

DESARROLLO DE UN MODELO DE PERTURBACION DEL SUEÑO EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

Adrian Baños

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina

Directora: García, Ana Paula
Codirectora: Schumacher, Rocío

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Pez cebra, Sueño, Perturbación

INTRODUCCIÓN

El estilo de vida occidental se caracteriza por la restricción crónica del sueño. Entre las causas, encontramos las exigencias laborales, las tareas cotidianas y mayores tiempos de ocio frente a pantallas. Todo esto determina que la mayoría de las personas sufran disminución del tiempo y calidad del sueño (Gonnissen & Hulshof, 2013). Esto produce un profundo impacto sobre la vida diaria, no sólo por la consiguiente somnolencia, sino también por efectos sobre la salud (Luckhaupt, Tak, & Calvert, Feb. 2010).

El pez cebrá (*Danio rerio*) se está convirtiendo rápidamente en un organismo modelo para el estudio en neurociencia. La utilidad del pez cebrá en este campo se debe a que es un vertebrado con una homología fisiológica y genética alta, con respecto a los humanos. El hecho de también poseer tanto un desarrollo veloz como una esperanza de vida larga lo establecen como un excelente modelo de estudio (Kalueff, Stewart, & Gerlai, 2013)

Se ha reportado que los peces cebrá exhiben los tres criterios de comportamiento para el sueño: estado de reposo regulado por el ritmo circadiano, reducción de la capacidad de respuesta sensorial y regulación homeostática. Sumado a esto, se ha visto que tiene una respuesta comportamental a compuestos inductores del sueño o vigilia similar a la de mamíferos. Y, dado que es un animal diurno como los seres humanos, constituye un buen modelo que podría aportar información relevante a la hora de un enfoque terapéutico (Stewart, Braubach, Gerlai, & Spitsbergen, 2014).

OBJETIVOS

Establecer el uso del pez cebrá como modelo para estudiar los efectos de las alteraciones del sueño. Para esto se propone primero desarrollar un método para registrar la actividad de los peces que nos permita posteriormente desarrollar un protocolo de reducción del tiempo de sueño en peces cebrá adultos.

Título del proyecto: EFECTOS DE LA ALTERACIÓN DEL SUEÑO SOBRE EL CONTROL CENTRAL DE LA INGESTA Y BÚSQUEDA DE ALIMENTO EN PEZ CEBRA. ROL DE LAS OREXINAS

Instrumento: PICT 2020 SERIE A 00709

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: CONICET

Directora: García, Ana Paula

METODOLOGÍA

Manejo de los animales: Los peces cebra adultos fueron alojados en peceras de vidrio con agua de clorada y filtrada. Las mismas se colocaron en un bioterio bajo un ciclo de 13,5:10,5 horas de luz:oscuridad (apagado de las luces a las 20:00, encendido a las 06:30 horas). Se controló la temperatura del bioterio con el objetivo de mantener una temperatura del agua en $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los peces fueron alimentados diariamente con comida comercial en escamas.

Registro de la actividad: Para registrar la actividad, dos peces macho se colocaron en una pecera de 7 litros (30x15x15cm), separados por un doble divisor para que no entren en contacto entre sí. Los peces se situaron en la pecera experimental durante 7 días, los primeros 3 días fueron de habituación al nuevo medio, y los registros se hicieron los 4 días finales. El registro de la actividad se realizó utilizando una cámara con capacidad infrarroja y se obtuvo la actividad de los peces a lo largo de 24 horas en videos de 5 minutos, y se registraron dos peces a la vez por sesión experimental.

Análisis de la actividad: Se analizaron los videos para determinar en qué momentos el pez estaba dormido, considerado como un tiempo de inmovilidad superior a 6 segundos. Para ello se utilizó el software de seguimiento animal ezTrack (Pennington , Dong , Feng , & Vetere, 2019) donde se tuvieron que encontrar empíricamente parámetros de umbral (movimiento a partir del cual se considera que el pez se encuentra activo) y fondo (ruido visual de fondo que el software no debe considerar). Estos parámetros, sumados al periodo de inmovilidad antes mencionado, determinan cuando el pez se encuentra dormido. A partir de este análisis obtuvimos el porcentaje de sueño durante las fases de luz y oscuridad.

Perturbación del sueño: Para reducir el tiempo de sueño de los peces tratados (PS) se colocó un dispositivo con capacidad de generar vibraciones en el agua. El mismo fue colocado en el medio del doble divisor para afectar a ambos peces. El dispositivo se programó para que genere vibraciones de una duración de 5 minutos, cada 20 minutos, desde las 20:40hs hasta las 3:00hs (**Figura 1.**). De las 4 noches que se registraron, el sueño se perturbó en las últimas dos. De esta forma se obtuvieron dos registros sin perturbación (NP), y dos registros con perturbación (P). En el caso del grupo control, se realizó el mismo procedimiento. Se colocó el dispositivo perturbador, pero no se activaron las vibraciones programadas. Esto fue para tener en cuenta el posible estrés generado por la inserción del dispositivo en la pecera. Se realizaron 4 sesiones experimentales (de 2 peces cada una) por cada grupo, PS y control.

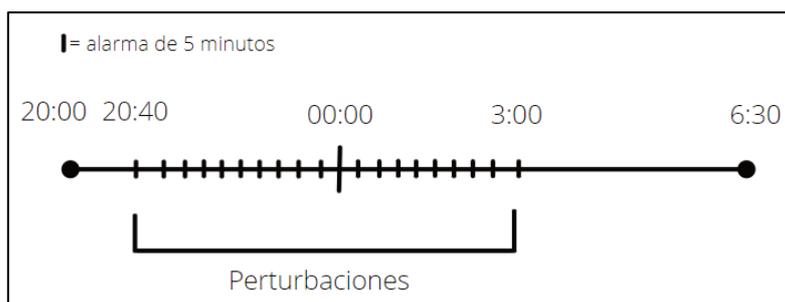


Figura 1. Esquema del diseño experimental de las perturbaciones durante la fase de oscuridad.

Análisis estadístico: Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico utilizando un ANOVA de 2 vías de medidas repetidas con un análisis *a posteriori* Sidak. Se estudiaron las siguientes variables: el porcentaje de sueño durante toda la noche, el porcentaje de sueño durante las perturbaciones, el porcentaje de sueño cuando no hubo perturbaciones, y los periodos de 5, 10 y 15 minutos inmediatamente posteriores a las perturbaciones ("Postperturbaciones"). Los análisis mencionados previamente también se estudiaron en dos

períodos de la noche, de 20:00h a 00:00h y de 00:00h a 03:00h. De forma de conocer el efecto de la perturbación del sueño durante la primera mitad y durante la segunda mitad de la noche, respectivamente.

RESULTADOS

Al analizar los registros en video de los peces se encontró un patrón de sueño que corresponde con lo descrito en bibliografía. Los peces duermen principalmente de noche (durmiendo alrededor del 35% del tiempo), con momentos de sueño despreciables a lo largo del día (durmiendo solo 2% del día). Durante la noche duermen desde el momento que se apagan las luces hasta las 4 de la mañana, momento donde su actividad aumenta. Esto validó el método de registro y análisis de la actividad.

En la **Figura 2.a** se puede observar que el grupo control no presentó diferencias en el porcentaje de sueño entre las noches sin perturbación (NP) respecto a las noches con perturbación (P). En cambio, en el grupo PS se observa una disminución del % de sueño durante la perturbación, aunque la misma no llegó a ser significativa. Al analizar la actividad sólo durante los 5 minutos de las perturbaciones, se encontraron diferencias significativas en el % de sueño en el grupo PS pero no en el grupo control (**Figura 2.b**). Estas diferencias significativas no se observan al analizar el % de sueño total durante los periodos sin perturbación (**Figura 2.c**)

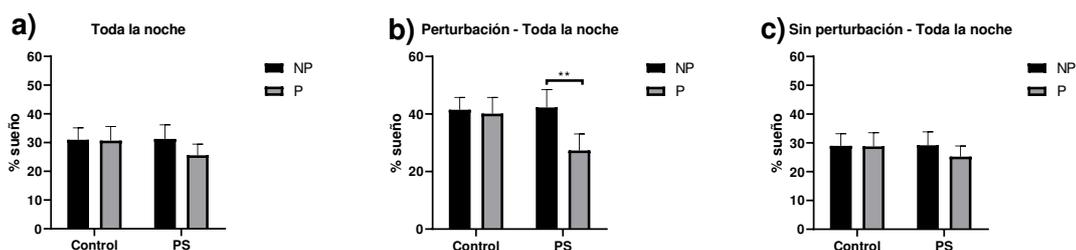


Figura 2. Comparación durante el tratamiento a lo largo de toda la noche. (n=7-8) ** p≤0.01

Además, decidimos comparar el % de sueño del pez cebra durante la perturbación con los % de sueño en los 5', 10' y 15' inmediatos posteriores a la perturbación (recordemos que a los 20 minutos posteriores vuelve a activarse la vibración disruptiva). (**Figura 3**). Observamos que el grupo PS presenta diferencias significativas en el porcentaje de sueño durante la perturbación respecto a todos los periodos posteriores. Sin embargo, estas diferencias no se observaron en el grupo control. Esto demuestra que las perturbaciones fueron efectivas en reducir el sueño.

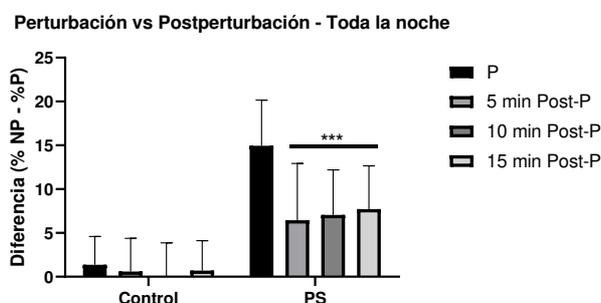


Figura 3. Cambio en el sueño durante las perturbaciones. (n=7-8) *** p≤0.001

Finalmente, decidimos analizar si había diferencias en el efecto de las perturbaciones durante la primera y segunda mitad de la noche. (**Figura 4**).

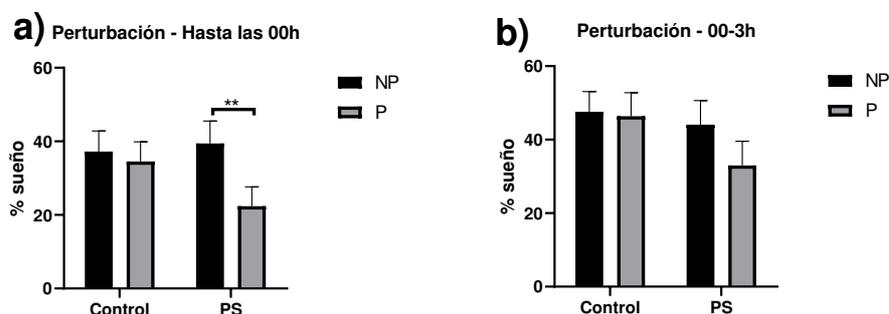


Figura 4. Sueño en los momentos posteriores a las perturbaciones. (n=7-8) ** $p \leq 0.01$

Se encontró que durante la primera mitad de la noche existen diferencias significativas en el porcentaje de sueño en el grupo PS, pero no en el grupo control (**Figura 4.a**). En cambio, en el rango de 00:00h a 03:00h, en el grupo PS hay una tendencia que no llega a ser significativa (**Figura 4.b**). Esto podría indicar que existe una desensibilización a la perturbación durante la segunda mitad de la noche, o que la primera mitad es un periodo de mayor sensibilidad a las perturbaciones del sueño en este modelo.

CONCLUSIÓN

El método elegido para registrar la actividad de los peces y su posterior análisis son herramientas útiles para estudiar el sueño en peces cebra. Además, el protocolo de perturbación elegido logró una disminución significativa en el tiempo de sueño. Por lo que consideramos que constituye un modelo útil para estudiar los efectos de la perturbación del sueño.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Gonnissen, H. K., & Hulshof, T.** (2013). *Chronobiology, endocrinology, and energy- and food-reward homeostasis*. no. May, pp. 405–416.
- Kalueff, A., Stewart, A. M., & Gerlai, R.** (2013). *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders*. Trends in Pharmacological Sciences, February 2014, Vol. 35, No. 2.
- Luckhaupt, S. E., Tak, S., & Calvert, G.** (Feb. 2010). *The prevalence of short sleep duration by industry and occupation in the national health interview survey*. Sleep, vol. 33, no. 2, pp. 149–159.
- Pennington ZT, Dong Z, Feng Y, Vetere LM, Page-Harley L, Shuman T, Cai DJ** (2019). ezTrack: An open-source video analysis pipeline for the investigation of animal behavior. Scientific Reports: 9(1): 19979.
- Stewart, A. M., Braubach, O., Gerlai, R., & Spitsbergen, J.** (2014). *Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside*. Trends Neurosci., vol. 37, no. 5, pp. 264–278.