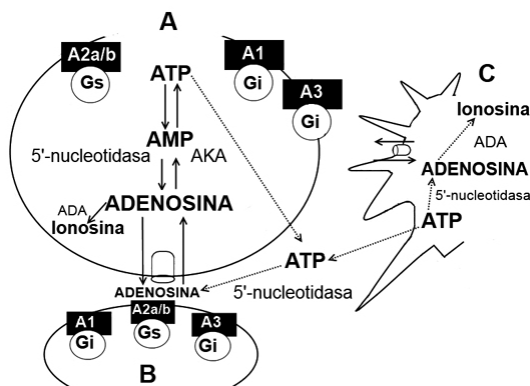
### Receptores y metabolismo de la adenosina (Fig. 2)

Hasta la fecha, se han descrito y se han clonado cuatro subtipos del receptor P1 (de adenosina): A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub> (Tabla I). Todos están unidos a proteínas G y tienen siete dominios transmembrana con aminoácidos hidrofóbicos [6]. En los humanos, los más similares son los A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> (aproximadamente un 60% de similitud en la secuencia de aminoácidos) y los A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> (aproximadamente un 50%). Los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> (Tabla I) están asociados negativamente a la actividad adenilciclasa (actividad enzimática asociada a la señalización intracelular por proteína G, que degrada el ATP a cAMP). La estimulación del receptor A<sub>1</sub> junto con la inhibición de la adenilciclasa, activa en la fosfolipasa C, abre diferentes tipos de canales de K<sup>+</sup> e inactiva canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo Q, P y N [8]. Los receptores A<sub>2</sub> están asociados positivamente (Tabla I) a la adenilciclasa [6,9], lo que determina que los efectos mediados a través de los receptores A<sub>1/3</sub> y A<sub>2</sub> sean diferentes, de tal forma que los receptores A<sub>1/3</sub> median acciones inhibitorias, mientras que los A<sub>2</sub> pueden ser excitatorios [10]. La cafeína es un antagonista no selectivo de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> [11].

Se han detectado los efectos sinápticos opuestos de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> en distintas áreas del cerebro relacionadas con la génesis de los estados del CVS (véase más abajo). Los receptores A<sub>1</sub> median la inhibición neural combinando la hiperpolarización de la neurona postsináptica y en muchas ocasiones inhibiendo la liberación de un neurotransmisor excitatorio presináptico [8]. Son menos conocidos los mecanismos sinápticos (postsinápticos y presinápticos o ambos) a través de los cuales el receptor A<sub>2</sub> puede ejercer sus acciones excitatorias [12].

Los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> están muy expresados en todo el cerebro, mientras que el A<sub>3</sub> sólo tiene un nivel de expresión medio en el hipocampo y el cerebelo; el receptor A<sub>1</sub> es el más ubicuo [6]. El A<sub>2A</sub> se restringe a ciertas áreas y ha sido observado principalmente mediante inmunohistoquímica en el cerebro de rata en el estriado, núcleo *accumbens* y tubérculos olfatorios [10] (Tabla I). A su vez, el receptor A<sub>2B</sub> está expresado en muchas zonas del cerebro, pero generalmente a niveles bajos [8].

**Figura 2.** Formación y metabolismo de la adenosina. Se representa una neurona presináptica (A), una postsináptica (B) y un astrocito (C). El ATP se degrada a AMP para obtener energía. El AMP se transforma en adenosina por la enzima 5'-nucleotidasa. Aquella puede volver a transformarse en AMP por la adenosincinasa (AK). La adenosina puede también transformarse en ionosina por la enzima adenosindeaminasa (ADA). La adenosina sale al exterior celular por medio de transportadores (el cilindro en la imagen), donde se acumula y es capaz de actuar sobre otras neuronas mediante los distintos tipos de receptor, A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub>, acoplados a proteínas G inhibitorias (G<sub>i</sub>), y A<sub>2</sub>, acoplado a proteína a la proteína G estimuladora (G<sub>s</sub>). A su vez, las neuronas liberan el ATP junto a las vesículas del neurotransmisor y los astrocitos lo liberan como molécula señalizadora. En el medio extracelular, las enzimas ectonucleotidasas lo pueden degradar también a adenosina.



La adenosina está presente tanto intra como extracelularmente y el balance está mantenido por transportadores de membrana (cilindro en la Fig. 2). Se han descrito transportadores equilibrativos (dos tipos) y concentrativos (cinco tipos) [8]. La presencia de adenosina en el espacio extracelular no viene dada por las vías de neurotransmisión clásicas, sino que aparece en el espacio extracelular por dos mecanismos. En primer lugar [8], los nucleósidos intracelulares pueden ser liberados mediante transportadores de nucleósidos equilibrativos. En el interior de la células (neuronas y glía), la enzima citosólica 5'-nucleotidasa forma adenosina a partir del AMP y, a su vez, la enzima adenosincinasa puede transformar de nuevo la adenosina en AMP (AK, Fig. 2). Esta última tiene una actividad relativamente alta, por lo que las concentraciones de adenosina dentro de las células son bajas y el transporte de adenosina estaría dirigido hacia el interior. Sin embargo, en condiciones de alta demanda energética neuronal que conlleven hidrólisis de ATP y que aumenten los niveles de adenosina intracelular, estos transportadores pueden liberar adenosina. En segundo lugar, la adenosina extracelular se forma a

**Tabla I.** Clasificación y localización de los receptores purinérgicos.

Molécula	Tipo	Localización	Relación con la adenilciclasa	
Adenosina	P1	A1	Muy ubicua en todo el cerebro	Inhibitoria
		A2A	Estriado, núcleo <i>accumbens</i> , tubérculos olfatorios, hipotálamo	Activadora
		A2B	Ubicua	Activadora
		A3	Expresión media en hipocampo y cerebelo	Inhibitoria
ATP	P2	P2X	Ubicua	
		P2Y	Ubicua	

través de la hidrólisis del ATP y de otros nucleótidos liberados al exterior celular; la hidrólisis está mediada por enzimas ectonucleotidasas, muy expresadas en todo el cerebro [8] (Fig. 2).

Las principales rutas metabólicas intracelulares de la adenosina son la ya comentada formación de AMP por la adenosincinasa y su metabolización irreversible a ionosina por la enzima adenosindeaminasa (ADA) (Fig. 2). Fuera de la célula, la enzima ecto-ADA puede también desaminar a la adenosina para formar ionosina. La AK parece más abundante en las neuronas, y la ADA, en los astrocitos [8].

### Adenosina astrocítica

Aunque no son excitables eléctricamente, los astrocitos deben considerarse como un elemento modulador de sinapsis tripartitas, capaces de liberar ellos mismos transmisores en el proceso que se ha llamado gliotransmisión [13]. La excitabilidad astrocítica se manifiesta por elevaciones del calcio citosólico, resultado de movilizar el calcio del retículo endoplasmático; éste actúa entonces como señal celular [14]. Dichas elevaciones del calcio, activadas por receptores metabotrópicos, que reconocen neurotransmisores, son las que conducen a la liberación de transmisores químicos [15]. Estos transmisores químicos pueden a su vez modular la actividad de las neuronas adyacentes y modificar la fuerza de la sinapsis en la que están implicados.

Los astrocitos liberan gliotransmisores por muchas vías, incluyendo la exocitosis. La liberación excitotóxica depende de la formación de un complejo SNARE entre las vesículas contenedoras y la membrana diana.

Los compuestos químicos liberados primariamente por los astrocitos son el glutamato y el ATP, que pueden facilitar la transmisión neuronal. Además, el ATP ya liberado es rápidamente hidrolizado por enzimas ectonucleotidas a adenosina (Fig. 2), que se acumula en el espacio extracelular, y, si actúa sobre los receptores  $A_1$  de neuronas locales, deprime la actividad sináptica de forma tónica [16]. A su vez, el ATP liberado en la neurotransmisión puede actuar directamente sobre receptores P2 de células gliales, así promueve la liberación de citocinas [17].

## Adenosina y sueño

### Niveles de adenosina a lo largo del ciclo vigilia-sueño (CVS)

Cuando el gasto energético en el cerebro supera a la producción energética debido a las demandas metabólicas de las neuronas, los niveles de adenosina se acumulan en el espacio extracelular [5,18]. Cuanto mayor sea la actividad de las neuronas, mayores serán los niveles de adenosina en el espacio extracelular y sus efectos moduladores.

Su concentración extracelular se describió en un inicio como de 30-50 nM [19], pero con posterioridad se calculó mediante técnicas de microdialísis que sus concentraciones serían de 180-270 nM en el prosencéfalo basal y el tálamo de gato [20], y de 40-210 nM en el estriado de rata [21,22].

Los análisis por microdialísis de la cantidad de adenosina revelan que sus concentraciones aumentan progresivamente en el cerebro según se va prolongando la vigilia en áreas tales como el prosencéfalo basal y la corteza en experimentos de privación de sueño [18,20,23] y disminuyen de nuevo durante el sueño de recuperación. En otras áreas cerebrales, no es notoria la elevación de la adenosina ante una vigilia forzada, pero siempre es mayor su concentración en la vigilia que en el sueño [18]. Por lo tanto, se pensó que la adenosina se acumularía en el medio extracelular como indicador de la actividad celular, siguiendo un transporte equilibrado desde los terminales nerviosos, donde aumentaría con el uso del ATP o seguiría a la hidrólisis extracelular del ATP liberado –junto con otros neurotransmisores incluyendo el glutamato– al medio mediante vesículas sinápticas [16].

En línea con la participación de la adenosina en los mecanismos de la homeostasis del sueño se encuentran los resultados que indican un aumento de la densidad de los receptores  $A_1$  en numerosas regiones cerebrales cuando se ha sometido al animal

de experimentación a un periodo de privación de sueño de 24 o de 12 horas de duración [24].

No sólo la fuente de adenosina extracelular procede de la actividad neuronal. La liberación de adenosina por parte de los astrocitos y sus efectos en el sueño han sido estudiados por Halassa et al [15] empleando un modelo de ratones transgénicos a los que se modifica el complejo SNARE de sus astrocitos (ratones dnSNARE). Por lo tanto, tienen dañada la gliotransmisión. Los ratones dnSNARE, tras ser sometidos a una privación de sueño, muestran una menor acumulación de adenosina, así como una reducción de la presión de sueño, ya que estos animales, aunque presentan una cantidad de sueño equivalente a los *wild type* (WT), tienen una menor actividad de ondas  $\delta$  y, por tanto, una menor intensidad del sueño NREM. Asimismo, dado que los astrocitos pueden liberar varios transmisores, se confirmó con experimentos farmacológicos que verdaderamente el fenotipo transgénico implicaba una reducción en la gliotransmisión purinérgica: antagonistas del receptor  $A_1$ , como el 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina (CPT), tienen efectos supresores del sueño en los ratones WT, pero no en los dnSNARE; además, la infusión *in vivo* de CPT en los WT resultó en la mimetización del fenotipo dnSNARE [15].

Por tanto, la glía, mediante la constitución de sinapsis tripartitas, es capaz de modular los ritmos de sueño, función que enfatiza la naturaleza integradora de los circuitos cerebrales, en los que la señalización lenta glial puede regular procesos neuronales rápidos mediante la liberación de neuro-moduladores [25].

La gliotransmisión con aumento de la liberación de adenosina contribuye, además, al deterioro de la memoria que sigue a la pérdida de sueño [15]. Así, en procesos cerebrales plásticos, que requieran del sueño para la consolidación de la memoria, podría ser importante investigar el papel de la gliotransmisión. Además, la glía ofrece una diana novel para el desarrollo de terapias de alteraciones del sueño y cognitivas [15].

En línea con estos supuestos, se encuentran también experimentos muy recientes que indican un aumento del receptor  $A_1$  en el hipocampo en respuesta a una situación de vigilia, respuesta que es abolida en animales en los que la gliotransmisión está anulada [26].

### Efectos de la adenosina al interactuar con regiones involucradas en el CVS: receptores

Las acciones de la adenosina se han examinado al interactuar con regiones involucradas en la gene-

ración de la vigilia, del sueño lento y del sueño REM tales como:

- *Proscéfaló basal (PB)*, con sus células colinérgicas, que es una región implicada en la generación de vigilia [27,28].
- *Núcleo laterodorsal tegmental (LDT)*, núcleo del tegmento pontino que, con sus proyecciones colinérgicas al tálamo, también está implicado en los mecanismos de vigilia, aunque este núcleo también envía proyecciones colinérgicas a la parte ventral del núcleo reticular oral del puente, donde se genera el sueño REM [28,29].
- *Hipotálamo posterolateral*, región involucrada en la generación de la vigilia [28,30] donde se encuentran las neuronas histaminérgicas en el núcleo tuberomamilar; además, concentradas en la región perifornical se encuentran los somas de las neuronas hipocretinérgicas/orexinérgicas (Hcrt/Ox) [31,32] cuyo déficit (o el de sus receptores) determina un desencadenamiento de la narcolepsia. La implicación de las neuronas Hcrt/Ox en el CVS se debe a las amplias conexiones anatómicas que presentan estas neuronas con regiones responsables de generar y mantener la vigilia que incluyen áreas colinoceptivas de la formación reticular pontina [33,34]. Las células del hipotálamo posterolateral también pueden ejercer un control del sueño REM a través de las conexiones a la parte ventral del núcleo reticular oral del puente [35,36,37].
- *Región preóptica (PO)*: en relación con las estructuras relacionadas con la generación del sueño NREM [1] se han estudiado las acciones de agonistas y antagonistas de los receptores adenosinérgicos en la región PO. Ésta presenta proyecciones gabérgicas y galaninérgicas que pueden producir la inhibición de regiones relacionadas con la vigilia y el despertar, situadas en el hipotálamo posterior y el mesencéfalo [38].

La perfusión de adenosina en el PB del gato produce una disminución significativa en la vigilia y aumento del sueño (NREM y REM) [18]. La adenosina perfundida en el PB de rata produce efectos similares sobre la vigilia y, además, un aumento significativo en la potencia de la banda  $\delta$  [18,23]. Aunque el tronco del encéfalo, en ausencia de influencias prosencefálicas, es incapaz de mostrar rebote de sueño REM [39], se produce un aumento del sueño REM tras la administración de agonistas de la adenosina en LDT [18] y en la formación reticular pontina [40].

El antagonista selectivo del receptor  $A_1$  (CPT) administrado en el PB aumenta la vigilia y disminuye el sueño (efecto opuesto al descrito en el párrafo

anterior) [18]. Además, en experimentos en los que se bloquea la expresión del receptor  $A_1$  al microdializar oligonucleótidos antisentido (diseñados para hibridar con el ARNm del receptor y, por lo tanto, impedir su traducción), resultaron en una reducción del sueño NREM y un aumento en la vigilia [18].

Experimentos electrofisiológicos realizados *in vitro* [41] han demostrado que, al aplicar adenosina, las neuronas colinérgicas del PB disminuyen su tasa de disparo. Este efecto lo media el receptor  $A_1$ , ya que desaparece cuando se añade CPT. La inhibición que la adenosina causa sobre las neuronas colinérgicas del PB es postsináptica mediante la activación de una corriente  $I_{kir}$  (corriente de potasio hacia el interior celular). Estudios muy recientes en ratones [42] confirman el papel inhibitorio en el PB de la activación del receptor  $A_1$ , pero indican que hay una modulación inhibitoria presináptica sobre las entradas glutamatérgicas excitatorias a las neuronas colinérgicas. De una forma u otra, las neuronas colinérgicas del PB reducirán la liberación de acetilcolina, necesaria para el estado de vigilia.

Hay también estudios que indican una actuación de la adenosina mediante receptores  $A_2$  en el PB. La infusión del agonista CGS 21680 del receptor  $A_{2A}$  en el espacio subaracnoideo, bajo el BF rostral, aumenta el sueño de ondas lentas, efecto bloqueado en presencia de KF17837, antagonista del receptor  $A_{2A}$  [43]. Puesto que los receptores  $A_{2A}$  son excitatorios, podría ocurrir que estos experimentos condujeran a activar células en el núcleo *accumbens*, que a su vez aumentarían la actividad de las neuronas promotoras de sueño del área PO ventrolateral [6].

En el área PO, la aplicación de un agonista del receptor  $A_{2A}$  (CGS21680) provoca efectos excitatorios a escala postsináptica. Las neuronas inhibitorias (gabérgicas y galaninérgicas), al activarse, podrían a su vez bloquear los sistemas de la vigilia y del despertar y, por lo tanto, inducir al sueño [12]. Las acciones celulares mediadas por los receptores  $A_1$  y  $A_2$  tienen su reflejo en los resultados con microdialisis de agonistas y antagonistas de los receptores  $A_1$  y  $A_2$  en la región PO ventrolateral donde existe una gran concentración de neuronas activas durante el sueño NREM [1,44]. Los agonistas de los receptores  $A_1$  producen vigilia (debido a la acción inhibitoria sobre las células promotoras de sueño NREM) mientras que los agonistas de los receptores  $A_2$  producen sueño NREM (por la acción excitadora sobre las neuronas promotoras del mismo). Resultados opuestos se obtienen con la aplicación de los antagonistas [45].

Como se ha mencionado, el receptor  $A_{2A}$  se encuentra especialmente expresado en el estriado y se ha visto además su relación con la neurotransmi-

sión corticoestriatal y los posibles efectos sobre la locomoción [46]. Esto abre la posibilidad de usarlos como diana en un trastorno del sueño como es el síndrome de piernas inquietas. Los estudios más recientes indican que los antagonistas del receptor  $A_{2A}$  podrían ser beneficiosos para el tratamiento de la enfermedad [46,47].

El efecto inhibidor de la adenosina sobre las neuronas promotoras de la vigilia demostrado en el proencéfalo basal también se ha demostrado en las estructuras del hipotálamo posterior relacionadas con la vigilia. Así, la administración de CPA en el núcleo tuberomamilar, donde se concentran las neuronas histaminérgicas, va seguida de un aumento del sueño NREM y de un aumento de la potencia de la banda  $\delta$ , efectos que se bloquean con la coadministración de un antagonista selectivo de los receptores  $A_1$  [48]. Por otra parte, no se producen efectos en el sueño en animales KO carentes de los receptores  $A_1$  de adenosina o H1 de histamina [48]. Asimismo, ha habido un interés creciente por examinar las relaciones de la adenosina con el sistema Hcrt/Ox; inicialmente [49], se llevaron a cabo experimentos de marcaje inmunohistoquímico y de fluorescencia en las neuronas Hcrt/Ox para detectar si presentaban receptores adenosinérgicos. Así, se vio que un 30% de las neuronas Hcrt/Ox de la región perifornical se marcaban también para el receptor  $A_1$ . Así pues, la adenosina podría ser un componente importante de la regulación en el tono orexinérgico.

Posteriores experimentos *in vitro* [50] han demostrado que la adenosina ejerce un efecto inhibitorio dosisdependiente sobre el disparo de las neuronas Hcrt/Ox. Esta actuación la media el receptor  $A_1$ , puesto que el efecto desaparece al aplicar un antagonista de este receptor, mientras que permanece cuando el receptor antagonizado es el  $A_2$ . En este trabajo, se indica además que la activación de los receptores sobre las neuronas Hcrt/Ox ocurre tanto en los terminales presinápticos que inervan estas neuronas como en los propios cuerpos celulares de las neuronas Hcrt/Ox [50].

Otro estudio reciente [51] confirma la regulación de la adenosina a través del receptor  $A_1$  sobre las neuronas Hcrt/Ox, así como sobre otras neuronas del área perifornical del hipotálamo. Se sugiere también que algunas de las neuronas no Hcrt/Ox que responden a los agonistas y antagonistas del receptor  $A_1$  podrían ser glutamatérgicas. Esto indicaría mecanismos adenosinérgicos de inhibición presináptica de las entradas glutamatérgicas excitatorias sobre las neuronas Hcrt/Ox.

Experimentos en rodajas hipotalámicas de ratones transgénicos [52] para Hcrt-EGFP (*enhanced*

*green fluorescent protein*), en los que las neuronas Hcrt/Ox son fluorescentes y, por lo tanto, muy fácilmente detectables, indican que la aplicación de adenosina exógena reduce la actividad de los disparos de las neuronas Hcrt/Ox. Además, se reduce la amplitud de los potenciales evocados excitatorios postsinápticos glutamatérgicos, que se recupera al eliminar la adenosina de la solución del baño. Asimismo, se ha confirmado que este efecto es mediado por el receptor  $A_1$ , y no por el  $A_2$ , ya que desaparece en presencia del antagonista CPT (del  $A_1$ ), pero no en la del antagonista DMPX<sup>4</sup> (del  $A_2$ ) [52].

Se ha estudiado también el efecto de la adenosina sobre los terminales gabérgicos de las neuronas Hcrt/Ox [53]. En rodajas hipotalámicas de ratón, la adenosina inhibe la transmisión sináptica inhibitoria evocada sobre las neuronas Hcrt/Ox. Este efecto está mediado por el receptor  $A_1$ , y no por el  $A_2$ , ya que se suprime en presencia de CPT, pero no de DMPX. Por tanto, la expresión funcional del receptor  $A_1$  en los terminales gabérgicos que inervan las neuronas Hcrt/Ox puede constituir otro papel más en la modulación de la excitabilidad de dichas neuronas (presináptico en este caso) y, con ello, también en la regulación del CVS. El hecho de que la adenosina limite también la inhibición gabérgica sobre las neuronas Hcrt/Ox podría impedir una inhibición de las mismas en exceso, lo que permitiría siempre un nivel mínimo de liberación de estos péptidos.

Se han estudiado *in vivo* los efectos del bloqueo del receptor  $A_1$  con la inyección de 1,3-dipropil-8-fenilxantina (DPX), un antagonista selectivo del receptor  $A_1$  en el hipotálamo lateral de rata [54]. Se produjo un aumento significativo de la vigilia y una reducción del sueño. Dado que el sueño de rebote tras una privación es una medida de la homeostasis, se llevó a cabo el mismo experimento, pero sometiendo a los animales a una privación de sueño en lugar de analizar los periodos espontáneos de sueño-vigilia. El sueño de rebote disminuyó y aumentó la latencia al sueño NREM. Por tanto, esto demuestra que la adenosina, actuando a través del  $A_1$  en las neuronas Hcrt/Ox, puede tener un papel clave en la regulación de los mecanismos homeostáticos del sueño [54].

Por último, se ha visto relación entre la actuación de la adenosina a través del receptor  $A_2$  y la regulación del tono orexinérgico [55] usando como marcador de la actividad celular la expresión de FOS (proteína nuclear que se expresa de manera rápida y transitoria en respuesta a estímulos varios). Los resultados indican una reducción significativa del número de neuronas orexinérgicas que expresan proteína FOS tras la aplicación del agonista del receptor  $A_2$ . Por tanto, la activación del receptor  $A_2$

conlleva una menor actividad de las neuronas Hcrt/Ox. No se conocen los mecanismos sinápticos que pueden subyacer en estas acciones, aunque con probabilidad haya mediación de mecanismos gabérgicos. Este efecto inhibitor desencadenado por la acción del receptor  $A_2$  contrasta con los efectos excitatorios que causaba en las neuronas de la región preóptica del hipotálamo, aunque la consecuencia final sea en ambos casos la misma: promover el estado de sueño.

## Conclusiones

Los datos revisados demuestran el papel de la adenosina como molécula participante en la regulación homeostática del sueño. Lo confirma la elevación de sus niveles tras una vigilia prolongada y cómo éstos vuelven a un nivel basal tras un sueño de recuperación. Asimismo, la activación de sus receptores mediante el uso de agonistas, o su bloqueo por medio de antagonistas, modifica la cantidad y la intensidad del sueño.

Está demostrada su implicación en el PB a través del receptor  $A_1$ , al inhibir la actividad de las neuronas colinérgicas, así como al inhibir las entradas glutamatergicas excitatorias sobre estas células, lo que en suma aumenta la cantidad de sueño NREM cuando actúa en esta zona y, en particular, al incrementar de forma significativa la potencia de la banda  $\delta$ .

Está demostrada la regulación –a través de los receptores  $A_1$  y  $A_2$ – que la adenosina ejerce sobre las células implicadas en la generación del sueño NREM del área PO, también sobre las neuronas del hipotálamo posterolateral relacionadas con la vigilia, como son las neuronas histaminérgicas y Hcrt/Ox. En las células Hcrt/Ox por medio del receptor  $A_1$ , además de efectos postsinápticos directos, hay efectos presinápticos inhibitorios tanto para las entradas glutamatergicas como gabérgicas. Además, se tienen evidencias de que el receptor  $A_2$  también puede participar en el tono de las neuronas Hcrt/Ox.

Asimismo, el hecho de que gran parte de la adenosina en el espacio extracelular tenga un origen glial supone la implicación de tipos celulares no neuronales en la regulación de un estado comportamental como es el sueño. Esto abre también la posibilidad de desarrollar nuevas terapias, cuya diana sea la glía, frente a los trastornos del sueño y de las consecuencias cognitivas que éstos puedan tener.

## Bibliografía

- De Andrés I, Garzón M, Reinoso-Suárez F. Functional anatomy of non-REM sleep. *Front Neurol* 2011; 2: 70.
- Borbély A. Sleep regulation: circadian rhythm and homeostasis. In Ganten D, Pfaff D, eds. *Sleep clinical and experimental aspects*. Berlin: Springer-Verlag; 1982. p. 83-103.
- Salín-Pascual RJ. Hipocretinas y adenosina en la regulación del sueño. *Rev Neurol* 2004; 39: 354-8.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehinger. Principios de bioquímica*. New York: Freeman & Co.; 2009.
- Brown RE, McCarley RW. Neurotransmitters, neuromodulators and sleep. In Parmeggiani PL, Velluti RA, eds. *The physiologic nature of sleep*. London: Imperial College Press; 2005. p. 45-75.
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87: 659-797.
- Dworak M, McCarley RW, Kim T, Kalinchuk AV, Basheer R. Sleep and brain levels: ATP changes during sleep. *J Neurosci* 2010; 30: 9007-16.
- Landolt HP. Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans? *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 2070-9.
- Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 172-81.
- Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J. Immunohistochemical localization of adenosine  $A_{2A}$  receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1998; 401: 163-86.
- Okuro M, Fujiki N, Kotorii N, Ishimaru Y, Sokoloff P, Nishino S. Effects of paraxanthine and caffeine on sleep, locomotor activity, and body temperature in orexin/ataxin-3 transgenic narcoleptic mice. *Sleep* 2010; 33: 930-42.
- Gallopin T, Luppi PH, Cauli B, Urade Y, Rossier J, Hayaishi O, et al. The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via  $A_{2A}$  receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* 2005; 1354: 1377-90.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999; 2: 208-15.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 2009; 32: 421-31.
- Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, et al. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 2009; 61: 213-9.
- Jones BE. Glia, adenosine and sleep. *Neuron* 2009; 61: 156-7.
- Krueger JM, Rector DM, Roy S, Van Dongen HP, Belenky G, Panksepp J. Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 910-9.
- Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine and sleep/wake regulation. *Prog Neurobiol* 2004; 73: 379-96.
- Phillis JW. Adenosine in the control of cerebral circulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1989; 1: 26-54.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, McCarley RW. Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 2000; 99: 507-17.
- Ballarin M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 1991; 142: 97-103.
- Pazzagli M, Corsi C, Fratti S, Pedata F, Pepeu G. Regulation of extracellular adenosine levels in the striatum of aging rats. *Brain Res* 1995; 684: 103-6.
- Basheer R, Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine as a biological signal mediating sleepiness following prolonged wakefulness. *Biol Signals Recept* 2000; 9: 319-27.
- Elmenhorst D, Basheer R, McCarley RW, Bauer A. Sleep deprivation increases  $A_1$  adenosine receptor density in the rat brain. *Brain Res* 2009; 1258: 53-8.
- Halassa MM. Thalamocortical dynamics of sleep: Roles of purinergic neuromodulation. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22: 245-51.
- Schmitt LI, Sims RE, Dale N, Haydon PG. Wakefulness affects synaptic and network activity by increasing extracellular astrocyte-derived adenosine. *J Neurosci* 2012; 32: 4417-25.

27. Torterolo P, Vanini G. Nuevos conceptos sobre la generación y el mantenimiento de la vigilia. *Rev Neurol* 2010; 50: 747-58.
28. Reinoso-Suárez F, De Andrés I, Garzón M. Functional anatomy of the sleep-wakefulness cycle: wakefulness. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2011; 208: 1-128.
29. Reinoso-Suárez F, De Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E. Location and anatomical connections of a paradoxical sleep induction site in the cat ventral pontine tegmentum. *Eur J Neurosci* 1994; 6: 1829-36.
30. Stenberg D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 1187-204.
31. De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 322-7.
32. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-85.
33. Del Cid-Pellitero E, Garzón M. El sistema de neurotransmisión hipocretinérgico/orexinérgico en la regulación de los estados de vigilia y sueño. *Rev Neurol* 2007; 45: 482-90.
34. Del Cid-Pellitero E, Garzón M. Hypocretin1/orexinA-containing axons innervate locus coeruleus neurons that project to the rat medial prefrontal cortex. Implication in the sleep-wakefulness cycle and cortical activation. *Synapse* 2011; 843-57.
35. Núñez A, Moreno-Baladrán M, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M, De Andrés I. Relationship between the perifornical hypothalamic area and oral pontine reticular nucleus in the rat. Possible implication of the hypocretinergic projection in the control of rapid eye movement sleep. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 2834-42.
36. Núñez A, Rodrigo-Angulo ML, Andrés ID, Garzón M. Hypocretin/orexin neuropeptides: participation in the control of sleep wakefulness cycle and energy homeostasis. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7: 50-9.
37. Moreno-Baladrán E, Garzón M, Bóvalo C, Reinoso-Suárez F, De Andrés I. Sleep-wakefulness effects after microinjections of hypocretin 1 (orexin A) in cholinceptive areas of the cat oral pontine tegmentum. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 331-41.
38. Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 1998; 18: 4705-21.
39. De Andrés I, Garzón M, Villablanca JR. The disconnected brain stem does not support rapid eye movement sleep rebound following selective deprivation. *Sleep* 2003; 26: 419-25.
40. Marks GA, Birabil CG. Enhancement of rapid eye movement sleep in the rat by cholinergic and adenosinergic agonists infused into the pontine reticular formation. *Neuroscience* 1998; 86: 29-37.
41. Arrigoni E, Chamberlin NL, Saper CB, McCarley RW. Adenosine inhibits basal forebrain cholinergic and non-cholinergic neurons in vitro. *Neuroscience* 2006; 140: 403-13.
42. Hawrylyk JM, Ferrari LL, Keating SA, Arrigoni E. Adenosine inhibits glutamatergic input to basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurophysiol* 2012; 107: 2769-81.
43. Satoh S, Matsumura H, Hayaishi O. Involvement of adenosine A<sub>2A</sub> receptor in sleep promotion. *Eur J Pharmacol* 1998; 351: 155-62.
44. Szymusiak R, McGinty D. Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1129: 275-86.
45. Methippara MM, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D. Effects on sleep of microdialysis of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2a</sub> receptor analogs into the lateral area of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R1715-23.
46. Quiroz C, Pearson V, Gulyani S, Allen R, Earley C, Ferré S. Up-regulation of striatal adenosine A<sub>2a</sub> receptors with iron deficiency in rats. Effects on locomotion and cortico-striatal neurotransmission. *Exp Neurol* 2010; 224: 292-298.
47. Thorpe AJ, Clair A, Hochman S, Clemens S. Possible sites of therapeutic action in restless legs syndrome: focus on dopamine and  $\alpha 2\delta$  ligands. *Eur Neurol* 2011; 66: 18-29.
48. Oishi Y, Huang ZL, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O. Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A<sub>1</sub> receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 19992-7.
49. Thakkar MM, Winston S, McCarley RW. Orexin neurons of the hypothalamus express adenosine A<sub>1</sub> receptors. *Brain Res* 2002; 944: 190-4.
50. Liu ZW, Gao XB. Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A<sub>1</sub> receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J Neurophysiol* 2007; 97: 837-48.
51. Rai S, Kumar S, Alam MA, Szymusiak R, McGinty D, Alam MN. A<sub>1</sub> receptor mediated adenosinergic regulation of perifornical-lateral hypothalamic area neurons in freely behaving rats. *Neuroscience* 2010; 167: 40-8.
52. Xia J, Chen F, Ye J, Yan J, Wang H, Duan S, et al. Activity-dependent release of adenosine inhibits the glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the hypothalamic hypocretin/orexin neurons. *Neuroscience* 2009; 162: 980-8.
53. Xia JX, Xiong JX, Wang HK, Duan SM, Ye JN, Hu ZA. Presynaptic inhibition of gabaergic synaptic transmission by adenosine in mouse hypothalamic hypocretin neurons. *Neuroscience* 2012; 201: 46-56.
54. Thakkar MM, Engemann SC, Walsh KM, Sahota PK. Adenosine and the homeostatic control of sleep: effects of A<sub>1</sub> receptor blockade in the perifornical lateral hypothalamus on sleep-wakefulness. *Neuroscience* 2008; 153: 875-80.
55. Satoh S, Matsumura H, Kanbayashi T, Yoshida Y, Urakami T, Nakajima N, et al. Expression pattern of FOS in orexin during sleep induced by and adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist. *Behav Brain Res* 2006; 170: 277-86.

### Adenosine and homeostatic control of sleep. Actions in target structures of the sleep-wake circuits

**Summary.** Sleep homeostasis occurs during prolonged wakefulness. Drowsiness and sleep pressure are its behavioral manifestations and, when sleep is allowed, there is a sleep rebound of sufficient duration and intensity to compensate for the previous deprivation. Adenosine is one of the molecules involved in sleep homeostatic regulation. Caffeine and theophylline, stimulants widely consumed by the humans, are antagonists. It is an endogenous factor, resulting from ATP metabolism in neurons and glia. Adenosine accumulates in the extracellular space, where it can exert regulatory actions on the sleep-wakefulness cycle circuits. Adenosine acts through the purinergic receptors A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>. This paper reviews: 1) the metabolic pathways of cerebral adenosine, and the mechanisms of its release by neurons and glia to the extracellular space; 2) the actions of adenosine and its antagonists in regions of the central nervous system related to wakefulness, non-REM sleep, and REM sleep, and 3) the synaptic mechanisms involved in these actions.

**Key words.** Acetylcholine. Basal forebrain. Hypothalamus. Orexins/hypocretins. Purinergic receptors.