



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Biología
Departamento de Fisiología
Grupo Neurociencia y Comportamiento

Manuel Silva Pérez

**EFFECTOS DE LA PRIVACIÓN DE LA FASE DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS DEL
SUEÑO SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTROENCEFALOGRÁFICA Y LOS MOVIMIENTOS
OCULARES EN LA RATA**

Tesis Doctoral dirigida por el Dr. Miguel Escudero González

Sevilla, 2019

D. Miguel Escudero González, Catedrático de Universidad en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado **“EFECTOS DE LA PRIVACIÓN DE LA FASE DE MOVIMIENTOS OCULARES RÁPIDOS DEL SUEÑO SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTROENCEFALOGRÁFICA Y LOS MOVIMIENTOS OCULARES EN LA RATA”**, ha sido realizado, bajo su dirección y supervisión, por D. Manuel Silva Pérez, Licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla, y que considera que reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Sevilla, 4 de noviembre de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Escudero', written in a cursive style.

Fdo.: Miguel Escudero González

“Without love, the truth cannot be seen.”

Ryukishi07

A Miguel, por abrirme la puerta y la mente. Por enseñarme que nuestros límites a veces son excusas, a veces son imaginaciones y a menudo son autoimpuestos. A Álvaro, por su compañía, por endurecerme y por enseñarme a hacer cosas que jamás hubiera creído posibles.

A toda mi familia. A Elisa, por darme ánimos siempre, por su empatía y por nunca dejar de interesarse por el progreso mi Tesis, aun cuando mis respuestas eran casi siempre las mismas. A mi padre, por creer en mí, por su apoyo, por su sensatez y por sus valiosos consejos. A mi madre, por su incesante esfuerzo, por mantenerme la autoestima siempre a flote y por no dejar pasar un día sin decirme que me quiere y que está orgullosa. A Inma y Rubén, que son mis modelos a seguir. A Ana, que ha sido mi guía. La familia no es un derecho, sino un privilegio, y soy una persona con mucha suerte.

A mis amigos, que también son mi familia y mi tesoro. Me habéis dado toda la alegría y la motivación que hubiese podido desear. A Aurora, Cristina y Javi, que son mis otros hermanos. A José Antonio, que tantísimo cariño me ha transmitido durante años. A Lula, que hace que no me olvide de mirar hacia los sueños y el futuro. A Curro, que me ha comprendido y ha conseguido que me ría de las cosas malas. A Gema y a Myriam, aunque sigamos caminos un poco distintos. Y a Miki, aun en la distancia.

A Julia y a Natalia, por su compañía, que me hizo llevadera una travesía muy ardua. A Alfonso y a Samuel, porque con ellos ya no estaba tan solo.

A Isa, Javi, Martina y Paula, por darme afecto, valor y esperanza. Y a Isa otra vez, por echarme una mano con MATLAB, con la estadística y con todo lo que necesité. A Ana, por su gran ayuda, amabilidad y sentido común, y por quitarme de la cabeza las angustias tontas.

A mis compañeros del Departamento de Fisiología, los que siguen aquí y los que, por diferentes motivos, se marcharon. Me han escuchado, me han dado aliento, me han hecho sentir integrado a pesar de mi timidez y siempre han alejado el pesimismo. Con ellos me he reído, he aprendido y he disfrutado. Gracias por todo, por haberme ayudado tanto y por haber sido una compañía tan maravillosa.

Trabajo financiado por el V Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	15
1.1 Organización temporal y homeostasis del ciclo vigilia-sueño.....	19
1.2 Características de las fases del ciclo vigilia-sueño	20
1.2.1 Características de la vigilia	22
1.2.2 Características de la fase NREM.....	23
1.2.3 Características de la fase REM	25
1.2.4 Las transiciones entre estados	27
1.3 Control central de los estados de alerta	28
1.3.1 Estructuras encefálicas implicadas en la vigilia.....	28
1.3.2 Estructuras encefálicas implicadas en la fase NREM del sueño.....	29
1.3.3 Estructuras encefálicas implicadas en la fase REM del sueño	30
1.4 La privación de sueño.....	32
1.4.1 Métodos instrumentales de privación de fase REM	33
1.4.2 Métodos farmacológicos de privación de fase REM	34
1.4.3 Efectos de la privación de sueño sobre la actividad cerebral y el EEG	35
1.5 El sistema oculomotor como modelo	36
1.5.1 El reflejo vestibulo-ocular	36
1.5.2 Los movimientos oculares rápidos.....	39
2 OBJETIVOS.....	41
3 MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1 Instrumentación de los animales	47
3.1.1 Anestesia, preoperatorio y consideraciones generales	47
3.1.2 Implantación de los electrodos de electroencefalografía y referencia	48
3.1.3 Implantación de los electrodos de electromiografía	49
3.1.4 Fijación de la preparación y fabricación de la torreta de registro	50
3.1.5 Implantación de las bobinas periorbitales.....	51
3.1.6 Postoperatorio y periodo de recuperación.....	52
3.2 Inmovilización para el registro de los movimientos oculares	52
3.3 Privación de la fase REM del sueño.....	54
3.3.1 Privación por el método de la plataforma sobre agua (<i>flower pot technique</i>).....	54
3.3.2 Privación por administración de desipramina	55
3.3.2.1 Estudio de la eficacia de la desipramina como método de privación.....	55
3.3.2.2 Privación de 3 días por administración de desipramina	55
3.4 Registro de variables electrofisiológicas y de los movimientos oculares	56
3.4.1 Registro crónico del ciclo vigilia-sueño	56

3.4.2 Registro del reflejo vestíbulo-ocular en condiciones de inmovilidad	58
3.4.3 Registro de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM	60
3.5 Eutanasia	60
3.6 Análisis y tratamientos estadísticos	61
3.6.1 Análisis del ciclo vigilia-sueño	61
3.6.1.1 Identificación de los estados de alerta por el método convencional	61
3.6.1.2 Identificación de los estados de alerta por el índice ponderado de HFO	62
3.6.1.3 Evaluación de la concordancia mediante el coeficiente kappa de Cohen	63
3.6.2 Análisis de los efectos de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica.....	65
3.6.2.1 Selección de intervalos temporales	65
3.6.2.2 Análisis de la magnitud y la frecuencia del pico de potencia de la actividad theta	66
3.6.2.3 Análisis de la potencia del EEG.....	66
3.6.3 Análisis del reflejo vestíbulo-ocular	67
3.6.3.1 Análisis de la ganancia.....	67
3.6.3.2 Análisis de las propiedades de las fases rápidas	67
3.6.3.3 Análisis de la covarianza entre la amplitud y la velocidad pico de las fases rápidas.....	68
3.6.4 Análisis de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM	68
4 RESULTADOS	69
4.1 Diseño y validación de un método alternativo para la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño	71
4.1.1 Determinación del índice ponderado de HFO para los diferentes estados	71
4.1.2 Validación del índice ponderado de HFO.....	73
4.2 Efectos de la privación de fase REM sobre el ciclo vigilia-sueño	75
4.2.1 Efectos de la privación de 4 días por el método de la plataforma sobre agua	75
4.2.2 Efectos de la privación de 6 días por el método de la plataforma sobre agua	78
4.2.3 Efectos de la administración de una única dosis de desipramina sobre la fase REM	81
4.2.4 Efectos de la privación de 3 días por administración de desipramina.....	84
4.3 Efectos de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica	90
4.3.1 Efectos sobre el EEG durante la fase REM	90
4.3.2 Efectos sobre el EEG durante la vigilia tranquila.....	99
4.3.3 Efectos sobre el EEG durante la fase NREM.....	104
4.4 Efectos de la privación de fase REM sobre el reflejo vestíbulo-ocular	106
4.4.1 Efectos de la privación de fase REM sobre la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular.....	107

4.4.1.1 Cambios inducidos por la privación por el método de la plataforma sobre agua	107
4.4.1.2 Cambios inducidos por la privación por administración de desipramina	110
4.4.2 Efectos de la privación de fase REM sobre las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular.....	113
4.4.2.1 Cambios inducidos por la privación por el método de la plataforma sobre agua	114
4.4.2.2 Cambios inducidos por la privación por administración de desipramina	116
4.5 Efectos de la privación de fase REM sobre los movimientos oculares rápidos durante la fase REM.....	118
5 DISCUSIÓN.....	127
5.1 Desarrollo del índice ponderado de HFO para la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño	129
5.1.1 Fundamentos, obtención e interpretación del índice ponderado de HFO	129
5.1.2 Evaluación de la concordancia entre el índice ponderado de HFO y el método de análisis convencional.....	131
5.1.3 Ventajas y limitaciones del índice ponderado de HFO.....	133
5.2 Efectos de la privación de fase REM sobre el ciclo vigilia-sueño	135
5.2.1 Eficacia y especificidad de la desipramina como medio para la privación de fase REM	137
5.2.2 Modificación y homeostasis del ciclo vigilia-sueño tras la privación de fase REM ..	138
5.2.2.1 Cinética temporal del rebote	138
5.2.2.2 Cinética temporal de los cambios en la duración y el número de episodios de fase REM.....	140
5.3 Efecto de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica.....	142
5.3.1 Modificación del EEG a lo largo del ciclo vigilia-sueño	142
5.3.2 Posibles causas del incremento de la frecuencia del EEG.....	145
5.3.2.1 Cambios en la temperatura cerebral	145
5.3.2.2 Excitabilidad neuronal.....	148
5.3.2.3 Neurotransmisión.....	150
5.3.3 Implicaciones del incremento de la frecuencia del EEG	152
5.3.3.1 Las oscilaciones y el procesamiento cognitivo	152
5.3.3.2 Frecuencia de las oscilaciones y epilepsia.....	155
5.3.3.3 Frecuencia de las oscilaciones y análisis del ciclo vigilia-sueño	156
5.4 Efecto de la privación de fase REM sobre el reflejo vestíbulo-ocular.....	157
5.4.1 Reflejo vestíbulo-ocular y nivel de alerta.....	158
5.4.2 Posibles orígenes de la modificación del reflejo vestíbulo-ocular	160
5.5 Efecto de la privación de fase REM sobre los movimientos oculares rápidos.....	163

5.5.1 Modificación de las características de los movimientos oculares rápidos y de su latencia de aparición	163
5.5.2 Implicaciones del incremento de la actividad oculomotora durante la fase REM...	167
6 CONCLUSIONES.....	169
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

ABREVIATURAS

EEG: electroencefalograma

EMG: electromiograma

Fase NREM: fase de movimientos oculares no-rápidos

Fase REM: fase de movimientos oculares rápidos

HFO: oscilación de alta frecuencia (110-160 Hz)

Ondas P: ondas pontinas

Ondas PGO: ondas ponto-genículo-occipitales

1 INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El sueño es un fenómeno universal en los vertebrados (Campbell y Tobler, 1984) y se ha demostrado su existencia en numerosos grupos de invertebrados (Anafi y col., 2019), lo que pone de manifiesto que se trata de un fenómeno filogenéticamente antiguo y muy conservado evolutivamente. Ha sido objeto de fascinación, estudio y debate a lo largo de la historia.

La trascendencia del sueño para la vida se hace patente por los trastornos que conlleva su carencia. Se sabe que la privación de sueño provoca alteraciones en diversos sistemas fisiológicos y conduce al deterioro de la salud. Rechtschaffen y sus colaboradores comprobaron que impedir el sueño de forma continuada en la rata produce múltiples alteraciones fisiológicas, la debilitación de los individuos y, finalmente, su muerte (Rechtschaffen y Bergmann, 2002). Dichas alteraciones fisiológicas incluyen cambios en la actividad cerebral, el metabolismo, la termorregulación, el funcionamiento del sistema endocrino y la respuesta inmune, y se acompañan de signos de deterioro físico tales como la pérdida de peso, un aspecto desaseado, la debilidad muscular y la aparición de lesiones en la piel y en determinados órganos (Everson, 1995; Rechtschaffen y col., 1983; Rechtschaffen y Bergmann, 2002). Quizás uno de los ejemplos que ilustran de forma más clara la relevancia del sueño para los humanos sea el insomnio familiar fatal. Se trata de una enfermedad hereditaria rara causada por priones, que cursa con una disrupción del sueño y conduce indefectiblemente a la muerte al cabo de meses o pocos años (Montagna y col., 2003). Los pacientes con esta enfermedad sufren una marcada pérdida de sueño que se acompaña de somnolencia, de alucinaciones y de alteraciones endocrinas, de la presión arterial y de la actividad cerebral, así como de problemas de memoria, motores y del equilibrio, entre otros trastornos (Montagna y col., 2003).

A pesar de la que la implicación del sueño en el funcionamiento correcto del organismo es evidente, aún no existe un consenso acerca de sus funciones adaptativas o sobre la razón de su conservación a lo largo de la escala filogenética (Joiner, 2016). De forma general, se tiende a asociar la función del sueño con la recuperación del organismo tras la vigilia (Vyazovskiy y Delogu, 2014). Sin embargo, el papel del sueño parece ir más allá de una mera puesta a punto para devolver al organismo a sus

condiciones iniciales. Se le atribuyen funciones tan dispares como el ahorro de energía (Berger y Phillips, 1995; Siegel, 2009), la redirección de la energía hacia procesos de regeneración y mantenimiento (Schmidt, 2014), la separación de las reacciones anabólicas y catabólicas del organismo en el tiempo (Anafi y col., 2019), la consolidación de la memoria (Diekelmann y Born, 2010; Walker y Stickgold, 2004), la homeostasis sináptica mediante la modulación de la fuerza de las sinapsis (Born y Feld, 2012; Tononi y Cirelli, 2006) o la eliminación de sustancias de desecho (Inoué y col., 1995).

Durante mucho tiempo se consideró al sueño como un estado de inactividad, pasivo y homogéneo. Aserinsky y Kleitman (1953 y 1955) analizaron la motilidad ocular durante el sueño en humanos y observaron que el patrón de movimientos oculares no era uniforme a lo largo del tiempo. Asimismo, detectaron que el electroencefalograma (EEG) de los sujetos mostraba patrones de actividad diferentes en función del tipo de movimientos oculares predominante, y observaron cambios en las frecuencias respiratoria y cardíaca y en la motilidad corporal (Aserinsky y Kleitman, 1953 y 1955). Estos resultados pusieron en tela de juicio la percepción del sueño como un estado uniforme de inactividad y condujeron a su división en dos fases diferenciadas, que se nombraron según el tipo de actividad ocular predominante en cada una de ellas: la fase REM (del inglés *rapid eye movement*), en la que aparecían los movimientos oculares rápidos, bien aislados o agrupados en brotes, y la fase NREM (del inglés *non-rapid eye movement*), en la que predominaban los movimientos oculares lentos. Ambas fases se han encontrado en todas las especies de mamíferos estudiadas, incluyendo a los monotremas (Siegel, 2005), los mamíferos actuales más primitivos.

La percepción del sueño como un estado de reposo encaminado a la recuperación del organismo contrasta con el elevado nivel de actividad cerebral que se registra durante la fase REM, cuya magnitud es comparable con la de la vigilia (Vyazovskiy y Delogu, 2014). Lejos de constituir un mero periodo de inactividad o reposo, a la fase REM se le han atribuido funciones tales como contribuir a la maduración del sistema nervioso y de los sistemas motores durante el desarrollo embrionario y juvenil de los animales (Blumberg y col., 2013; Mohns y Blumberg, 2010; Sokoloff y col., 2015; Tiriac y col., 2015), el refinamiento de los sistemas motores durante la vida adulta (Blumberg, 2010), el desarrollo y mantenimiento de las conexiones neuromusculares necesarias

para la generación de movimientos oculares precisos y coordinados binocularmente (Berger, 1969), la consolidación de la memoria (Boyce y col., 2016; Diekelmann y Born, 2010), la regulación de la excitabilidad cerebral (Grosmark y col., 2012) y la modulación de la fuerza de las sinapsis (Niethard y Born, 2019). De este modo, a pesar de que no existe consenso acerca de las funciones ni del valor adaptativo de este estado, las evidencias apuntan a que podría estar fuertemente relacionado con el procesamiento cognitivo y con los sistemas motores. Sin embargo, en la actualidad existen lagunas de conocimiento acerca de la importancia de la fase REM –y del impacto de su ausencia– sobre la actividad cerebral, la musculatura y el control motor.

1.1 Organización temporal y homeostasis del ciclo vigilia-sueño

Durante el ciclo vigilia-sueño, la vigilia, la fase NREM y la fase REM se suceden de forma cíclica en el tiempo. La rata presenta un patrón polifásico de sueño, lo que implica que experimentan múltiples episodios de vigilia y de sueño a lo largo del día. Periodos de vigilia de duración variable conducen al desarrollo de episodios de fase NREM, que, si no son interrumpidos por una nueva vigilia, dan paso a episodios de fase REM. Esta alternancia entre estados no ocurre de forma aleatoria. Borbély (1982) propuso un modelo en el que explicó la organización temporal del ciclo vigilia-sueño mediante dos procesos: un proceso homeostático (proceso S) y un proceso circadiano (proceso C). La interacción entre ambos procesos determinaría la propensión a desarrollar los diferentes estados del ciclo a lo largo del tiempo.

La propensión al sueño depende en gran medida del sistema circadiano (Fuller y col., 2006). Gran parte de los animales muestran variaciones en la arquitectura del ciclo vigilia-sueño relacionadas con el ciclo luz-oscuridad, de forma que hay determinados momentos del día en los que la vigilia o el sueño se ven favorecidos (Tobler, 1995). Esta variación circadiana en la propensión al sueño interacciona con el proceso homeostático, determinando la estructura del ciclo (Borbély, 1982). El proceso homeostático, por su parte, se basa en que la propensión al sueño aumenta de forma proporcional al tiempo transcurrido en vigilia (Borbély, 1982). Este incremento de la propensión al sueño se atribuye a la acumulación de una “presión homeostática”

durante la vigilia (Fuller y col., 2006). En contraposición, durante el sueño ocurre una progresiva disminución de la presión homeostática, lo que incrementa la probabilidad de que ocurra una transición hacia la vigilia (Fuller y col., 2006).

El incremento de la propensión al sueño se atribuye a una acumulación de sustancias que inhiben a las neuronas responsables del mantenimiento de la vigilia, favoreciendo de este modo la desinhibición de las estructuras promotoras del sueño y, por consiguiente, su instauración (Brown y col., 2012). Entre las sustancias que promueven el sueño se han descrito la adenosina, el óxido nítrico, la prostaglandina D₂ y las citoquinas (Brown y col., 2012).

Cuando se impide el desarrollo del sueño durante un periodo de tiempo, la presión homeostática aumenta. Cuando la restricción del sueño desaparece, se produce un fenómeno compensatorio denominado “rebote”, que consiste en un incremento del tiempo de sueño durante el periodo subsiguiente (Rechtschaffen y col., 1999). La existencia de un rebote post-privación de sueño se ha descrito tanto para la fase REM como para la fase NREM. Inicialmente, la fase REM se creía bajo un control fundamentalmente circadiano e influenciada en menor medida que la fase NREM por el proceso homeostático (Borbély, 1982). Sin embargo, la existencia de un rebote de fase REM tras su privación (Rechtschaffen y col., 1999) muestra que este estado también está sujeto a una regulación homeostática.

1.2 Características de las fases del ciclo vigilia-sueño

La vigilia, la fase NREM y la fase REM muestran profundas diferencias que facilitan su reconocimiento, que generalmente se basa en el estudio de tres parámetros: el EEG, el electromiograma (EMG) y la motilidad ocular. Al tratarse de estados complejos cuya alternancia implica grandes cambios en la actividad de múltiples sistemas, tanto a nivel central como periférico, existen diversas variables que aportan información adicional para su identificación, tales como el electrocardiograma, la frecuencia respiratoria o la motilidad corporal.

El EEG es, probablemente, la fuente de información más importante en lo que respecta a la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño. Ofrece datos sobre la

actividad cerebral a lo largo del tiempo y permite, por tanto, la detección de cambios en el sistema nervioso central asociados con los estados de alerta y con las transiciones entre estados. Constituye una herramienta importante en neurociencia, ya que tiene una resolución temporal muy superior a la de otros métodos para el estudio de la actividad cerebral, tales como la imagen por resonancia magnética (Kropotov, 2009). Mediante la electroencefalografía se detectan fenómenos eléctricos que tienen su origen en la actividad sincrónica de grupos o poblaciones de neuronas. La actividad de múltiples redes de neuronas que producen campos eléctricos a intervalos de distinta duración da lugar a la aparición en el EEG de oscilaciones eléctricas que abarcan distintas bandas de frecuencia. Se sabe que las características de algunas de estas oscilaciones se ven alteradas por la privación de sueño (Borbély y col., 1981 y 1984; Endo y col., 1997; Vyazovskiy y Tobler, 2005), lo que hace que, además de permitir la identificación de los estados de alerta, constituyan un objeto de estudio interesante en cuanto a la elucidación de las funciones del sueño.

Las oscilaciones y sus mecanismos subyacentes están muy conservados evolutivamente, de forma que las que se han identificado en humanos están presentes también en el EEG de otros mamíferos (Buzsáki y col., 2013). Sin embargo, existen ciertas diferencias entre especies, de forma que el rango de frecuencias que abarcan es ligeramente distinto en los humanos y en modelos animales como el gato y la rata. Dado que los resultados de la presente Tesis Doctoral se refieren exclusivamente a la rata, se hará referencia a las características de las actividades del EEG en este animal.

A pesar de que la rata es un modelo ampliamente utilizado en estudios sobre el sueño, no existe un conjunto de reglas unificado y globalmente aceptado para la identificación de las fases del ciclo vigilia-sueño en este animal (Robert y col., 1999). En su lugar, diferentes laboratorios, basándose generalmente en el estudio del EEG y del EMG, han desarrollado múltiples métodos de análisis para la determinación de los estados de alerta en la rata (Benington y col., 1994a; Libourel y col., 2015; Louis y col., 2004; Mileva-Seitz y col., 2005; Neckelmann y col., 1994; Rempe y col., 2015; Stephenson y col., 2009; van Luijtelaar y Coenen, 1984). Ocasionalmente, para la identificación de los estados de alerta se analizan los movimientos oculares (Gandolfo y col., 1988; Gottesmann y col., 1977) u otras variables como el movimiento del cuerpo

(Mang y col., 2014; Neuhaus y Borbély, 1978; Ruigt y col., 1989; Zeng y col., 2012) y el ritmo respiratorio (Bastianini y col., 2017; Mang y col., 2014; Zeng y col., 2012).

1.2.1 Características de la vigilia

Durante la vigilia, en el EEG hay un predominio de las ondas de alta frecuencia y de baja amplitud y el EMG denota un tono elevado en la musculatura esquelética (Jouvet, 1967). En este estado se detectan varios tipos de movimientos oculares, que suelen ser conjugados y cuyas funciones, de forma general, están relacionadas con la percepción visual y con la exploración del entorno. Los movimientos oculares sacádicos permiten la orientación de la mirada hacia zonas o elementos de interés. Los movimientos de seguimiento, por su parte, permiten mantener la mirada centrada sobre un elemento móvil. Otros movimientos, de carácter reflejo, tienen como objetivo la estabilización de la imagen sobre la retina para la mejora de la agudeza visual: el reflejo vestíbulo-ocular, que permite compensar las rotaciones de la cabeza mediante el giro de los ojos en sentido opuesto, y el reflejo optocinético, que genera de forma automática movimientos compensatorios cuando la imagen visual se desplaza sobre la retina. A diferencia de los anteriores, los movimientos de vergencia no son conjugados y consisten en la rotación de los ojos en sentidos opuestos en el plano horizontal para permitir la visualización binocular del elemento de interés a diferentes distancias. En los animales afoveados como la rata, la visión depende fundamentalmente de los reflejos vestíbulo-ocular y optocinético, mientras que en los animales con fóvea cobran importancia los demás movimientos (Delgado-García, 2000; Leigh y Zee, 1983). Adicionalmente, los ojos pueden desplazarse debido al parpadeo o a comportamientos tales como la roedura en la rata.

Las actividades del EEG más características de la vigilia reciben el nombre de theta y gamma, que también están presentes durante la fase REM (McCarley, 2007). La actividad theta se detecta en el hipocampo y en la corteza cerebral (Young y McNaughton, 2009) y abarca el intervalo de frecuencias entre 6 y 9 Hz (Benington y col., 1994a), aunque en ocasiones se le atribuye un rango más amplio, abarcando desde 4 hasta 12 Hz (Jing y col., 2016; Long y col., 2014; Montgomery y col., 2008). Theta ocurre

durante la vigilia con potencia y frecuencia variables (Leung, 1984; Whishaw y Vanderwolf, 1973), desaparece durante la fase NREM y está presente durante toda la fase REM (Benington y col., 1994a; Sánchez-López y col., 2018). Se postula que su origen se encuentra el núcleo *reticularis pontis oralis* (Vertes y Kocsis, 1997). Este produce una señal tónica que sería transformada por el núcleo supramamilar en una señal rítmica, que incidiría en el septo medial (Vertes y Kocsis, 1997). El septo medial actuaría como marcapasos, induciendo la aparición de un patrón oscilatorio de actividad en las neuronas piramidales y en las interneuronas del hipocampo, y este comportamiento constituiría el sustrato anatómico de la actividad theta (Vertes y Kocsis, 1997).

La actividad gamma engloba el intervalo de frecuencias entre los 40 y los 120 Hz (Bragin y col., 1995; Montgomery y col., 2008). Tanto en el hipocampo (Bragin y col., 1995) como en la corteza cerebral de la rata (Sirota y col., 2008) se pueden registrar actividades en el rango de frecuencia de gamma. Se postula que la generación en la corteza de oscilaciones gamma se produce a nivel local y se debe a la interacción recíproca entre las neuronas piramidales y las células de los cestos inmunorreactivas a parvalbúmina, siendo la activación e inhibición cíclica de las neuronas piramidales el origen de la oscilación (Buzsáki y Wang, 2012; McCarley, 2007).

En el EEG se pueden encontrar actividades que no proceden del cerebro. La señal eléctrica derivada de la actividad muscular, transmitida por conducción de volumen, contamina el EEG y da lugar a actividades que abarcan desde los 20 hasta los 600 Hz (Muthukumaraswamy, 2013). Esta contaminación se hace especialmente patente durante la vigilia, disminuyendo mucho durante las fases NREM y REM debido a la reducción de la actividad muscular fásica y a la disminución o pérdida del tono.

1.2.2 Características de la fase NREM

Desde el punto de vista conductual, la entrada en fase NREM desde la vigilia se caracteriza por una disminución de la respuesta ante estímulos (Brown y col., 2012; Zepelin y col., 2005). El tono de la musculatura esquelética disminuye respecto a la vigilia, aunque no desaparece (Jouvet, 1967). Durante la fase NREM, los movimientos oculares propios de la vigilia son sustituidos por movimientos oculares lentos y erráticos

(Aserinsky y Kleitman, 1955). En la rata y el gato, estas derivas lentas y no conjugadas coexisten con una tendencia tónica de elevación y divergencia de los ojos (Bon y col., 1980; Márquez-Ruiz y Escudero, 2008; Sánchez-López y Escudero, 2011). Esta divergencia se atribuye a la disminución del tono de los músculos rectos mediales, que participan en la generación de los movimientos oculares horizontales y cuya contracción provoca la convergencia de los ojos (Márquez-Ruiz y Escudero, 2008; Sánchez-López y Escudero, 2011).

La actividad del EEG propia de la fase NREM se caracteriza por un predominio de las ondas lentas y por la aparición de brotes discretos de ondas de mayor frecuencia conocidos como “husos del sueño” (Dement y Kleitman, 1957; Jouvet, 1967). Entre las ondas lentas destaca la actividad delta, que abarca desde los 0,5 hasta los 4 Hz (Benington y col., 1994a). Esta actividad tiene su origen en el circuito talamocortical y se debe a que durante la fase NREM ocurre una hiperpolarización de las neuronas talamocorticales (Steriade y col., 1993). En estas circunstancias, las neuronas talamocorticales desarrollan un patrón de actividad rítmico y excitan a las neuronas piramidales de la corteza cerebral, dando lugar al fenómeno eléctrico que se percibe en el EEG (Brown y col., 2012). Los husos del sueño también tienen su origen en la hiperpolarización del circuito talamocortical y son el principal componente de la actividad sigma del EEG (Bjorvatn y col., 1998; Borbély y col., 1984; Stephenson y col., 2009), a la que se le atribuye un rango comprendido desde los 10 u 11 Hz hasta los 14 o 16 Hz en la rata (Benington y col., 1994a; Bjorvatn y col., 1998; Lancel y col., 1996). Los husos se deben a la generación de brotes de potenciales de acción en las neuronas talamocorticales, que excitan a las neuronas piramidales de la corteza (Brown y col., 2012; Steriade y col., 1993). Los husos se producen durante la fase NREM y desaparecen durante la vigilia y la fase REM debido a que las neuronas talamocorticales pasan a tener un disparo tónico (Marks y Roffwarg, 1993).

Una actividad electrofisiológica adicional cuyo sustrato anatómico se halla en el hipocampo son los complejos *sharp wave-ripple*, que se pueden detectar en registros de campo en esta estructura durante la vigilia tranquila y la fase NREM (Brown y col., 2012). Su origen se encuentra en la fluctuación rápida del potencial de membrana de

redes locales de neuronas piramidales ante las entradas inhibitorias procedentes de las interneuronas (Ylinen y col., 1995).

1.2.3 Características de la fase REM

Durante la fase REM, el tono de la musculatura esquelética experimenta una disminución progresiva que lleva hasta su desaparición completa, instaurándose una atonía muscular (Jouvet, 1967; Jouvet y Michel, 1959; Kleitman, 1987). La atonía se produce por la inhibición tónica de las motoneuronas (Chase y Morales, 1983; Lai y Siegel, 1990; Morales y col., 1987), que se debe a su hiperpolarización (Glenn y col., 1978) y está mediada por estructuras del tronco del encéfalo (Arrigoni y col., 2016; Chase, 1983; Hajnik y col., 2000). De forma esporádica, se producen brotes aislados de actividad muscular fásica que se manifiestan como contracciones rápidas, breves y locales de grupos de fibras musculares, conocidas como mioclonias (Chase y Morales, 1982; De Lisi, 1932; Dement, 1958). Las mioclonias se producen cuando las motoneuronas reciben entradas excitadoras lo bastante intensas como para vencer la hiperpolarización y desencadenar potenciales de acción, que excitan al músculo (Chase y Morales, 1982).

Durante la fase REM ocurren movimientos oculares rápidos y conjugados (Aserinsky y Kleitman, 1953 y 1955), que pueden agruparse en brotes o producirse de forma aislada (Escudero y Vidal, 1996; Márquez-Ruiz y Escudero, 2008; Sánchez-López y Escudero, 2011). Clásicamente, a estos movimientos se les atribuía una gran similitud con los sacádicos. Sin embargo, se ha demostrado que los movimientos oculares rápidos de la fase REM y los movimientos propios de la vigilia presentan características distintas (Escudero y Vidal, 1996; Márquez-Ruiz y Escudero, 2008; Sánchez-López y Escudero, 2011). En el gato, la rata y la cobaya, los movimientos oculares rápidos se superponen a una tendencia tónica de convergencia y depresión de los ojos (Bon y col., 1980; Escudero y Vidal, 1996; Márquez-Ruiz y Escudero, 2008; Sánchez-López y Escudero, 2011). Estos movimientos se producen coincidiendo con la aparición de eventos electrofisiológicos conocidos como ondas ponto-genículo-occipitales (PGO) (Escudero y Márquez-Ruiz, 2008; Márquez-Ruiz y Escudero, 2008; Michel y col., 1964), que reciben este nombre

porque se registran en el puente del encéfalo, en el núcleo geniculado lateral y en la corteza occipital en diversos animales. En los roedores, sin embargo, estas actividades no se registran en el núcleo geniculado ni en la corteza occipital (Stern y col., 1974), por lo que algunos investigadores llaman “ondas pontinas” u “ondas P” al fenómeno equivalente en la rata (Datta, 2000 y 2006). La ocurrencia simultánea de ondas PGO y de movimientos oculares rápidos durante la fase REM condujo a que se propusiera que existe una relación entre ambos fenómenos (Nelson y col., 1983). El registro durante la fase REM de la musculatura extraocular muestra que las motoneuronas que la inervan generan brotes de actividad que coinciden con la ocurrencia de las ondas PGO (Escudero y Márquez-Ruiz, 2008).

La existencia de los movimientos oculares rápidos parecería implicar que la musculatura extraocular estuviese exenta del desarrollo de atonía. Sin embargo, las motoneuronas que inervan a los músculos extraoculares están sometidas a una inhibición tónica (Escudero y Márquez-Ruiz, 2008), de forma similar a las motoneuronas que inervan a la mayor parte de la musculatura esquelética (Chase, 2013; Chase y Morales, 1983). De este modo, los movimientos oculares rápidos, al igual que las mioclonias, se producen ante entradas excitadoras de magnitud suficiente como para generar potenciales de acción en las motoneuronas.

El EEG durante la fase REM se caracteriza, de forma semejante a la vigilia, por un predominio de las oscilaciones de baja amplitud y elevada frecuencia (Dement, 1958; Jouvet y col., 1959). La similitud de esta actividad electroencefalográfica con la del cerebro despierto llevó a la acuñación de los términos “sueño paradójico” (Jouvet, 2004), que en la actualidad se utiliza profusamente como sinónimo de “fase REM”, y “sueño activo” (Dement, 1958). Durante la fase REM, las actividades electroencefalográficas más características son theta, gamma y, en los roedores, la oscilación de alta frecuencia (HFO) (Sirota y col., 2008). La HFO es una actividad descubierta recientemente a la que se atribuye la banda comprendida entre 110 y 160 Hz, a menudo referida como “gamma alto” o “gamma rápido” (Canolty y col., 2006; Scheffer-Teixeira y col., 2012; Scheffzük y col., 2011; Tort y col., 2013). Está presente en el hipocampo y en la corteza cerebral durante la fase REM (Scheffer-Teixeira y col., 2012; Scheffzük y col., 2011), aunque también se puede detectar durante la vigilia (Scheffer-

Teixeira y Tort, 2017). Experimenta un incremento progresivo en potencia durante la transición a fase REM (Sánchez-López y col., 2018). Su sustrato anatómico aún es desconocido.

1.2.4 Las transiciones entre estados

Tras un periodo de vigilia de duración variable, se produce la fase NREM del sueño. A su vez, si la fase NREM no se ve interrumpida por una nueva vigilia, se puede producir un episodio de fase REM. Los cambios que tienen lugar a nivel central y periférico con la alternancia entre los estados del ciclo vigilia-sueño no se producen de forma abrupta, sino que ocurren paulatinamente durante una ventana de tiempo conocida como “periodo de transición”. Durante las transiciones, los fenómenos fisiológicos y conductuales propios de un estado se van extinguiendo gradualmente, mientras que los propios del siguiente aparecen y se desarrollan de igual manera (Merica y Fortune, 2004; Ogilvie, 2001; Sánchez-López y col., 2018). Las transiciones comprenden cambios en el tono muscular, las propiedades del EEG, el patrón de movimientos oculares, las frecuencias respiratoria y cardíaca y otras variables fisiológicas (Saper y col., 2010). Por tanto, dado que se trata de procesos de naturaleza continua y progresiva, el establecimiento de umbrales o límites precisos entre los estados es difícil y conlleva cierta subjetividad.

Se ha demostrado que, al menos durante la transición a fase REM en la rata, la extinción de las actividades asociadas con el estado de origen y el desarrollo de las asociadas con el estado de destino ocurren de forma secuencial y ordenada, revelando un elevado nivel de organización y de coordinación entre las estructuras implicadas en la generación y el mantenimiento de los diferentes estados de alerta (Sánchez-López y col., 2018). Los sistemas centrales que producen los estados del ciclo vigilia-sueño y sus interacciones se han estudiado en profundidad y se conocen bien.

1.3 Control central de los estados de alerta

El sueño es un fenómeno dinámico y complejo, producto de la interacción entre múltiples estructuras encefálicas (Brown y col., 2012). El mantenimiento de la vigilia y de las fases NREM y REM del sueño, así como su alternancia periódica, son posibles gracias a que las estructuras implicadas en su generación forman un gran sistema profusamente interconectado, en el que las estructuras promotoras de un estado emiten proyecciones inhibitorias sobre las promotoras de los otros (Saper y col., 2001 y 2010). La alternancia entre los estados viene dada por los cambios en la magnitud de estas influencias inhibitorias, que determinan qué estructuras se activan y cuáles quedan inactivadas.

1.3.1 Estructuras encefálicas implicadas en la vigilia

Clásicamente, la generación de la vigilia se ha atribuido a numerosas poblaciones de neuronas que emplean multitud de neurotransmisores distintos. Entre ellas se encuentran el *locus coeruleus*, que emplea noradrenalina; los núcleos dorsal y medial del rafe, que emplean serotonina; el núcleo tuberomamilar, que emplea histamina, y la zona ventral de la sustancia gris periacueductal, que emplea dopamina (Fuller y col., 2006; Saper y col., 2005). Todas estas estructuras están activas durante la vigilia, muestran una actividad reducida durante la fase NREM y quedan prácticamente silenciadas durante la fase REM (Fuller y col., 2006). El núcleo tegmental lateral y el pedunculopontino, que emplean acetilcolina, también se encuentran activos durante la vigilia, con la diferencia de que también lo están durante la fase REM. Se sabe que esta red de estructuras emite proyecciones excitadoras hacia los núcleos talámicos de relevo, el hipotálamo lateral, el prosencéfalo basal y la corteza cerebral (Saper y col., 2005). En particular, las proyecciones excitadoras del núcleo tegmental lateral y el pedunculopontino son fundamentales para mantener la actividad del circuito talamocortical (Fuller y col., 2006). El núcleo parabraquial, que emplea glutamato, también podría ser fundamental para la vigilia (Fuller y col., 2011). El hipotálamo lateral parece constituir por sí mismo una estructura promotora de la vigilia, ya que se postula que contribuye al mantenimiento de este estado en caso de lesión de las estructuras

promotoras de la vigilia del tronco del encéfalo (Saper y col., 2010). Sus neuronas contienen orexinas, que promueven la actividad del *locus coeruleus*, el rafé y el núcleo tuberomamilar (Fuller y col., 2006). La eliminación de las orexinas mediante manipulación genética en el ratón genera individuos narcolépticos (Chemelli y col., 1999), lo que destaca su relación con el mantenimiento de la vigilia.

Recientemente, la visión de la regulación de la vigilia ha cambiado y las estructuras colinérgicas y monoaminérgicas mencionadas anteriormente han pasado a considerarse meramente moduladoras de este estado (Saper y Fuller, 2017). En la actualidad, el control de la generación de la vigilia se atribuye mayormente a estructuras GABAérgicas y glutamatérgicas (Saper y Fuller, 2017). Se ha determinado que las poblaciones de neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas del prosencéfalo basal son fundamentales para el mantenimiento de la vigilia, dado que su lesión conjunta provoca una disminución de la actividad cortical y la sustitución de las actividades electroencefalográficas propias de la vigilia por ondas lentas (Fuller y col., 2011). Su activación optogenética, por el contrario, promueve la vigilia (Xu y col., 2015). La lesión de las neuronas glutamatérgicas de los núcleos parabraquial y pedunculopontino provoca síntomas similares a la lesión del prosencéfalo basal, por lo que también se las considera promotoras de la vigilia (Saper y Fuller, 2017).

1.3.2 Estructuras encefálicas implicadas en la fase NREM del sueño

En los años 50, Nauta (1946) propuso la existencia de un centro promotor del sueño en el área preóptica del hipotálamo. Décadas más tarde se detectó una población de neuronas GABAérgicas y galaninérgicas en el núcleo preóptico ventrolateral que emite proyecciones inhibitorias hacia múltiples estructuras relacionadas con la vigilia, entre las que se encuentran la sustancia gris periacueductal, el núcleo tuberomamilar, el *locus coeruleus*, los núcleos dorsal y medial del rafé, el núcleo parabraquial y el hipotálamo lateral (Sherin y col., 1996 y 1998). Se propuso que el núcleo preóptico ventrolateral podría inducir la transición hacia la fase NREM mediante la inhibición de estas estructuras promotoras de la vigilia. La lesión farmacológica de este núcleo produce una marcada reducción de las cantidades de fase NREM y de fase REM, próxima

al 50% (Lu y col., 2000), y la activación de sus neuronas galaninérgicas promueve el sueño (Kroeger y col., 2018), lo que confirma su implicación en el mantenimiento de este estado. Múltiples estructuras promotoras de la vigilia emiten, a su vez, proyecciones hacia el núcleo preóptico ventrolateral, estableciéndose una inervación recíproca (Saper y col., 2010). Las neuronas de este núcleo se inhiben en presencia de acetilcolina, noradrenalina, serotonina y dopamina, todos ellos neurotransmisores utilizados por las estructuras promotoras de la vigilia (Saper y col., 2010). Esto sienta las bases de un circuito en el que las inhibiciones recíprocas permitirían la instauración de un estado en detrimento del otro e impedirían la generación de estados intermedios. No obstante, el hecho de que lesiones bilaterales de gran magnitud en el núcleo preóptico ventrolateral no provoquen la supresión completa del sueño sugiere la existencia de otros centros promotores de la fase NREM (Saper y col., 2010).

Además del núcleo preóptico ventrolateral, se ha hallado que la zona parafacial del bulbo raquídeo contiene neuronas GABAérgicas cuya activación mediante optogenética induce la aparición de fase NREM (Anaclet y col., 2014). Estas neuronas inhiben a las del núcleo parabraquial, impidiendo que exciten a las del prosencéfalo basal y desfavoreciendo, por tanto, el mantenimiento de la vigilia (Anaclet y col., 2014).

1.3.3 Estructuras encefálicas implicadas en la fase REM del sueño

En condiciones naturales, si la fase NREM no se ve interrumpida, ocasionalmente la sucede un episodio de fase REM. En estudios tempranos en el gato, Jouvet (1962) halló que la estimulación eléctrica de las partes medial y posterior del tegmento mesencefálico (núcleos *reticularis pontis oralis* y *reticularis pontis caudalis*) inducía artificialmente la aparición de estados comparables a la fase REM. De este modo, se propuso que esta zona podría constituir el centro promotor de la fase REM. La estimulación colinérgica de estos núcleos induce la aparición en la corteza cerebral y en el hipocampo de actividades electrofisiológicas similares a las que ocurren durante la fase REM natural (Garzón y col., 1997), induce atonía muscular (Takakusaki y col., 1993) y provoca la aparición de movimientos oculares rápidos asociados a ondas PGO, así

como la convergencia y depresión tónica de los ojos (Márquez-Ruiz y Escudero, 2009 y 2010).

La generación de la fase REM se ha atribuido a una región específica del puente, conocida como *peri-locus coeruleus alpha* o región subcerúlea en el gato y como núcleo sublateralodorsal en la rata (Saper y Fuller, 2017), que utiliza glutamato como neurotransmisor (Arrigoni y col., 2016). La instauración de la atonía muscular se atribuye a esta estructura (Luppi y col., 2006; Peever y Fuller, 2017) y su lesión provoca la ausencia de atonía durante la fase REM (Lu y col., 2006). Su activación mediante agonistas induce la aparición de estados similares a la fase REM, mientras que su inhibición reduce la abundancia de este estado (Boissard y col., 2002). Ante estos resultados, se ha propuesto que el núcleo sublateralodorsal y el núcleo tegmental laterodorsal caudal tienen un papel importante en la generación de la fase REM (Krenzer y col., 2011). El modelo de control de la fase REM más aceptado implica un sistema de inhibiciones recíprocas dependiente de GABA entre las estructuras promotoras e inhibitoras de este estado. De este modo, una vez que las estructuras promotoras de la vigilia se encuentran inhibidas durante la fase NREM, el balance excitación-inhibición entre las estructuras promotoras (núcleos tegmental laterodorsal, pedunculopontino y sublateralodorsal) e inhibitoras de la fase REM (tegmento lateral pontino y sustancia gris periacueductal ventral) determina la generación o no de fase REM (Lu y col., 2006).

Se ha demostrado que las neuronas que expresan hormona concentradora de melanina están relacionadas con el control de la fase REM. Su manipulación mediante optogenética ha mostrado que su activación favorece la transición de fase NREM a fase REM e incrementa el tiempo en fase REM, mientras que su silenciamiento no tiene efecto sobre el ciclo vigilia-sueño (Tsunematsu y col., 2014). Esto perfila a las células que expresan esta sustancia, que pertenecen al hipotálamo lateral, como un sistema adicional que modula la propensión hacia la fase REM. Asimismo, implica que el hipotálamo lateral, además de constituir un centro promotor de la vigilia (Saper y col., 2010), también posee poblaciones de neuronas promotoras del sueño.

Recientemente, Chen y colaboradores (2018) han mostrado la existencia de un sistema regulador de la fase REM en el hipotálamo dorsomedial que consiste en una población de neuronas promotoras de la fase REM, cuya activación causa su aparición y

suprime la fase NREM, y otra población de neuronas inhibitoras de la fase REM, con el efecto opuesto. Estas neuronas expresan GABA y galanina. Se cree que la población neuronal promotora de la fase REM podría emitir proyecciones inhibitoras hacia el núcleo del rafe *pallidus*, que utiliza serotonina e inhibe la aparición de fase REM (Chen y col., 2018). La coexistencia de estas dos poblaciones de neuronas con funciones opuestas en un área común sugiere que la predominancia de la actividad promotora de la fase REM o de la inhibidora podría depender de una inervación inhibidora recíproca entre ambas (Chen y col., 2018).

1.4 La privación de sueño

Los estudios de privación de sueño han demostrado que el sueño es un fenómeno fundamental para la vida y que su carencia tiene efectos deletéreos para el funcionamiento de múltiples sistemas fisiológicos. En la rata, la pérdida de sueño produce del deterioro del aspecto físico, una disminución del peso y de la temperatura corporal, un marcado aumento del gasto energético, la aparición de lesiones en la piel (Everson y col., 1989), la disfunción del sistema inmune (Zager y col., 2007), cambios en la potencia de determinadas actividades del EEG (Borbély y col., 1984) y un aumento progresivo de la presión de sueño (Vyazovskiy y Tobler, 2005).

La privación de sueño puede ser total, cuando se reduce la cantidad de fase NREM y de fase REM, o selectiva, si la reducción afecta principalmente a una de las dos fases. Las alteraciones que produce la privación son diferentes dependiendo de si afecta a la fase NREM o a la fase REM, lo que apoya que ambas fases tienen funciones distintas (Siegel, 2005; Vyazovskiy y Delogu, 2014). Mientras que una privación selectiva de la fase NREM del sueño es difícil sin una reducción paralela de la cantidad de fase REM (Amici y col., 2008), ya que la fase REM no ocurre en condiciones normales si no está precedida por fase NREM, una supresión específica de la fase REM con una escasa afectación de la fase NREM sí es posible. La duración y las características de la privación condicionan las propiedades de la respuesta post-privación (Rechtschaffen y col., 1999). Cuando se permite dormir a los individuos, se produce el fenómeno del rebote de sueño

y las alteraciones fisiológicas inducidas por la privación revierten progresivamente (Everson y col., 1989).

Los métodos de privación selectiva de fase REM se pueden agrupar en instrumentales y farmacológicos. Los primeros se basan en forzar el despertar mediante estimulación mecánica o eléctrica, o en establecer impedimentos físicos a la entrada en fase REM. Los segundos se basan en la administración de sustancias químicas que interfieren con los mecanismos centrales de generación de la fase REM.

1.4.1 Métodos instrumentales de privación de fase REM

Probablemente, el modo de privación instrumental de la fase REM más utilizado históricamente sea el método de la plataforma sobre agua (*flower pot technique*). Fue diseñada por Jouvett y colaboradores (1964) para su empleo en gatos y, posteriormente, Cohen y Dement (1965) la adaptaron para la experimentación con ratas. Surgió como alternativa a la estimulación manual de los animales para inducir el despertar cuando se detectaba el inicio de la fase REM, ya que este método requiere el seguimiento constante y a tiempo real del ciclo vigilia-sueño por parte del investigador. Mientras que la privación manual es un procedimiento arduo para el experimentador, el método de la plataforma produce una supresión de fase REM de eficacia similar con una carga de trabajo muy inferior (Morden y col., 1967).

La privación de fase REM por el método de la plataforma se fundamenta en el desarrollo de la atonía muscular que ocurre durante esta fase del sueño. El animal se coloca en un recipiente que contiene agua y una plataforma o pedestal que emerge – habitualmente, 1 cm– sobre el agua. Dado que subirse a la plataforma constituye el único modo de permanecer fuera del agua, el individuo tiende a mantenerse sobre ella. La presencia de tono muscular durante la vigilia y la fase NREM permite al animal mantenerse sobre la plataforma sin problemas. Sin embargo, la caída del tono muscular durante la entrada en fase REM provoca que el individuo entre en contacto con el agua y despierte. En consecuencia, este procedimiento produce una disminución de la cantidad de fase REM a lo largo del periodo de privación. Dada su sencillez y su

potencial para la realización de experimentos de larga duración, este método ha sido extensamente utilizado.

A pesar de que el método de la plataforma produce una privación de fase REM eficaz, se ha reportado que puede provocar una reducción en la cantidad de fase NREM (Graham y Ursin, 1985; Machado y col., 2004; Mendelson y col., 1974; Pujol y col., 1968), lo que indica una baja especificidad. La reducción en la cantidad de fase NREM constituye la principal fuente de crítica hacia el método de la plataforma, junto al estrés que frecuentemente se atribuye a este método (Suchecki y col., 1998) y a la inmovilidad forzada de los animales.

1.4.2 Métodos farmacológicos de privación de fase REM

Existen múltiples fármacos que interfieren con los mecanismos centrales responsables de la generación de la fase REM. Entre ellos destacan determinados grupos de antidepresivos, cuya influencia sobre el sueño se atribuye principalmente al incremento de la concentración de monoaminas en la hendidura sináptica (Wilson y Argyropoulos, 2005). Durante la fase REM, la neurotransmisión por serotonina y noradrenalina es mínima (McCarley, 2007). La activación de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe y las noradrenérgicas del *locus coeruleus* inhibe la generación de la fase REM (Lu y col., 2006). Dado que la aparición de fase REM depende del silenciamiento de las neuronas que utilizan estos neurotransmisores (Jones, 1991 y 2005), los antidepresivos inhibidores de la recaptación de monoaminas desfavorecen la ocurrencia de dicho estado.

El uso de antidepresivos como método de privación de fase REM comporta una serie de ventajas respecto a los métodos instrumentales, ya que no implica la restricción del movimiento, la interacción continua con el experimentador ni la locomoción forzada. Asimismo, permite realizar la privación de sueño en contenedores normales, eliminando la necesidad de habitáculos especialmente diseñados.

1.4.3 Efectos de la privación de sueño sobre la actividad cerebral y el EEG

La privación de sueño provoca cambios en la actividad cerebral que se traducen en la modificación de las oscilaciones del EEG. Múltiples estudios se han centrado en el estudio de los efectos de la privación total de sueño sobre la potencia de determinadas oscilaciones, tales como delta y theta, mientras que una menor proporción ha analizado los cambios asociados con la privación selectiva de fase REM.

De forma general, se ha comprobado que la privación total del sueño provoca un incremento de la potencia de la señal en las bandas delta (Borbély y col., 1984; Dijk y col., 1987; Franken y col., 1991) y theta (Borbély y col., 1984; Dijk y col., 1987; Vyazovskiy y Tobler, 2005). Se ha demostrado también que la potencia de theta aumenta progresivamente durante vigilias prolongadas en los humanos (Cajochen y col., 1995). La privación selectiva de fase REM, sin embargo, induce una reducción de la potencia en la banda delta en los humanos (Beersma y col., 1990) y en la rata (Benington y col., 1994b; Endo y col., 1997), por lo que se ha propuesto que existe una relación inversa entre la presión de fase REM y la intensidad de la fase NREM (Beersma y col., 1990). Se ha demostrado que la privación de fase REM también produce un incremento de la potencia de theta durante la vigilia (Corsi-Cabrera y col., 1994), lo que vincula este fenómeno con la carencia de fase REM además de con el aumento de la duración de la vigilia. En general, existe poca información sobre la influencia de la privación de sueño sobre las actividades gamma y HFO.

Trabajos recientes en la rata han puesto de manifiesto un efecto regulador del sueño sobre la tasa de disparo de las neuronas corticales (Vyazovskiy y col., 2009). Se ha observado que durante la vigilia ocurre un aumento progresivo de la frecuencia de descarga de las neuronas y que esta disminuye durante el sueño, persistiendo dicha reducción hasta el inicio de la vigilia siguiente. Dicha asociación entre el incremento de la tasa de disparo y la acumulación de presión de sueño también se ha observado durante las fases NREM y REM. Este incremento de la actividad neuronal se ha relacionado con un aumento de la excitabilidad de la corteza cerebral, cuya existencia se ha demostrado en la rata (Vyazovskiy y col., 2013) y en humanos (Huber y col., 2013). Durante la fase NREM, la caída de la tasa de disparo parece ocurrir en asociación con la aparición de husos del sueño y de complejos *sharp wave-ripple*, mientras que la

magnitud de la disminución durante la fase REM es proporcional a la intensidad de la actividad theta (Cirelli, 2017; Vyazovskiy y col., 2009). Por consiguiente, se ha postulado que este fenómeno homeostático comienza durante la fase NREM y está plenamente operativo durante la fase REM (Cirelli, 2017).

1.5 El sistema oculomotor como modelo

El sistema oculomotor ha sido ampliamente estudiado y es un modelo que implica un circuito neuronal bien caracterizado. Produce una salida motora cuya medida precisa es posible gracias a la técnica del seguidor magnético de la posición ocular (Fuchs y Robinson, 1966; Robinson, 1963) y cuyo análisis e interpretación son más sencillos que en el caso de la musculatura esquelética (Leigh y Zee, 1983). Tanto los músculos que intervienen en el movimiento de los globos oculares como las estructuras encefálicas implicadas en la generación de los comandos motores se conocen bien. Por estos motivos, el sistema oculomotor se perfila como un modelo idóneo para el análisis de los efectos de la privación sobre los sistemas motores.

1.5.1 El reflejo vestibulo-ocular

El reflejo vestibulo-ocular induce movimientos oculares compensatorios en sentido opuesto a la rotación de la cabeza, consiguiendo la estabilización de la imagen visual sobre la retina. Este reflejo se produce en respuesta a las entradas sensoriales procedentes de los canales semicirculares, que son sensibles a la aceleración angular. Su sustrato anatómico es un circuito neuronal relativamente simple, que comprende un arco de tres neuronas (Lorente de Nó, 1933; Szentágothai, 1950), y esta sencillez lo convierte en un modelo de estudio particularmente interesante. Adicionalmente, el hecho de que constituya un fenómeno reflejo simplifica su interpretación, ya que, en principio, no implica funciones complejas como la motivación o la memoria de los sujetos, que podrían afectar al rendimiento en tareas que requiriesen acciones voluntarias. Su anatomía y funcionamiento han sido estudiados en profundidad y caracterizados exhaustivamente, por lo que constituye un modelo ideal para el estudio de los efectos de la privación de sueño sobre los sistemas motores. Sin embargo, en la

actualidad existen pocos trabajos que hayan analizado la afectación del reflejo vestíbulo-ocular por la privación total de sueño, y esta escasez se convierte en ausencia en cuanto a la privación selectiva de fase REM. Por ello, su estudio podría contribuir de forma significativa a la comprensión de las implicaciones funcionales del sueño.

El reflejo vestíbulo-ocular comprende dos tipos de movimientos, también conocidos como “fases”. La fase lenta del reflejo es la encargada de la compensación del desplazamiento de la cabeza, mientras que las fases rápidas ocurren en sentido opuesto y reubican el globo ocular antes de que alcance el límite de rotación dentro de la órbita (Leigh y Zee, 1983). El grado de compensación del desplazamiento de la cabeza con el movimiento ocular recibe el nombre de “ganancia”, que expresa la relación entre la velocidad de rotación de la cabeza y la velocidad de rotación de los ojos en sentido opuesto (Leigh y Zee, 1983). Una ganancia del reflejo con valor de 1 implica que la velocidad de rotación de la cabeza y la de los ojos son equivalentes y que, por tanto, ocurre una compensación total del movimiento en la cabeza.

En el reflejo vestíbulo-ocular en el plano horizontal, la fase lenta se genera por la acción concertada de los músculos recto medial y recto lateral, que se insertan en el meridiano horizontal del ojo y actúan como un par de antagonistas (Spencer y Porter, 1988). Cuando la cabeza rota en un sentido, los ojos giran en el opuesto por la excitación de las motoneuronas que inervan a los rectos apropiados y la inhibición de las que inervan a sus antagonistas, por la acción de las neuronas de los núcleos vestibulares mediales (Highstein y McCrea, 1988). Durante la generación de las fases rápidas del reflejo, sin embargo, este patrón se invierte y se produce el giro del ojo en dirección opuesta. Esto se debe a la activación de dos grupos de neuronas: las neuronas de brote excitador y las neuronas de brote inhibidor homolaterales a la dirección de la fase rápida (Curthoys, 2002). Las neuronas de brote excitador activan a las motoneuronas del núcleo del motor ocular externo homolateral, mientras que las neuronas de brote inhibidor suprimen la actividad de las motoneuronas del núcleo del motor ocular externo contralateral (Curthoys, 2002). El resultado será la generación de un movimiento ocular en dirección opuesta al desplazamiento durante la fase lenta. Dos poblaciones de células juegan un papel crucial en el control de la actividad de las neuronas de brote: las *burst-driving neurons* y las neuronas de pausa. Las neuronas de

pausa son inhibitoras y disparan tónicamente durante la fase lenta del reflejo vestíbulo-ocular, silenciándose durante la ocurrencia de las fases rápidas y de los movimientos sacádicos (Keller, 1974; Strassman y col., 1987). Emiten proyecciones inhibitoras sobre las neuronas de brote homolaterales, inhibiéndolas tónicamente durante las fijaciones oculares y durante la fase lenta del reflejo vestíbulo-ocular (Curthoys, 2002). De este modo, su silenciamiento es preciso para la generación de fases rápidas de dirección opuesta a la fase lenta. Este silenciamiento depende indirectamente de las *burst-driving neurons* que se encuentran en el núcleo *prepositus hypoglossi*, que reciben proyecciones de los núcleos vestibulares contralaterales e inervan a las neuronas de brote (Curthoys, 2002). Una rotación sostenida de la cabeza provoca que las neuronas de los núcleos vestibulares exciten a las *burst-driving neurons* y estas, a su vez, a las neuronas de brote contralaterales, entre las que existe una subpoblación conocida como “neuronas de brote de larga latencia” (*long-lead burst neurons*) que inhibe a las neuronas de pausa (Curthoys, 2002). La excitación de las neuronas de brote y la inhibición simultánea de las neuronas de pausa desembocan en la generación de las fases rápidas.

Se sabe que la privación de sueño produce una reducción de la velocidad pico de los movimientos sacádicos (De Gennaro y col., 2000c; Fimm y Blankenheim, 2016; Russo y col., 2003; Zils y col., 2005). Sin embargo, el efecto de la privación sobre el reflejo vestíbulo-ocular se ha estudiado en menor medida. Los escasos trabajos en los que se han analizado los efectos de la privación sobre el reflejo se llevaron a cabo en humanos y consistieron en privaciones totales de sueño de entre 24 (Dowd y col., 1975; Wolfe y Brown, 1968) y 55 h de duración (Collins, 1988), cuyos resultados fueron contradictorios. Collins (1988) observó una disminución de la ganancia y de la velocidad de las fases rápidas del reflejo tras la privación de sueño. Por el contrario, Quarck y colaboradores (2006) reportaron que esta produjo un incremento de la ganancia cuando la aceleración angular fue brusca. Wolfe y Brown (1968) no observaron cambios en la ganancia.

1.5.2 Los movimientos oculares rápidos

Existe poca información acerca del impacto de la privación de sueño sobre los movimientos oculares rápidos de la fase REM. Esta carencia es aún más acusada en cuanto al efecto de la privación selectiva de fase REM sobre los movimientos oculares rápidos, a pesar de que estos están entre los fenómenos más llamativos que ocurren durante la fase REM.

En humanos, la restricción del número de horas de sueño se acompaña de una disminución del número de movimientos oculares rápidos por unidad de tiempo durante la fase REM (De Gennaro y col., 2000a; Feinberg y col., 1987 y 1988; Lucidi y col., 1996), así como de la cantidad de mioclonias (De Gennaro y col., 2000b). Esto condujo a que se planteara la hipótesis de que existe una relación inversa entre la densidad de movimientos oculares rápidos y la presión de sueño (Lucidi y col., 1996) o su profundidad (Feinberg y col., 1987 y 1988). Un estudio posterior demostró que la privación selectiva del sueño de onda lenta, que comprende las etapas 3 y 4 de la fase NREM, provoca también una reducción de la densidad de movimientos oculares (De Gennaro y col., 2000a).

En contraposición con los resultados obtenidos en humanos, se ha reportado que la privación total de sueño provoca una acentuación de los movimientos oculares rápidos en el gato durante la fase REM (Ferguson y Dement, 1967) y de las mioclonias (Ferguson y Dement, 1967 y 1968; Morden y col., 1967) en la rata y en el gato. Dado que las mioclonias comparten un origen común con los movimientos oculares rápidos (Escudero y Márquez-Ruiz, 2008), su acentuación entraría en conflicto con los resultados obtenidos en humanos. Sin embargo, no se han encontrado trabajos en los que se midiese la densidad de movimientos oculares rápidos en modelos animales, como tampoco se han hallado estudios en humanos o en animales sobre el efecto de la privación de sueño sobre las propiedades de dichos movimientos (amplitud, velocidad y duración).

Se hace patente que existe una carencia de información detallada acerca del efecto de la privación de sueño sobre las características de los movimientos oculares rápidos. Asimismo, los estudios existentes no permiten esclarecer qué efectos tiene la

privación selectiva de fase REM sobre los movimientos oculares rápidos. En la presente Tesis Doctoral se planteó el análisis de los efectos de la privación selectiva de fase REM sobre los movimientos oculares rápidos en la rata con objeto de intentar paliar esta laguna de conocimiento.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido identificar los efectos de la privación selectiva de la fase REM del sueño sobre la actividad electroencefalográfica y el funcionamiento del sistema oculomotor en la rata.

Los objetivos concretos han sido:

1. Desarrollar un método alternativo para la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño (vigilia, fase NREM y fase REM), de fácil y rápida aplicación e interpretación.
2. Determinar el impacto de la privación instrumental y farmacológica de la fase REM sobre el ciclo vigilia-sueño.
3. Identificar los efectos de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica.
4. Identificar los efectos de la privación de fase REM sobre la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular y sobre las características de sus fases rápidas.
5. Identificar los efectos de la privación de fase REM sobre las características de los movimientos oculares rápidos de la fase REM.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Instrumentación de los animales

En los experimentos de la presente Tesis Doctoral se utilizaron 32 ratas adultas de ambos sexos de la cepa Wistar y 21 ratas adultas de ambos sexos de la cepa Lister Hooded, obtenidas de la colonia del animalario de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla o de un proveedor autorizado (Laboratorios Envigo, Sant Feliu de Codines, España). Los experimentos se realizaron en conformidad con la normativa actual española para la protección de los animales utilizados en experimentación (RD 53/2013), la directiva de la Unión Europea (2010/63/EU) y los protocolos del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Para garantizar el bienestar de los animales y minimizar cualquier posible sufrimiento, se llevó a cabo un seguimiento en el que se controló su peso, su aspecto físico e indicios de dolor. Se administraron analgésicos, antiinflamatorios y antibióticos cuando fue preciso.

3.1.1 Anestesia, preoperatorio y consideraciones generales

Las ratas se sometieron a una cirugía de implantación de electrodos para el registro crónico de la actividad electroencefalográfica y de la actividad de la musculatura de la nuca. Además, algunos animales se sometieron a una cirugía adicional para la implantación de bobinas periorbitales para el registro de los movimientos oculares por el método del seguidor magnético de la posición ocular (Fuchs y Robinson, 1966; Robinson, 1963). Se estableció un periodo de recuperación no inferior a una semana entre ambas cirugías.

La anestesia consistió en una inducción inhalatoria inicial mediante isoflurano al 3% y en la posterior administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg).

Tras la anestesia, se afeitó la parte superior de la cabeza y del cuello de los animales. La zona se desinfectó con etanol de 70 ° y povidona yodada al 10% (Betadine, Meda, España). Los animales se fijaron a un marco estereotáxico (DKI-900, David Kopf Instruments, EEUU) y reposaron sobre una manta eléctrica para prevenir la hipotermia. La temperatura rectal se monitorizó de forma continua y se mantuvo en 38 °C. Para la

fijación de la cabeza, se introdujo el extremo de una barra óptica en ambos meatos auditivos del individuo y se apoyó su paladar sobre una pieza metálica, inmovilizando el hocico con ayuda de un arco metálico que ejerció presión sobre la pieza palatal. De este modo, el cráneo del animal quedó inmóvil y alineado con el plano horizontal. Siguiendo la línea media de la cabeza, se realizó un corte en la piel desde 5 mm anterior a Bregma hasta revelar la porción craneal del músculo *levator auris longus*, exponiéndose los huesos frontales, parietales y el interparietal. Se aplicó lidocaína al 5% como anestésico local y se limpió exhaustivamente la superficie del cráneo lateralmente hasta las crestas parieto-temporales para eliminar el periostio. Las zonas de tejido conjuntivo y muscular expuestas se humedecieron periódicamente con solución salina normal para evitar la desecación.

Para la cirugía de implantación de las bobinas periorbitales, una vez inmovilizado el individuo en el marco estereotáxico, se desinfectó el contorno de los ojos con povidona yodada. Se aplicó anestésico doble Colircusí (Alcon Cusí S.A., España) en el ojo unos minutos antes del inicio de la intervención. En caso de hemorragia, se aplicó atropina Colircusí 1% (Alcon Cusí S.A.) para inducir la vasoconstricción. Se irrigó la superficie del ojo con solución salina normal regularmente para evitar la desecación.

3.1.2 Implantación de los electrodos de electroencefalografía y referencia

Se implantaron dos electrodos de registro epidurales sobre la corteza somatosensorial a través de trépanos en los huesos parietales. Se implantó un electrodo de registro 2 mm posterior a Bregma y a 2,5 mm de la línea media sobre el hemisferio derecho y otro 5 mm posterior a Bregma y a 2 mm de la línea media sobre el izquierdo. Los electrodos de referencia se implantaron sobre el vermis del cerebelo a través de trépanos en el hueso interparietal. Se practicaron cuatro trépanos adicionales en las posiciones indicadas en la Figura 1 (círculos grises) para la implantación de tornillos de anclaje al cráneo.

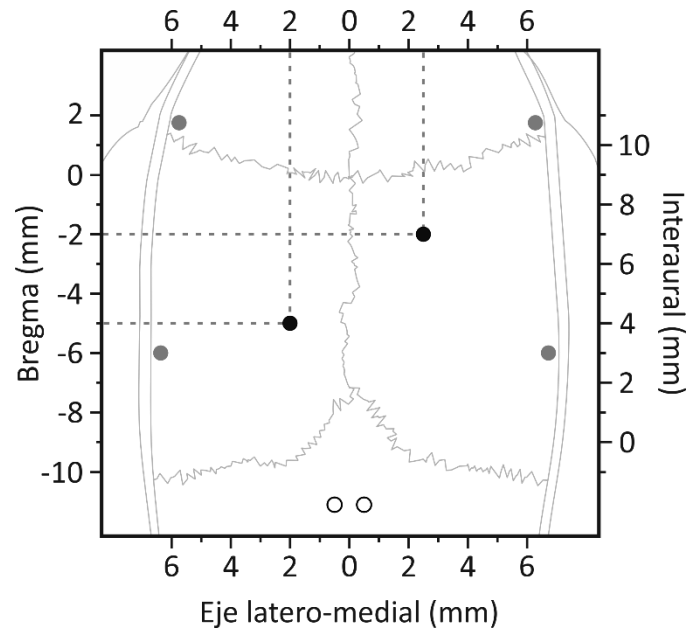


Figura 1. Localización de los electrodos de electroencefalografía (círculos negros), los electrodos de referencia (círculos blancos) y los tornillos de anclaje (círculos grises) sobre el cráneo de la ratona.

Los electrodos de electroencefalografía se fabricaron utilizando hilo de plata de pureza 99,99% y 381 μm de diámetro (A-M Systems, EEUU). Uno de sus extremos se fundió hasta producir una esfera de 1 mm de diámetro para incrementar la superficie de contacto con el tejido. A continuación, los electrodos se aislaron eléctricamente en toda su extensión, a excepción de los extremos, con un tubo de silicona (A-M Systems). El extremo esférico del electrodo se puso en contacto con la duramadre y el opuesto se soldó a un conector hembra preparado para la fijación de un cable durante las sesiones de registro.

3.1.3 Implantación de los electrodos de electromiografía

Se accedió a la musculatura del cuello a través del extremo posterior de la incisión practicada sobre el cráneo y se separó la piel del músculo hasta formar un bolsillo en la parte dorsal del cuello, bañándose a continuación la zona con lidocaína. Se implantaron parejas de electrodos intramusculares en uno o ambos músculos acromiotrapezios del cuello, procurando que los extremos insertados quedasen a una distancia aproximada de 2 mm entre sí. A continuación, los electrodos se fijaron al tejido conjuntivo mediante

un punto de sutura y los cables se curvaron hasta formar un bucle con el fin de aportar flexibilidad a la preparación, permitiendo al animal enroscarse y arquearse sin producir tirantez. Finalmente, el extremo libre de los electrodos se soldó a un conector hembra.

Los electrodos de electromiografía se fabricaron con acero trenzado de siete hilos, aislado con PFA, de 229 μm de diámetro (A-M Systems). Se eliminó el aislamiento de los dos últimos milímetros de cada extremo y uno de ellos se destrenzó, se aplanó y se curvó hasta dar a los hilos forma de anzuelo. El electrodo se hizo pasar por la cánula de una aguja hipodérmica de 500 μm de diámetro hasta que el anzuelo quedó a ras del extremo punzante, que se utilizó para penetrar en el tejido muscular hasta alcanzar el acromiotrapezio. De este modo, el electrodo quedó anclado en el interior del músculo y la aguja fue retirada y desechada.

3.1.4 Fijación de la preparación y fabricación de la torreta de registro

Como sistema de fijación al cráneo, se anclaron cuatro tornillos de acero inoxidable de 1,5 mm de ancho, 4,5 mm de largo y extremo romo (J.I. Morris Co., EEUU) al hueso frontal y a los parietales. Estos se introdujeron en el hueso a través de sendos trépanos adyacentes a la cara interna de las crestas parieto-temporales (Figura 1).

En todos los casos, los extremos libres de los electrodos se soldaron a conectores hembra para placas de circuito impreso (RS Components, España). Una vez implantados los tornillos de fijación al cráneo y los electrodos, y realizadas las soldaduras pertinentes, la preparación se fijó con resina acrílica (Reliance Dental Mfg. Co., EEUU). Se añadió resina hasta cubrir por completo las partes expuestas del cráneo y de los electrodos, los tornillos y la base del conector, dando lugar a la torreta de registro.

En las torretas de los animales a los que se implantaron bobinas periorbitales también se acoplaron dos tornillos de 12 mm de largo y 3 mm de diámetro para la sujeción de la cabeza al sistema de registro de la mesa de estimulación vestibular. Estos tornillos se colocaron perpendiculares al plano estereotáxico horizontal y se alinearon con la línea media del cráneo.

Tras la fabricación de la torreta, se ciñó la piel a sus márgenes mediante puntos de sutura practicados en el extremo posterior de la incisión y se aplicó un antibiótico de uso tópico (Terramicina, Pfizer, EEUU) para evitar la aparición de infecciones.

3.1.5 Implantación de las bobinas perioculares

Este procedimiento se realizó en una cirugía separada de la de implantación de electrodos. Se implantaron bobinas perioculares para la detección de la posición y el movimiento de los ojos mediante la técnica del seguidor magnético de la posición ocular (Fuchs y Robinson, 1966; Robinson, 1963). Dicha técnica consiste en el empleo de bobinas de inducción electromagnética que crean un campo magnético alrededor de la cabeza del animal. Este campo magnético induce, a su vez, una corriente eléctrica en las bobinas perioculares cuyo voltaje es proporcional a la posición de la bobina en el campo.

Las bobinas perioculares se fabricaron con segmentos de 12,5 cm de hilo de plata de 140 μm de diámetro recubierto de PFA (A-M Systems). Se fabricaron bobinas de 6,3 mm de diámetro con dos espiras de hilo, superpuestas y paralelas entre sí, y una tercera enroscada sobre las anteriores para compactarlas. Los dos cabos del hilo se enrollaron entre sí y se retiró el recubrimiento aislante de los últimos dos milímetros para su soldadura a un conector. Se comprobó la integridad del revestimiento en toda la extensión de la bobina.

A la esclerótica de cada ojo se fijó una bobina periorcular mediante cuatro puntos de sutura espaciados equidistantemente entre sí (Figura 2). Para ello, se cortó y se apartó el tejido conjuntivo superficial de la esclerótica con la ayuda de micro-tijeras (Moria Spring Scissors, Fine Science Tools Inc., EEUU). Los puntos de sutura se practicaron en la esclerótica con seda oftálmica virgen de métrica 7/0 (Laboratorio Aragón, España) y a ellos se fijaron las bobinas perioculares. El conjuntivo apartado se dispuso de forma que cicatrizase sobre las bobinas, contribuyendo a su sujeción al globo ocular. Los cabos de las bobinas se hicieron pasar subcutáneamente por un tracto hasta la torreta de registro, donde se soldaron a conectores hembra. Tras verificar la ausencia de continuidad eléctrica entre los conectores y el ojo –indicativa de roturas en el revestimiento aislante–, se fijó la preparación a la torreta de registro mediante resina

acrílica. Finalmente, se bañaron los ojos con colirio antibiótico para prevenir la aparición de infecciones (Gentamicina 3 mg/ml Colircusí, Alcon Cusí S.A.).

El voltaje de la señal generada en las bobinas perioculares es proporcional al grado de alineación de estas con el campo magnético, permitiendo estimar la posición del ojo con una precisión mayor de 0,1 °.

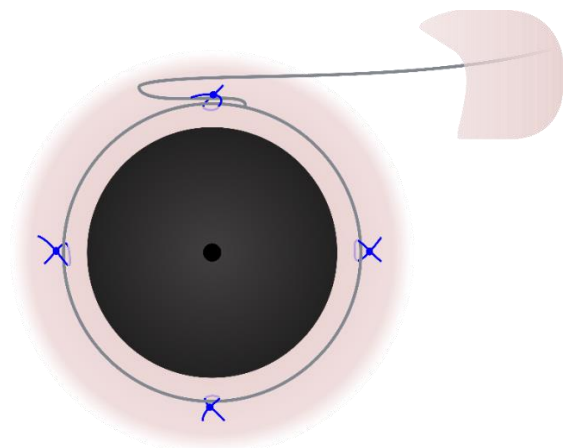


Figura 2. Disposición de la bobina periocular y de los puntos de sutura para su fijación en el ojo de la rata. Con ayuda del punto de sutura superior, se generó una curva en el hilo para mejorar su resistencia mecánica a los movimientos de torsión.

3.1.6 Postoperatorio y periodo de recuperación

Se estableció un periodo de recuperación no inferior a una semana entre la primera y la segunda cirugía. Dado que la correcta medida de la ganancia del reflejo vestibulo-ocular requiere una recuperación post-quirúrgica de al menos 10 días (Quinn y col., 1998), se fijó un periodo de recuperación de esta duración para la segunda cirugía.

La apariencia y el peso de los animales se monitorizaron durante estos periodos. Se administraron antibióticos, analgésicos y antiinflamatorios para garantizar su bienestar y una adecuada recuperación.

3.2 Inmovilización para el registro de los movimientos oculares

La inmovilización se llevó a cabo únicamente en los animales destinados al registro de los movimientos oculares.

El animal se introdujo en un cilindro de tela y el extremo se ciñó en torno a su cuello, de forma que el cuerpo y las extremidades quedaron contenidos en el interior. Tras comprobar que adquirió una postura natural y cómoda, se inmovilizó al animal envolviendo su cuerpo suavemente con vendas elásticas hasta que solo quedaron expuestas la cabeza y la cola. La presión ejercida por las vendas permitió pequeños ajustes posturales, imposibilitando los movimientos de mayor amplitud y la salida de las extremidades del cilindro de tela. Una vez finalizadas las sesiones de entrenamiento y de registro, se liberó al animal y se lo recompensó con un trozo de nuez.

Los animales se sometieron a un mínimo de cinco sesiones de entrenamiento para su habituación a la inmovilización prolongada antes de las cirugías de implantación de los electrodos y de las bobinas perioculares, con el fin de incrementar su tolerancia a la restricción del movimiento. Se inmovilizaron durante intervalos de tiempo crecientes, desde pocos minutos hasta alcanzar entre 1 y 2 h.

Para el registro de los movimientos oculares, la cabeza del animal inmovilizado se fijó, mediante el par de tornillos perpendiculares al plano estereotáxico horizontal agregados a la torreta, a una barra solidaria con la caja de metacrilato que sirvió de receptáculo durante las sesiones de registro (Figura 3). Se estableció una inclinación de la cabeza del animal de 43° con el hocico hacia abajo, disposición que se ha descrito como la idónea para estimular los canales semicirculares horizontales con una mínima activación de los verticales durante el movimiento horizontal de la cabeza (Blanks y Torigoe, 1989). Este procedimiento se siguió tanto para sesiones adicionales de entrenamiento como para las sesiones de registro.

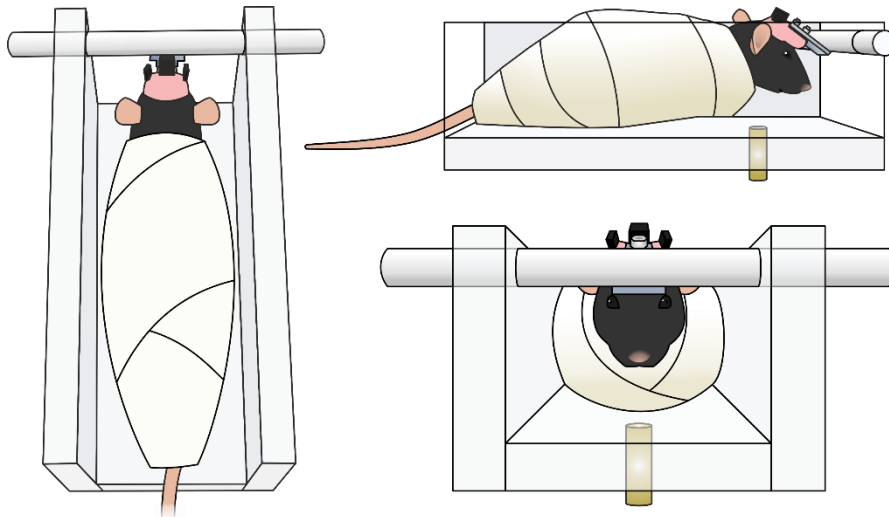


Figura 3. Rata inmovilizada y fijada a la caja de metacrilato. El eje de latón de la parte inferior de la caja permitió el acoplamiento y el giro respecto a la mesa de estimulación vestibular.

El grupo de animales destinados a privación de fase REM por el método de la plataforma sobre agua recibió un entrenamiento adicional tras la cirugía de implantación de electrodos de registro y antes de la cirugía de implantación de las bobinas periculares. Tras el periodo de recuperación de la primera cirugía, los animales se inmovilizaron durante periodos crecientes de tiempo hasta alcanzar las 4 o 5 h. Durante este tiempo, se registraron su EEG y su EMG para la determinación de los estados del ciclo vigilia-sueño. Cuando se detectó fase REM en una sesión, se consideró al animal preparado para la realización del experimento y se le implantaron las bobinas periculares.

3.3 Privación de la fase REM del sueño

3.3.1 Privación por el método de la plataforma sobre agua (*flower pot technique*)

Se utilizaron 8 ratas de la cepa Lister Hooded, instrumentadas para el registro del EEG, el EMG y la posición ocular, para la privación selectiva de fase REM durante un periodo de 4 días. Adicionalmente, otras 5 ratas, instrumentadas únicamente para el registro de su EEG, se sometieron a una privación de 6 días de duración.

La privación se llevó a cabo en un contenedor de 42 x 30 x 30 cm (largo x ancho x alto) lleno de agua. En el centro del contenedor se fijó una plataforma de 6,5 cm de diámetro que sobresalió 1 cm sobre el nivel del agua. La tapadera del contenedor consistió en una reja metálica a través de cuyos barrotes el animal tuvo acceso a comida y agua *ad libitum*. La temperatura de la habitación se elevó a 27 °C para prevenir la hipotermia. Diariamente, el contenedor se limpió y se rellenó con agua nueva.

Tras la privación se estableció un periodo de recuperación de 5 días de duración para estudiar la evolución del ciclo vigilia-sueño, las características del EEG, el reflejo vestibulo-ocular y los movimientos oculares de la fase REM.

3.3.2 Privación por administración de desipramina

3.3.2.1 Estudio de la eficacia de la desipramina como método de privación

Para la privación de fase REM por administración de clorhidrato de desipramina ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Co., EEUU) se utilizaron 12 ratas hembra de la cepa Wistar. Las ratas, instrumentadas para el registro del EEG y el EMG, se inyectaron intraperitonealmente con una única dosis de 15 mg/kg de desipramina disuelta en solución salina normal. La administración de desipramina se realizó tras un periodo inicial en el que se registraron de forma continua el EEG y el EMG de los animales con objeto de determinar las características de base de su ciclo vigilia-sueño. Una vez se administró el fármaco, se mantuvo el registro de EEG y EMG durante 5 días para el análisis del periodo de privación de la fase REM y de la dinámica del rebote post-privación.

3.3.2.2 Privación de 3 días por administración de desipramina

Se usaron 8 ratas de la cepa Lister Hooded de ambos sexos, instrumentadas para el registro del EEG, el EMG y la posición ocular, para el estudio de la privación selectiva de la fase REM durante 3 días. Para ello, se les administraron 6 inyecciones intraperitoneales de clorhidrato de desipramina (15 mg/kg) en solución salina normal. Las inyecciones se espaciaron 12 h entre sí a fin de mantener la concentración de

desipramina por encima del umbral de supresión de la fase REM. Se llevó a cabo el registro continuo del EEG y el EMG durante un periodo inicial, durante los 3 días de privación de la fase REM y durante un periodo de recuperación de 8 días. El registro solo se detuvo brevemente para llevar a cabo las inyecciones de desipramina y para las sesiones de registro del reflejo vestíbulo-ocular.

A 4 de los 8 animales anteriormente mencionados se los empleó para la realización de un experimento control previo al protocolo de privación. Se les administraron intraperitonealmente 6 dosis de solución salina normal a intervalos de 12 h y se realizó un registro continuo del EEG y el EMG de estos animales durante un periodo inicial, los 3 días de administración de solución salina y un día adicional. Asimismo, se realizó una comprobación de las características del reflejo vestíbulo-ocular antes y después del tratamiento con el vehículo.

3.4 Registro de variables electrofisiológicas y de los movimientos oculares

3.4.1 Registro crónico del ciclo vigilia-sueño

El registro continuo del ciclo vigilia-sueño se llevó a cabo en todos los animales. La duración del mismo varió en función del experimento.

El registro se llevó a cabo en una cámara de aislamiento insonorizada, con control de la temperatura y de la iluminación (Figura 4). Los animales se registraron en grupos de dos. Se alojaron en contenedores individuales de 38 x 26 x 24 cm (largo x ancho x alto) en los que dispusieron de agua y alimento *ad libitum*. Los contenedores se cubrieron con una rejilla metálica conectada a tierra, que redujo la contaminación electromagnética. Se estableció una temperatura constante de 24 °C y un ciclo luz-oscuridad de 12:12 h (luz de 8:00 a 20:00).

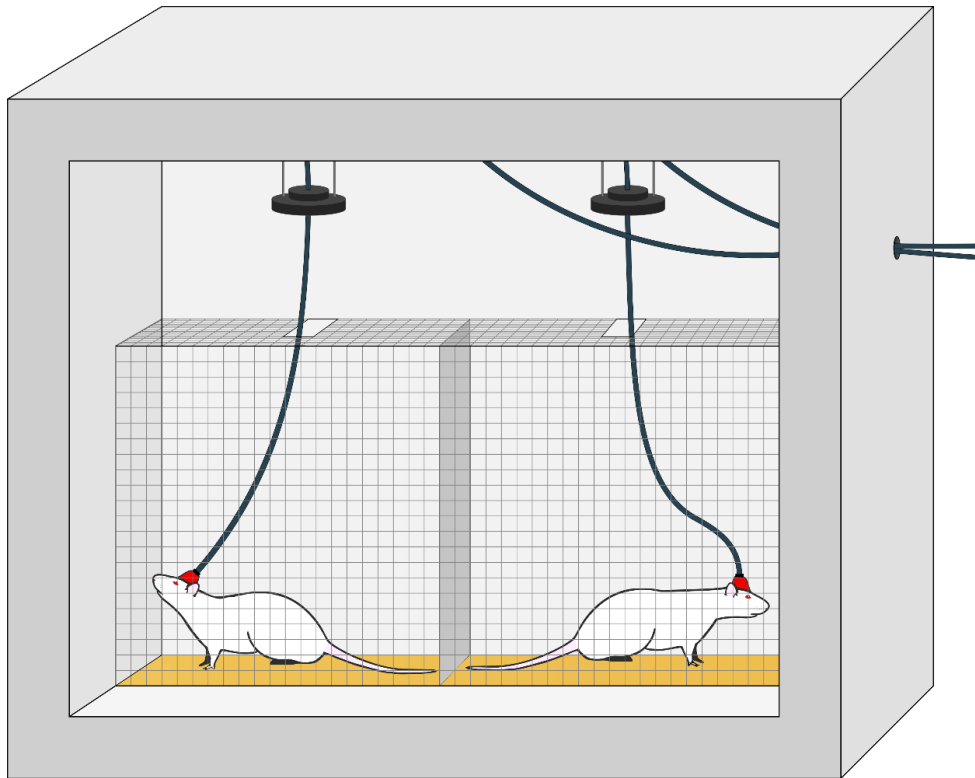


Figura 4. Pareja de ratas en condiciones de registro en la cámara de aislamiento. Los individuos se conectaron a sendos cables de registro unidos a conectores rotatorios para el registro del EEG y el EMG.

En la cámara de aislamiento, se fijó un cable de registro al conector de la torreta del animal por un extremo y a un conector rotatorio (MMC250, Moflon Technology, China) por el opuesto. La longitud del cable y la capacidad de giro del conector rotatorio permitieron a los animales desplazarse por el contenedor en todo momento. Antes de comenzar los experimentos, se estableció un periodo de al menos 3 días de duración para la adaptación de los animales a las condiciones de registro en la cámara. Tras el periodo de adaptación, se registró al menos un día de ciclo antes de la privación. Los protocolos de privación tuvieron lugar a continuación.

Las señales electrofisiológicas se condujeron a través del cable de registro y del conector rotatorio hasta un amplificador diferencial (Model 1700 Differential AC Amplifier, A-M Systems), que aplicó a la señal de EEG un filtro pasa-banda entre 0,1 Hz y 1 kHz. Esta se digitalizó (Power1401 mkII, Cambridge Electronic Design, RU) con una tasa de muestreo de 1 kHz. A la señal de EMG se le aplicó un filtro pasa-banda entre 10

Hz y 20 kHz y se digitalizó con una tasa de muestreo de 5 kHz. Los datos se adquirieron mediante el programa Spike2 (v.7.20, Cambridge Electronic Design) y se almacenaron en un ordenador para su posterior análisis.

Las señales de EEG se adquirieron utilizando la señal de los electrodos implantados sobre el vermis del cerebelo como referencia. Las señales de EMG se adquirieron como diferencial entre la señal de los dos electrodos implantados en el mismo músculo.

3.4.2 Registro del reflejo vestibulo-ocular en condiciones de inmovilidad

El registro del reflejo vestibulo-ocular se llevó a cabo en ratas de la cepa Lister Hooded instrumentadas para el seguimiento de la posición ocular. Los registros se llevaron a cabo en una habitación climatizada y en condiciones de oscuridad.

El animal inmovilizado se colocó en el interior de un generador de campos magnéticos (C-N-C Engineering, EEUU) montado sobre una mesa motorizada de estimulación vestibular, de modo que su cabeza quedó situada en el centro del campo magnético (Figura 5). El generador de campos magnéticos y la mesa motorizada se cubrieron con una tela negra que impidió el paso de la luz. Se fijó a la torreta del animal un cable de registro que condujo las señales de EEG y EMG al cabezal preamplificador de un amplificador extracelular (Model 3600 16-Channel Extracellular Amplifier, A-M Systems), donde se produjo el filtrado y el acondicionamiento de la señal. A las señales de EEG y EMG se les aplicaron filtros pasa-banda de 0,3 a 5 kHz y de 10 Hz a 20 kHz, respectivamente. Se fijaron dos cables adicionales para conducir la señal de posición de ambos ojos a sendos preamplificadores (Scleral Coil System, Model R2PHDT-PreRPL, C-N-C Engineering). Las señales de posición de los ojos en los planos horizontal y vertical se acondicionaron y amplificaron (Phase Sensitive Detectors, C-N-C Engineering).

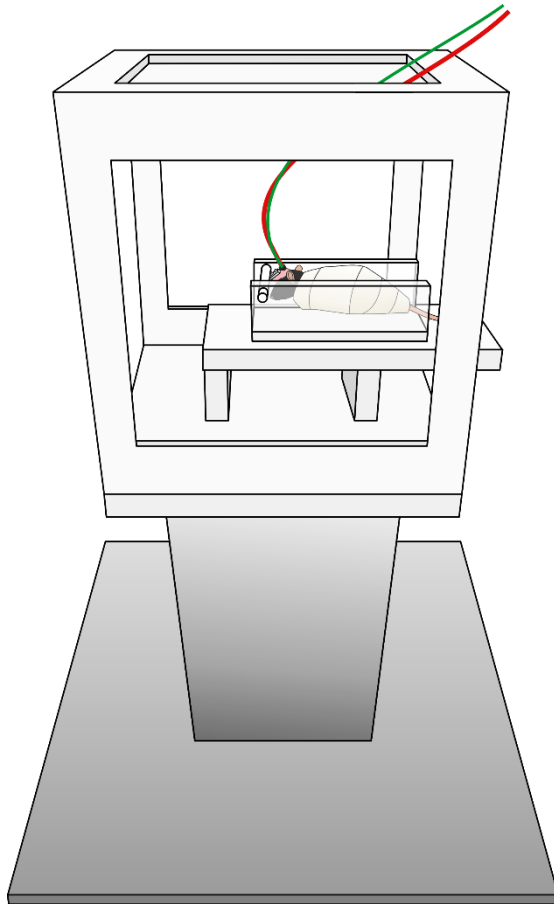


Figura 5. Disposición de la rata en el interior del generador de campos magnéticos. El generador de campos reposó sobre una mesa motorizada capaz de producir movimientos de rotación en el plano horizontal, con amplitud y frecuencia controladas.

La señal de EEG, la posición ocular, la posición de la mesa y su velocidad de giro se digitalizaron con una tasa de 1 kHz, mientras que la señal de EMG se digitalizó a 5 kHz (Micro1401-3, Cambridge Electronic Design). La adquisición se realizó mediante Spike2 (v.7.20, Cambridge Electronic Design). Los registros se almacenaron para su posterior análisis.

Al inicio de cada registro se realizó una calibración para obtener la equivalencia entre el voltaje de la señal de posición ocular y la amplitud de los movimientos oculares. En condiciones de oscuridad, se programó la mesa para que ejecutase un movimiento sinusoidal de $\pm 5^\circ$ de amplitud. El soporte de metacrilato se desacopló de la mesa, de forma que las bobinas de inducción del campo magnético giraron respecto a la cabeza del animal. Esto permitió calibrar el voltaje de la señal inducida en las bobinas periculares al giro de amplitud conocida de las bobinas de inducción.

Tras la grabación de la calibración, el soporte de metacrilato se ancló al generador de campos magnéticos para que ambos se moviesen de forma solidaria. La mesa se

programó para ejecutar movimientos sinusoidales de velocidad pico constante (60 °/s) a distintas frecuencias (0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 Hz). Se registraron como mínimo 30 ciclos para cada frecuencia de estimulación. El EEG y el EMG del animal se monitorizaron de forma continua durante el registro para determinar su estado de alerta. Se procuró mantener al individuo lo más activo posible para minimizar los cambios en las propiedades del reflejo vestibulo-ocular debidos a fluctuaciones en el nivel de alerta (Collins, 1962). Para ello, se estimuló sensorialmente al animal de forma periódica con suaves roces en la cola o en las vibrisas, presentación de olores o ligeras percusiones sobre el cuerpo vendado.

3.4.3 Registro de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM

Este procedimiento se llevó a cabo en las ratas de la cepa Lister Hooded destinadas a la privación de la fase REM por el método de la plataforma.

Una vez finalizado el registro del reflejo vestibulo-ocular, se detuvo el motor de la mesa y se mantuvo el registro del EEG, el EMG y la posición ocular. El registro tuvo lugar en silencio y en condiciones de iluminación tenue. Las ratas desarrollaron ciclos de vigilia-sueño espontáneamente y, tras una cantidad de tiempo variable, comenzaron a ocurrir episodios de fase REM. Se comprobó periódicamente el estado del registro y este se prolongó hasta que se grabaron al menos 3 episodios de fase REM. Dado que el animal no tuvo acceso a agua y alimento durante este periodo, para garantizar su bienestar, el tiempo de registro no excedió en ningún caso las 6 h.

3.5 Eutanasia

Finalizados los experimentos, se administró a los animales una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg) intraperitonealmente. Se confirmó el cese de las funciones vitales mediante la comprobación manual de la detención del latido cardíaco.

3.6 Análisis y tratamientos estadísticos

3.6.1 Análisis del ciclo vigilia-sueño

3.6.1.1 Identificación de los estados de alerta por el método convencional

La detección de los estados de alerta se llevó a cabo mediante el estudio combinado del EEG y el EMG de los animales con el programa Spike2, de acuerdo con las directrices proporcionadas por Benington y colaboradores (1994a) para el reconocimiento de las transiciones entre estados. Así, en el EEG se estudiaron las bandas delta (0,5 a 4 Hz), theta (6 a 10 Hz) y sigma (10 a 16 Hz). Adicionalmente, se estudió la oscilación de alta frecuencia o HFO (110 a 160 Hz) (Sánchez-López y col., 2018). En el EMG se analizaron la amplitud de la señal y la presencia o ausencia de tono muscular y de actividades fásicas. Se utilizaron también la representación de la señal de EEG como espectrograma mediante la transformada rápida de Fourier y el análisis de espectro de potencia. De este modo, se obtuvo información detallada sobre el espectro de potencia del EEG y sobre su evolución a lo largo del tiempo de registro.

Se determinaron como episodios de vigilia aquellos que presentaron un EMG con abundante actividad tónica y fásica y un EEG que reunió las siguientes características: una potencia baja en las bandas delta y sigma, una potencia alta en la banda theta, y la presencia de una actividad de alta frecuencia con potencia elevada que abarcó desde aproximadamente 50 Hz hasta 500 Hz, debida mayormente a la contaminación de la señal de EEG con señales procedentes de la musculatura (Muthukumaraswamy, 2013).

La fase NREM se identificó por un EMG con potencia disminuida respecto a la vigilia y con actividad mayormente tónica, así como por presentar un EEG con potencia elevada en las bandas delta y sigma y reducida en las bandas theta y HFO.

La fase REM se identificó por presentar un EMG que denotó una gran reducción del tono muscular o una atonía, unido a un EEG con potencia elevada en las bandas theta y HFO y mínima en las bandas delta y sigma.

Las transiciones a fase REM se reconocieron por la presencia simultánea de características propias de las fases NREM y REM del sueño: una potencia elevada en las bandas sigma, theta y HFO, unida a la progresiva disminución del tono muscular hasta

instaurarse la atonía de la musculatura esquelética (Sánchez-López y col., 2018). La extinción de sigma se tomó como el fin del periodo de transición dado que marcó la desaparición de todas las actividades propias de la fase NREM en el EEG, registrándose a continuación solo actividades electroencefalográficas propias de la fase REM.

El análisis del ciclo vigilia-sueño se llevó a cabo de forma manual. Se distinguieron cinco tipos de episodios: vigilia, fase NREM, transiciones a fase REM, fase REM y transiciones abortadas. Se consideraron abortadas las transiciones que no dieron lugar a un episodio de fase REM, sino que fueron sucedidas por vigilia o por fase NREM. Los momentos de inicio y fin de los episodios se registraron, permitiendo determinar el tiempo que el individuo pasó en cada estado por día de registro (que en adelante se referirá como “tiempo por día”), la duración de los episodios y el número de episodios por hora (que se referirá como “número de episodios”). Estos valores se obtuvieron para un intervalo inicial de 24 h (previo a la privación) y para intervalos consecutivos de 24 h que abarcaron los periodos de privación y de recuperación post-privación. Para determinar si estos parámetros se modificaron por la privación de fase REM, se compararon estadísticamente los valores tras la privación y tras el periodo de recuperación con los valores en la situación inicial, utilizando el programa estadístico SPSS (v.15; SPSS Inc., EEUU). Se confirmó la normalidad de las distribuciones de datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se emplearon pruebas T para muestras relacionadas. El nivel de significación se estableció en 0,05.

3.6.1.2 Identificación de los estados de alerta por el índice ponderado de HFO

En la presente Tesis Doctoral se desarrolló un índice cuyo estudio permitió la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño, que se denominó “índice ponderado de HFO”. El índice se calculó realizando el cociente entre la amplitud de la señal de EEG entre 110 y 200 Hz y la amplitud entre 110 y 300 Hz. Para ello, la señal de EEG procedente del hemisferio izquierdo se filtró entre 110 y 200 Hz y entre 110 y 300 Hz mediante filtros pasa-banda de respuesta finita al impulso. A las señales resultantes se les aplicó una media cuadrática con constante de tiempo de 0,25 ms. El índice resultante de calcular el cociente entre ambas señales se suavizó con una constante de tiempo de

1 s. Su interpretación permitió identificar los estados de alerta del individuo a lo largo del periodo de registro.

3.6.1.3 Evaluación de la concordancia mediante el coeficiente kappa de Cohen

Para la evaluación de la concordancia entre los polisomnogramas obtenidos por el índice ponderado de HFO y por el método convencional de análisis del ciclo vigilia-sueño, se calculó el coeficiente kappa de Cohen no ponderado (Cohen, 1960). Este coeficiente permite evaluar la concordancia entre dos observaciones, eliminando el efecto de las coincidencias debidas al azar.

El coeficiente kappa se calculó sustrayendo la proporción de coincidencias esperada por azar entre ambos métodos (p_c) a la proporción de coincidencias observada (p_o) y a la mayor proporción de coincidencias posible (1, que reflejaría un 100% de coincidencia), y hallando posteriormente la razón entre las coincidencias observadas y la máxima proporción de coincidencias posible no debidas al azar (Ecuación 1).

$$\text{kappa} = \frac{p_o - p_c}{1 - p_c}$$

Ecuación 1. Cálculo del coeficiente kappa de Cohen no ponderado. p_o , proporción de coincidencias observada; p_c , proporción de coincidencias esperada por azar.

Para calcular p_o y p_c , se dividieron los polisomnogramas obtenidos por ambos métodos de análisis en segmentos de 1 segundo de duración y se comprobó, segundo a segundo, si el estado del ciclo vigilia-sueño atribuido en ambos casos coincidió o no. A continuación, se generó una tabla de contingencia –conocida como “matriz de confusión” (Cohen, 1960)– en la que se recogió, en tanto por 1, la proporción de coincidencias (diagonal de la matriz) y de discrepancias (celdas restantes) entre ambos métodos en función del estado. La estructura de la matriz de confusión que se utilizó en el presente trabajo se representa en la Tabla 1.

		Método convencional			
		Estado	Vigilia	NREM	REM
Índice ponderado HFO	Vigilia				
	NREM				
	REM				
	p_{iC}				$\sum p_i$

Tabla 1. Ejemplo de “matriz de confusión” para el cálculo del coeficiente kappa de Cohen. p_{iHFO} , proporción en tanto por uno de segundos identificados como vigilia, fase NREM o fase REM mediante el índice ponderado de HFO; p_{iC} , proporción en tanto por uno de segundos identificados como vigilia, fase NREM o fase REM mediante el método convencional; $\sum p_i$, sumatorio de las filas y las columnas.

p_o fue igual a la proporción total de coincidencias observada, es decir, a la suma de los valores de las celdas de la diagonal de la matriz. p_c , la proporción de coincidencias esperada por azar, se obtuvo a partir de las frecuencias marginales resultantes de cada método de análisis (p_{iC} para las frecuencias marginales del método convencional; p_{iHFO} para las frecuencias marginales del índice ponderado de HFO) y del sumatorio de las filas y las columnas ($\sum p_i$) (Ecuación 2). De este modo, dadas las frecuencias marginales para cada estado, se obtuvo la probabilidad de que la asignación de un estado al azar por ambos métodos diese lugar a una coincidencia.

$$p_c = \frac{p_{iHFO \text{ Vigilia}} \cdot p_{iC \text{ Vigilia}} + p_{iHFO \text{ NREM}} \cdot p_{iC \text{ NREM}} + p_{iHFO \text{ REM}} \cdot p_{iC \text{ REM}}}{\sum p_i}$$

Ecuación 2. Cálculo de la proporción de coincidencias esperada por azar (p_c). p_{iHFO} , proporción en tanto por uno de segundos identificados como vigilia, fase NREM o fase REM por el índice ponderado de HFO; p_{iC} , proporción en tanto por uno de segundos identificados como vigilia, fase NREM o fase REM por el método convencional.

El valor del coeficiente kappa puede oscilar entre 1 y -1. Un valor de kappa igual a 0 indica que las coincidencias observadas entre los datos comparados se deben enteramente al azar, por lo que la concordancia entre los métodos de análisis sería nula. Un valor de 1 indica que la concordancia entre los métodos es perfecta, de forma que

los estados atribuidos por ambos métodos siempre coinciden. Valores negativos reflejan un acuerdo inferior al esperado por azar, de forma que existiría una tendencia activa a que los métodos de análisis atribuyesen estados discrepantes a los intervalos temporales analizados.

3.6.2 Análisis de los efectos de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica

3.6.2.1 Selección de intervalos temporales

Para cada animal, se seleccionaron 3 intervalos de 50 s por cada estado de alerta (vigilia, fase NREM y fase REM) en el periodo inicial previo a la privación y cada 12 h durante el periodo post-privación.

Con objeto de atenuar la variabilidad asociada a la heterogeneidad inherente a los estados y de evitar posibles sesgos, se establecieron de antemano criterios para la selección de los intervalos a utilizar para el análisis. Mediante Spike2, se buscaron episodios que cumpliesen con las condiciones que se detallan a continuación. La selección de intervalos se realizó cada 12 h, en un rango de ± 2 h.

Para el análisis de la vigilia se utilizaron episodios de vigilia tranquila (con actividad muscular moderada y EEG con theta de baja potencia y amplitud) por ser más homogénea y menos propensa que la vigilia activa a la aparición de artefactos debidos al movimiento de los cables de registro.

Para el análisis de la fase NREM, los intervalos se seleccionaron utilizando dos criterios: su proximidad a episodios de transición a fase REM y la presencia de una amplitud uniforme en las bandas delta y sigma. Esto garantizó la selección de intervalos de fase NREM consolidada. Se puso especial atención en no utilizar intervalos que contuviesen transiciones hacia vigilia o hacia fase REM.

El análisis de la fase REM se llevó a cabo utilizando intervalos que no incluyesen transiciones a vigilia o a fase NREM. Se seleccionaron únicamente intervalos de fase REM consolidada, sin incluir el periodo de transición.

La señal de EEG correspondiente a los intervalos seleccionados se exportó para su análisis en MATLAB (v. R2015a; The MathWorks, EEUU).

3.6.2.2 Análisis de la magnitud y la frecuencia del pico de potencia de la actividad theta

Los intervalos seleccionados se importaron en MATLAB y se empleó EEGLAB (v. 14.1.2; Swartz Center for Computational Neuroscience, EEUU) para obtener el espectro de potencia para cada conjunto de intervalos pertenecientes al mismo animal y momento de registro, con una resolución en frecuencia de 0,12 Hz. Se midió el valor del pico de potencia de la actividad theta y la frecuencia a la que ocurrió. Se comprobó la normalidad de las distribuciones de estos datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se compararon los valores de potencia y frecuencia del pico de potencia de theta en todos los momentos de muestreo respecto a la situación inicial mediante pruebas T para muestras relacionadas.

3.6.2.3 Análisis de la potencia del EEG

Para determinar si tras los protocolos de privación se produjeron cambios en el espectro de potencia del EEG respecto a la situación inicial, se realizaron comparaciones de medias para cada bin de frecuencia en el espectro completo de frecuencia.

Para cada método de privación, se crearon estudios de EEGLAB para la comparación de los espectros de potencia del EEG tras la privación respecto a la situación inicial. Se analizaron 3 intervalos de 50 s de duración por individuo y situación, utilizándose la condición experimental (situación inicial o momento del periodo de recuperación) como variable de agrupación. A continuación, se computaron los espectros potencia medios para la situación inicial y a lo largo del periodo de recuperación con una resolución en frecuencia de 0,24 Hz. Mediante las herramientas estadísticas implementadas en EEGLAB, se aplicó una prueba T para muestras relacionadas para la comparación de las potencias en todo el espectro de frecuencia del EEG. El nivel de significación se estableció en 0,01.

3.6.3 Análisis del reflejo vestíbulo-ocular

3.6.3.1 Análisis de la ganancia

Para la obtención de la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular, la señal de posición ocular se suavizó con una constante de tiempo de 0,01 s y se derivó con una constante de 0,003 s para obtener la velocidad instantánea del movimiento ocular. Se midieron manualmente los picos positivo y negativo de velocidad de la fase lenta del reflejo en 10 ciclos de estimulación vestibular pertenecientes a periodos de vigilia activa. Para obtener la ganancia, los valores absolutos de los picos máximos de velocidad del ojo en cada dirección se promediaron para cada ciclo y el valor resultante se dividió por la velocidad pico de giro de la mesa de estimulación vestibular (de 60 °/s). Finalmente, los valores de ganancia de todos los ciclos analizados se promediaron para obtener la ganancia media por individuo en cada frecuencia de estimulación vestibular.

Una vez comprobada la normalidad de las distribuciones de datos, la comparación estadística de los valores de ganancia se realizó mediante pruebas T para muestras relacionadas.

3.6.3.2 Análisis de las propiedades de las fases rápidas

El análisis de las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular se llevó a cabo en Spike2 sobre los mismos ciclos que se emplearon para el análisis de la ganancia. Se estudiaron la amplitud, velocidad pico y duración de las fases rápidas, así como el número de fases rápidas por ciclo de estimulación vestibular. La velocidad de rotación del ojo se obtuvo derivando la señal de posición con una constante de tiempo de 0,003 s. Los inicios y los finales de las fases rápidas se tomaron como los momentos en los que la velocidad de rotación del ojo fue de 0 °/s antes y después de cada movimiento. Para todas las variables mencionadas se realizaron comparaciones de medias de las situaciones post-privación y de recuperación respecto a la situación inicial mediante pruebas T para muestras relacionadas, previa verificación de la normalidad de las distribuciones de datos.

3.6.3.3 Análisis de la covarianza entre la amplitud y la velocidad pico de las fases rápidas

Dado que los movimientos oculares durante la vigilia muestran una estrecha correlación entre sus valores de amplitud y de velocidad pico, se estudió si la relación entre estas variables cambió en las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular tras el protocolo de privación de la fase REM. Se empleó la herramienta *aoctool* implementada en MATLAB, que permitió realizar un análisis de la covarianza (ANCOVA) para la comparación estadística de las pendientes de las relaciones velocidad-amplitud entre la situación inicial y las situaciones post-privación y de recuperación.

3.6.4 Análisis de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM

Se obtuvieron los valores de amplitud, velocidad pico, duración, densidad y latencia de aparición de los movimientos oculares rápidos. Para ello, la señal de posición del ojo se suavizó con una constante de tiempo de 0,01 s y se derivó con una constante de 0,003 s para obtener la velocidad de rotación del ojo. El inicio y el final de los movimientos oculares rápidos se detectaron de la misma forma que en el caso de las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular (ver apartado 3.6.3.2). Los valores de amplitud, duración, velocidad pico, densidad y latencia de aparición de los movimientos oculares rápidos de las situaciones post-privación y de recuperación se compararon con la situación inicial mediante pruebas T para medidas relacionadas o, en los casos en los que las distribuciones de datos no fueron normales, mediante pruebas U de Mann-Whitney.

Para el análisis de la covarianza de las pendientes de las rectas de ajuste de la relación amplitud-velocidad pico de los movimientos oculares rápidos, se realizó una prueba ANCOVA en MATLAB mediante la herramienta *aoctool* (ver apartado 3.6.3.3). Se comparó la situación inicial con las situaciones post-privación y de recuperación.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Diseño y validación de un método alternativo para la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño

Convencionalmente, la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño implica el estudio simultáneo de la actividad en diversas bandas de frecuencia del EEG y de la actividad del EMG. Este proceso es lento y laborioso, lo que supone un problema cuando es preciso analizar el ciclo vigilia-sueño durante periodos largos de registro. En esta situación, disponer de un método de análisis de fiabilidad comparable al análisis convencional y con una interpretación más sencilla y rápida podría suponer un ahorro considerable de tiempo y esfuerzo. Durante la presente Tesis Doctoral se desarrolló un método de análisis, que se denominó “índice ponderado de HFO”, que permitió identificar la vigilia y las fases NREM y REM del sueño en la rata en base exclusivamente a la actividad electroencefalográfica en el rango de frecuencias entre 110 y 300 Hz.

4.1.1 Determinación del índice ponderado de HFO para los diferentes estados

El índice ponderado de HFO se obtuvo calculando el cociente entre la amplitud de la señal de EEG en la banda de frecuencias de 110 a 200 Hz y su amplitud en la banda de 110 a 300 Hz. La cuantificación del índice a lo largo del tiempo de registro permitió distinguir los estados de vigilia, fase NREM y fase REM y reconstruir, por tanto, el ciclo vigilia-sueño en la rata. En la Figura 6 se muestra un ejemplo representativo de la evolución de distintas bandas del EEG, el EMG y el índice ponderado de HFO durante el ciclo vigilia-sueño.

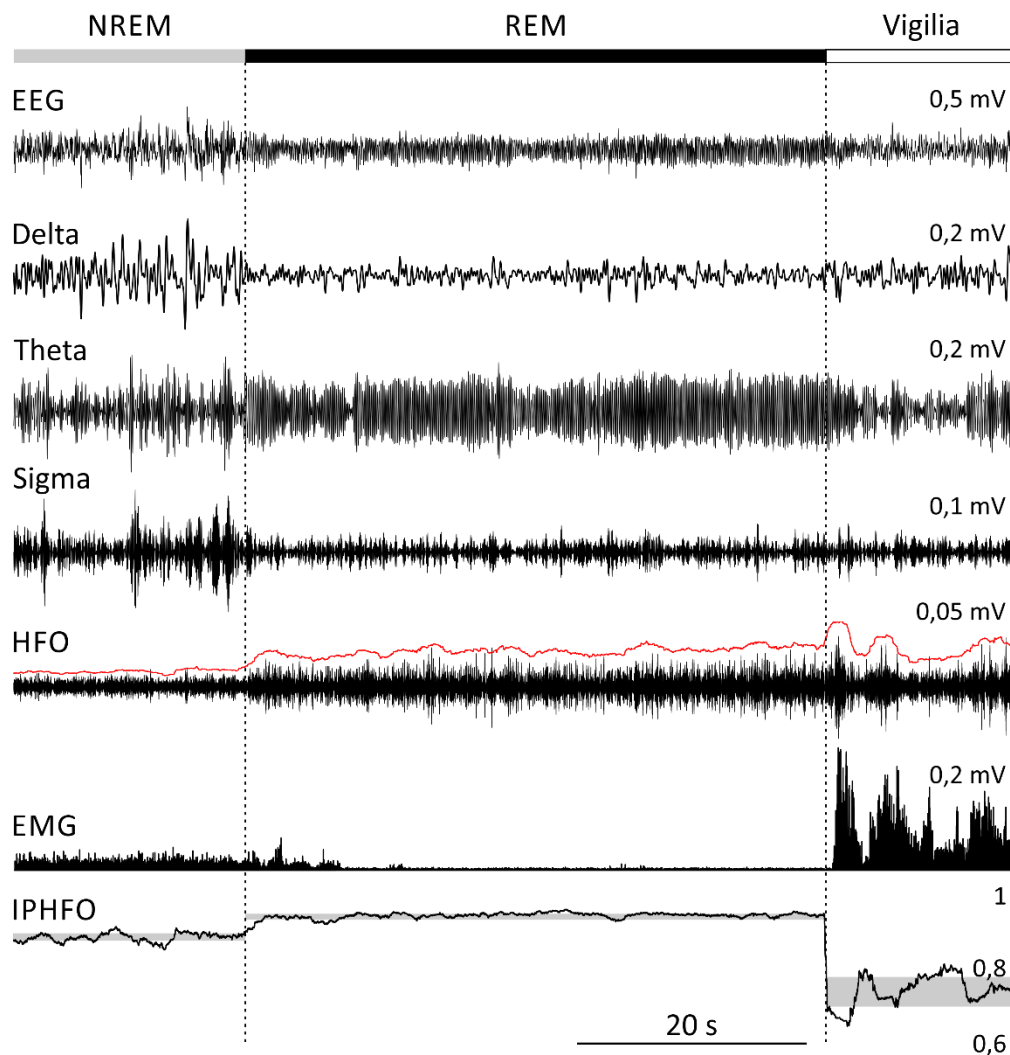


Figura 6. Intervalo temporal representativo del ciclo vigilia-sueño en la rata Wistar. De arriba abajo se muestran: los periodos de fase NREM, fase REM y vigilia; la señal bruta de EEG; las actividades delta (0,5-4 Hz), theta (6-9 Hz), sigma (10-16 Hz) y HFO (110-160 Hz) del EEG; el EMG rectificado, y el índice ponderado de HFO (IPHFO). Las líneas verticales discontinuas representan los límites de los estados. El trazo rojo sobre la HFO indica su envolvente. Las bandas grises sobre IPHFO se corresponden con las desviaciones típicas del índice por estado para el intervalo representado.

Para determinar el valor medio del índice ponderado de HFO para cada estado se utilizaron 5 intervalos de 60 s de vigilia, de fase NREM y de fase REM por cada animal (N=20 individuos). Los valores medios del índice y sus desviaciones típicas fueron de $0,77 \pm 0,03$ para la vigilia, de $0,89 \pm 0,02$ para la fase NREM y de $0,94 \pm 0,02$ para la fase REM (Figura 7). Una prueba T para muestras relacionadas mostró que los valores medios del índice en los tres estados fueron distintos ($P < 0,01$).

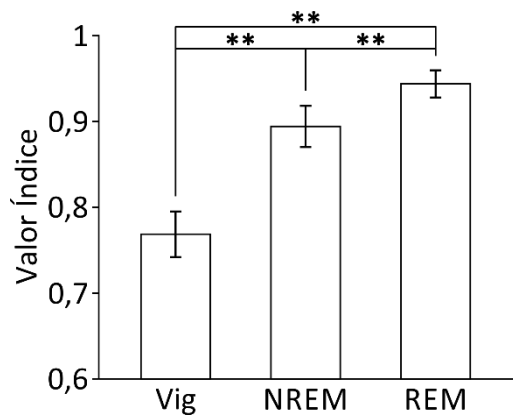


Figura 7. Valores medios del índice ponderado de HFO durante los estados de vigilia (Vig), fase NREM y fase REM. Las barras de error representan las desviaciones típicas. **, $P < 0,01$. $N = 20$ individuos.

4.1.2 Validación del índice ponderado de HFO

Con objeto de evaluar la similitud entre el método del índice ponderado de HFO y el método convencional de identificación de estados, se determinó el porcentaje de coincidencia (segundo a segundo) entre los polisomnogramas obtenidos por ambos métodos a partir de un registro de 3 h de cada individuo ($N = 10$ individuos). Se obtuvo que el valor medio de coincidencia entre ambos métodos fue del 90,23%, con valores que variaron entre un 87,63% y un 93,43% para todos los animales.

Este porcentaje de coincidencia entre ambos métodos de análisis constituye una medida pobre de la concordancia real, ya que no toma en consideración el posible efecto del azar en la identificación de los estados. Para calcular la concordancia entre ambos métodos, excluyendo el efecto de las coincidencias debidas al azar, se calculó el coeficiente kappa de Cohen no ponderado. Este coeficiente representa la razón entre la proporción de coincidencias observadas y la máxima proporción posible de coincidencias, una vez sustraída de ambos valores la proporción de coincidencias esperada por azar (ver apartado 3.6.1.3). Se utiliza frecuentemente para determinar la concordancia entre los polisomnogramas obtenidos por dos evaluadores distintos o mediante dos métodos de análisis diferentes. Para el cálculo del coeficiente se construyó una tabla de contingencia a partir de la proporción de coincidencias y de casos de error por estado entre ambos métodos (Tabla 2).

		Método convencional			
		Estado	Vigilia	NREM	REM
Índice ponderado HFO	Vigilia	0,232	0,041	0,001	0,274
	NREM	0,029	0,564	0,010	0,603
	REM	0,004	0,009	0,110	0,123
	p_{iC}	0,265	0,614	0,121	$\sum p_i=1$

Tabla 2. Matriz de confusión para el cálculo del coeficiente kappa de Cohen. p_{iHFO} , proporción total en tanto por uno de segundos identificados como vigilia, fase NREM o fase REM por el índice ponderado de HFO; p_{iC} , proporción total en tanto por uno de segundos identificados como vigilia, fase NREM o fase REM por el método convencional; $\sum p_i$, sumatorio de p_{iHFO} y p_{iC} . La diagonal de la tabla, destacada en gris, contiene la proporción del tiempo de registro en el que ambos métodos coincidieron en la asignación del estado de alerta. Las demás celdas representan los diferentes casos de discrepancia entre los métodos.

A partir de las frecuencias marginales (Tabla 2) se obtuvo la probabilidad de coincidencia esperada por azar entre ambos métodos de análisis. Para ello, se sumaron los productos de los sumatorios de filas y columnas para cada estado y el resultado se dividió por el sumatorio de las filas y las columnas. La proporción de coincidencias observadas se obtuvo sumando los valores de las celdas de la diagonal. Estos datos permitieron calcular kappa, cuyo valor global fue de 0,82. Mientras que los valores de kappa próximos a 0 indican una concordancia pobre o nula, un valor de 1 indica una concordancia perfecta. El valor obtenido experimentalmente, 0,82, se correspondió con una concordancia “casi perfecta” en la escala de evaluación propuesta por Landis y Koch (1977). Los valores de kappa para todos los animales variaron entre 0,75 y 0,89.

Dado que la variabilidad entre individuos de los valores del índice ponderado de HFO para cada estado fue escasa y que el valor del coeficiente kappa fue elevado, se puede concluir que este método de análisis constituye una buena alternativa para el estudio del ciclo vigilia-sueño.

4.2 Efectos de la privación de fase REM sobre el ciclo vigilia-sueño

La privación de fase REM del sueño constituye una herramienta potente para determinar la implicación de esta fase en el funcionamiento de diferentes sistemas y procesos fisiológicos. En el presente trabajo se analizaron los efectos de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica, el reflejo vestíbulo-ocular y los movimientos oculares rápidos de la fase REM. Para poder relacionar los cambios en estos sistemas con las características y la cinética temporal de la privación, se analizó en primer lugar la arquitectura del ciclo vigilia-sueño. La privación de fase REM se llevó a cabo mediante el método de la plataforma sobre agua y mediante la administración de clorhidrato de desipramina.

4.2.1 Efectos de la privación de 4 días por el método de la plataforma sobre agua

Para determinar el efecto de la privación de 4 días por el método de la plataforma sobre la arquitectura del ciclo vigilia-sueño, se estudió el polisomnograma de 7 ratas de la cepa Lister Hooded durante un periodo inicial (previo a la privación) y durante 4 días tras el final de la privación. Para cada animal se calculó el tiempo en cada estado por día de registro, la duración media de los episodios y el número de episodios por hora. Los valores post-privación de estas variables se compararon con la situación inicial mediante pruebas T para muestras relacionadas.

Tras la privación de fase REM se observó que el tiempo en fase REM se incrementó en un 159,22% ($2,47 \pm 0,44$ h) durante el día 1 de recuperación post-privación y en un 41,72% ($0,65 \pm 0,25$ h) durante el día 2, respecto al valor inicial (Figura 8.A). Dicho incremento dejó de ser significativo a partir del día 3 de recuperación. El tiempo en vigilia se redujo en un 31,01% ($-2,94 \pm 0,55$ h) durante el día 1 de recuperación post-privación (Figura 8.B), y esta disminución fue decayendo en los días sucesivos hasta dejar de ser significativa en el día 4. Por su parte, el tiempo en fase NREM por día no varió significativamente durante el periodo de registro (Figura 8.C). Durante el día 1 post-privación, el tiempo en transición a fase REM se incrementó en un 64,26% ($0,29 \pm 0,13$ h) (Figura 8.D), mientras que el tiempo en transición abortada aumentó en un 49,01%

($0,27 \pm 0,20$ h) (Figura 8.E). Todos los estados mostraron valores de tiempo por día similares a la situación inicial durante el día 4 de recuperación.

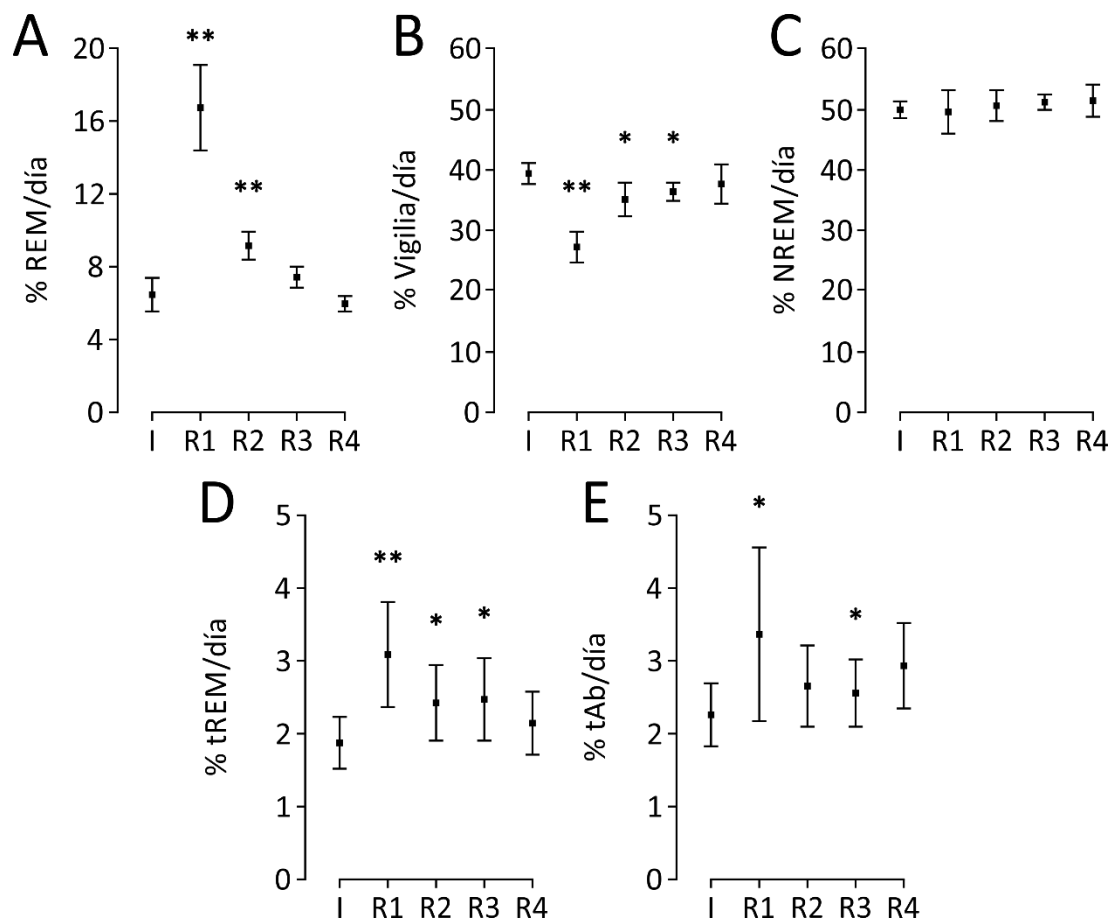


Figura 8. Efectos de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma sobre el tiempo por día en cada estado del ciclo vigilia-sueño. Se representan los porcentajes del día de registro en fase REM (A), vigilia (B), fase NREM (C), transiciones a fase REM (D; tREM) y transiciones abortadas (E; tAb). I, día inicial; R1 a R4, días de recuperación post-privación del 1 al 4. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, P<0,05; **, P<0,01 (prueba T para muestras relacionadas). N=7 individuos.

La duración media de los episodios de fase REM se incrementó en un 50,36% ($40,32 \pm 14,67$ s) durante el día 1 de recuperación post-privación y dejó de mostrar diferencias significativas con el valor inicial en el día 2 (Figura 9.A). Las duraciones de las transiciones a fase REM (Figura 9.B) y de las transiciones abortadas (Figura 9.C), sin embargo, no cambiaron sustancialmente durante el periodo de registro.

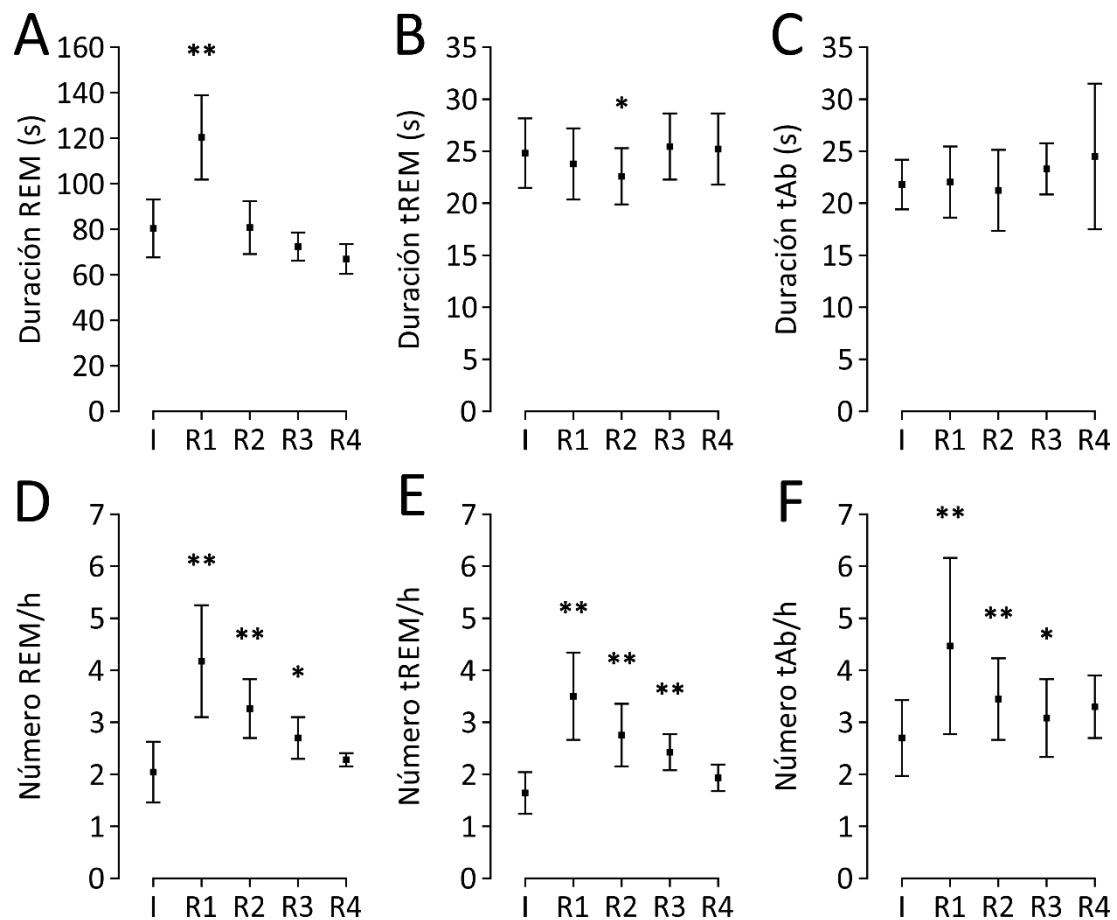


Figura 9. Efectos de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma sobre la duración y el número de episodios por día de registro. Se muestran, respectivamente, las duraciones medias y el número de episodios de fase REM (A y D), transiciones a fase REM (B y E; tREM) y transiciones abortadas (C y F; tAb). I, día inicial; R1 a R4, días de recuperación post-privación del 1 al 4. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, P<0,05; **, P<0,01 (prueba T para muestras relacionadas). N=7 individuos.

Durante el día 1 de recuperación post-privación ocurrió un incremento en el número de episodios de fase REM (69,73%, $2,13 \pm 0,87$ episodios/h) (Figura 9.D), el número de transiciones a fase REM (71,04%, $1,87 \pm 0,81$ episodios/h) (Figura 9.E) y el número de transiciones abortadas (47,59%, $1,76 \pm 1,06$ episodios/h) (Figura 9.F). En los tres casos, estos incrementos decayeron progresivamente durante los días sucesivos hasta dejar de ser significativos en el día 4 post-privación.

De este modo, los incrementos en la duración y el número de episodios de fase REM durante el día 1 de recuperación post-privación explicaron el aumento del tiempo en fase REM que se observó. El incremento del tiempo en transiciones, abortadas o no, se debió exclusivamente al aumento del número de episodios, que fueron de duración similar al valor inicial. Dado que no se produjeron reducciones del tiempo en fase NREM, los incrementos en la cantidad de fase REM y de transiciones ocurrieron en detrimento del tiempo en vigilia, que descendió.

4.2.2 Efectos de la privación de 6 días por el método de la plataforma sobre agua

La privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma indujo cambios en la actividad electroencefalográfica de las ratas. Para determinar si la magnitud de este cambio fue dependiente de la duración de la privación, se realizó una privación de 6 días por el método de la plataforma en 5 ratas de la cepa Lister Hooded. Al igual que en el caso de la privación de 4 días, se calculó el tiempo en cada estado de alerta por día, la duración media de los episodios y su número por hora. Los valores post-privación de estas variables se compararon con los valores iniciales mediante pruebas T para muestras relacionadas.

El tiempo en fase REM aumentó un 274,11% ($3,05 \pm 0,29$ h) respecto al valor inicial durante el día 1 post-privación (Figura 10.A). Este incremento decayó progresivamente hasta dejar de ser significativo en el día 4 (Figura 10.A). El tiempo en vigilia experimentó una reducción, que fue máxima (40,47%, $-3,98 \pm 0,76$ h) en el día 1 post-privación y continuó siendo significativa hasta el día 4 (Figura 10.B). El tiempo en fase NREM aumentó tras la privación y dicho incremento fue significativo hasta el final del periodo de registro, con un máximo del 12,06% ($1,41 \pm 0,26$ h) en el día 3 de recuperación post-privación (Figura 10.C). El tiempo en los estados de transición también experimentó un incremento durante el día 1 tras la privación, que fue del 152,77% ($0,76 \pm 0,17$ h) en el caso de las transiciones a fase REM (Figura 10.D) y del 91,48% ($0,83 \pm 0,42$ h) en el caso de las transiciones abortadas (Figura 10.E).

El incremento del tiempo en fase REM tras la privación de 6 días fue un 72,48% superior al que indujo la privación de 4 días (prueba T para muestras independientes,

$P < 0,01$). Del mismo modo, el incremento del tiempo medio en transiciones a fase REM fue un 149,07% mayor tras 6 días de privación que tras 4 días ($P < 0,01$). Las diferencias entre el incremento del tiempo en transiciones abortadas por día tras 4 y 6 días de privación no fueron significativas ($P > 0,05$).

De este modo, el incremento de la duración de la privación exacerbó los cambios en los tiempos por día en fase REM, transiciones a fase REM y transiciones abortadas, pero no afectó al momento de la remisión de estos cambios, que se produjo en el día 4 post-privación, tanto en el caso de la privación de 4 días como de 6 días.

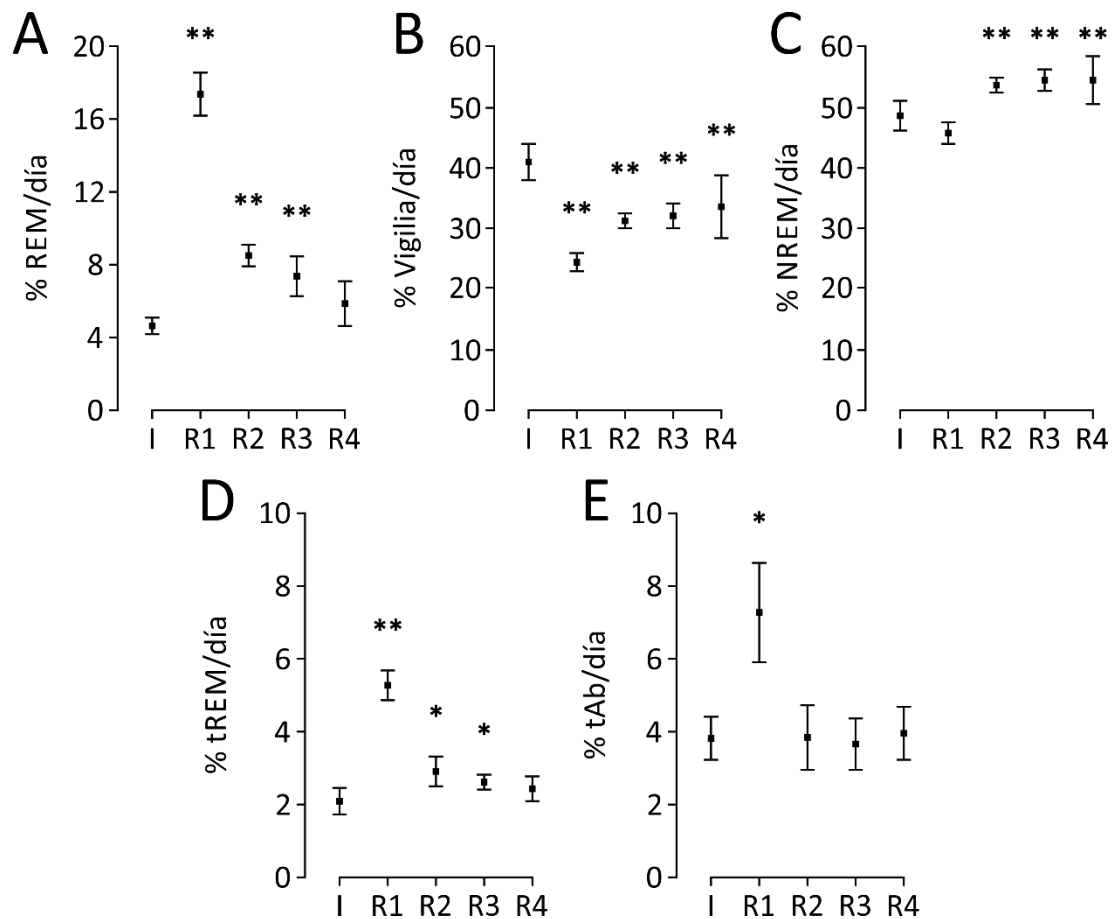


Figura 10. Efectos de la privación de fase REM de 6 días por el método de la plataforma sobre el tiempo por día en cada estado del ciclo vigilia-sueño. Se representan los porcentajes del día de registro en fase REM (A), vigilia (B), fase NREM (C), transiciones a fase REM (D; tREM) y transiciones abortadas (E; tAb). I, día inicial; R1 a R4, días de recuperación post-privación del 1 al 4. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N = 5$ individuos.

En cuanto a las duraciones medias, durante el día 1 de recuperación post-privación ocurrió un aumento de la duración de los episodios de fase REM (37,40%, $25,40 \pm 14,95$ s) (Figura 11.A), que dejó de ser significativo durante el día 2 post-privación. Las duraciones de las transiciones a fase REM (Figura 11.B) y de las transiciones abortadas (Figura 11.C) no variaron sustancialmente.

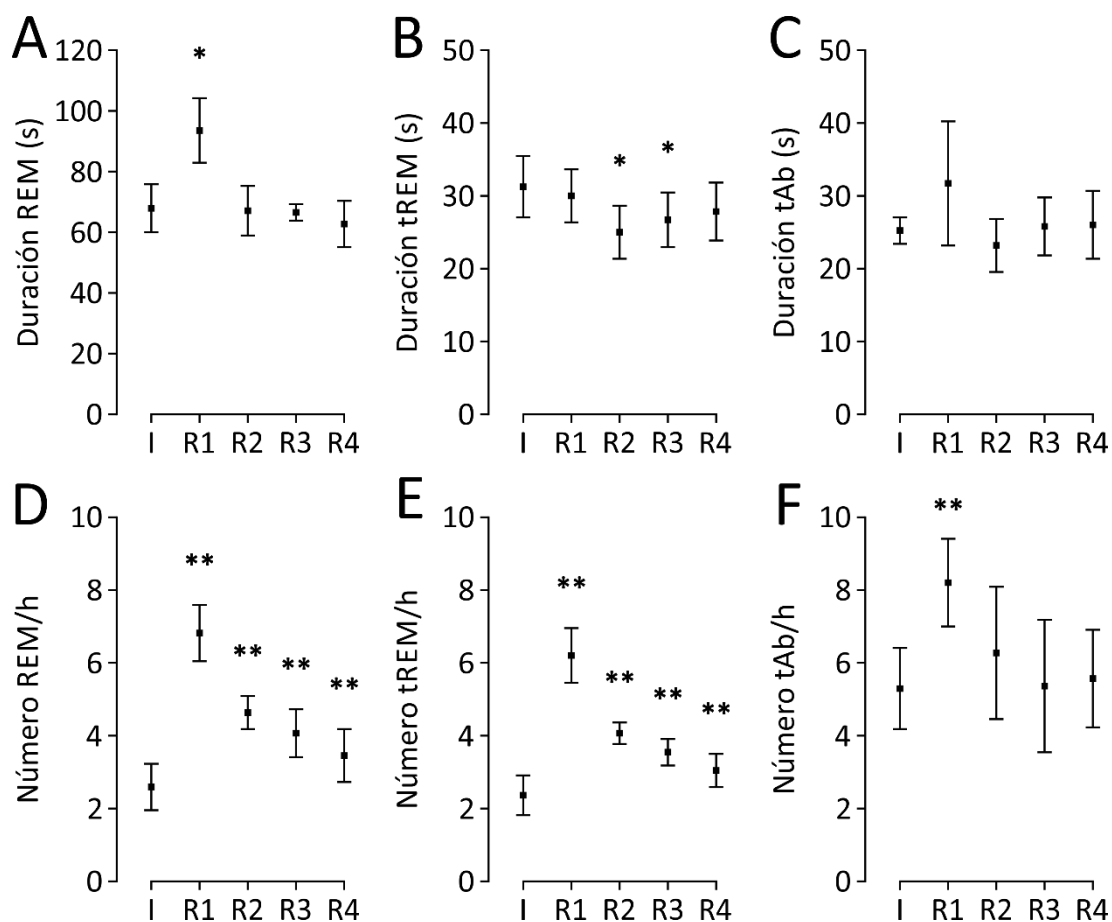


Figura 11. Efectos de la privación de fase REM de 6 días por el método de la plataforma sobre la duración y el número de episodios por día de registro. Se muestran, respectivamente, las duraciones medias y el número de episodios de fase REM (A y D), transiciones a fase REM (B y E; tREM) y transiciones abortadas (C y F; tAb). I, día inicial; R1 a R4, días de recuperación post-privación del 1 al 4. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, P<0,05; **, P<0,01 (prueba T para muestras relacionadas). N=5 individuos.

Durante el día 1 de recuperación ocurrió un incremento del número de episodios de fase REM (163,10%, $4,23 \pm 0,99$ episodios/h) (Figura 11.D), del número de

transiciones a fase REM (164,84%, $3,86 \pm 1,01$ episodios/h) (Figura 11.E) y del de transiciones abortadas (55,00%, $2,91 \pm 0,40$ episodios/h) (Figura 11.F). El aumento del número de episodios de fase REM (Figura 11.D) y de transiciones a fase REM (Figura 11.E) decayó progresivamente a lo largo del periodo de recuperación post-privación. Por el contrario, el incremento del número de transiciones abortadas solo fue significativo durante el día 1 post-privación (Figura 11.F).

De este modo, la privación de fase REM de 6 días por el método de la plataforma provocó incrementos en tiempo en fase NREM, en fase REM y en los estados de transición, que ocurrieron a expensas del tiempo en vigilia. De forma similar a lo que se observó tras la privación de 4 días, el incremento del tiempo en fase REM durante el día 1 post-privación se debió al aumento simultáneo de la duración y del número de episodios, mientras que el incremento del tiempo en las transiciones se debió a que estas fueron más numerosas.

4.2.3 Efectos de la administración de una única dosis de desipramina sobre la fase REM

Con objeto de utilizar la desipramina como método alternativo de privación de fase REM, se evaluó el efecto de una única dosis de 15 mg/kg de clorhidrato de desipramina en solución salina sobre el ciclo vigilia-sueño (N=12 individuos de la cepa Wistar). Se estudiaron los cambios en el tiempo por día en fase REM, en transiciones a fase REM y en transiciones abortadas, así como los cambios en la duración media y en el número de episodios. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante pruebas T para muestras relacionadas.

La administración de desipramina indujo la supresión completa de la aparición de fase REM durante un periodo de $20,69 \pm 2,66$ h a partir del momento de la inyección (N=12 individuos). Durante este periodo, 10 ratas mostraron una ausencia total de fase REM, mientras que las otras 2 presentaron un único episodio aislado.

Durante el día del tratamiento, el tiempo en fase REM se redujo un 83,53% ($-1,41 \pm 0,28$ h) respecto a la situación inicial (Figura 12.A). Esta reducción remitió en el día 1 post-tratamiento, de forma que la cantidad de fase REM volvió a ser similar a la inicial

(Figura 12.A). En el día 2 post-tratamiento se produjo un incremento del tiempo en fase REM del 31,37% ($0,53 \pm 0,45$ h), que dejó de ser significativo en el día 3 (Figura 12.A).

El tiempo en transiciones a fase REM disminuyó un 90,23% ($-0,24 \pm 0,08$ h) (Figura 12.B) durante el día del tratamiento con desipramina. Dicha reducción remitió parcialmente durante el día 1 de recuperación post-tratamiento, aunque el tiempo en transiciones a fase REM continuó siendo inferior (25,84%, $-0,07 \pm 0,07$ h) al valor inicial (Figura 12.B). Durante el día 2 se produjo un incremento del tiempo en transiciones a fase REM del 47,10% ($0,13 \pm 0,12$ h), que dejó de ser significativo en el día 3 (Figura 12.B). Las transiciones abortadas no desaparecieron durante el periodo en el que la fase REM fue suprimida por la inyección de desipramina. Durante el día del tratamiento, el tiempo en transiciones abortadas se redujo un 67,80% ($-0,29 \pm 0,19$ h) (Figura 12.C). Esta disminución remitió en el día 1 post-tratamiento y dio paso a un incremento del 54,16% ($0,23 \pm 0,13$ h) en el día 2, que dejó de ser significativo en el día 4.

La duración media de los episodios de fase REM aumentó un 148,12% ($118,27 \pm 74,31$ s) durante el día 1 de recuperación y se mantuvo un 30,78% ($24,57 \pm 24,55$ s) por encima del valor inicial durante el día 2 (Figura 12.D). Este incremento dejó de ser significativo a partir del día 3 (Figura 12.D). Las duraciones medias de las transiciones, abortadas o no, no variaron significativamente durante el periodo de registro (Figura 12, E y F).

Durante el día del tratamiento ocurrió una reducción del número de episodios de fase REM (93,23%, $-3,08 \pm 0,75$ episodios/h) (Figura 12.G), del número de transiciones a fase REM (92,63%, $-2,33 \pm 0,44$ episodios/h) (Figura 12.H) y del número de transiciones abortadas (69,14%, $-3,88 \pm 2,72$ episodios/h) (Figura 12.I). Estas reducciones provocaron que el número de muestras para el cálculo de la duración media de los episodios fuese bajo, lo que se refleja en las mayores desviaciones típicas en los valores correspondientes (Figura 12, D-F). En los tres casos, las reducciones remitieron parcial o totalmente en el día 1 de recuperación y dieron paso a un incremento del número de episodios en el día 2. El incremento del número de episodios fue del 38,99% ($1,29 \pm 1,23$ episodios/h) en el caso de la fase REM (Figura 12.G), del 43,94% ($1,11 \pm 0,81$ episodios/h) en el caso de las transiciones a fase REM (Figura 12.H) y del 52,20% ($2,93 \pm 1,66$ episodios/h) en el caso de las transiciones abortadas (Figura 12.I).

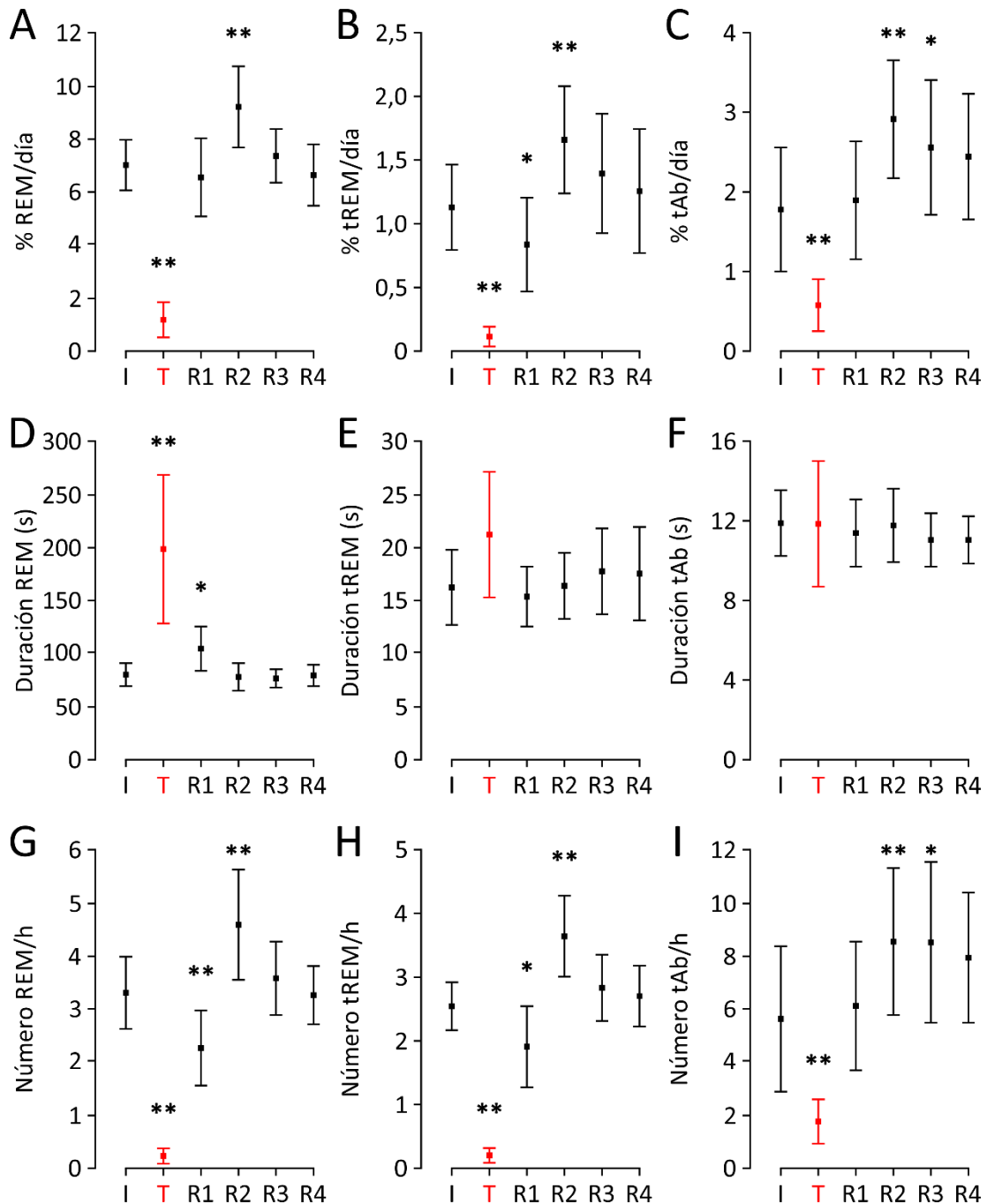


Figura 12. Efectos de la privación de fase REM por la administración de una única dosis de desipramina sobre la fase REM (A, D y G), las transiciones a fase REM (B, E y H; tREM) y las transiciones abortadas (C, F e I; tAb). Se representan los porcentajes del día en cada estado (A-C), la duración media de los episodios (D-F) y el número de episodios por hora (G-I). I, día inicial; T, día del tratamiento con desipramina; R1 a R4, días de recuperación post-tratamiento del 1 al 4. Se destacan en color rojo los valores correspondientes al día del tratamiento con desipramina. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). N=12 individuos.

El número de episodios de fase REM y de transiciones a fase REM dejó de mostrar diferencias significativas con la situación inicial en el día 3 de recuperación post-tratamiento (Figura 12, G y H), mientras que el número de transiciones abortadas lo hizo en el día 4 (Figura 12.I).

De este modo, la administración de una única dosis de 15 mg/kg de clorhidrato de desipramina provocó una reducción del tiempo en fase REM y en los estados de transición, que dejó de ser significativa en el día 1 post-tratamiento y se sucedió de un incremento en el día 2. Este incremento ocurrió de forma tardía respecto al observado tras la privación por el método de la plataforma, que tuvo lugar inmediatamente después de la privación. El incremento del tiempo en fase REM se debió exclusivamente al aumento del número de episodios, cuya duración media fue similar al valor inicial. Por consiguiente, el incremento de la duración de los episodios no coincidió en el tiempo con el aumento de la cantidad de fase REM. La diferencia de comportamiento entre la duración y el número de episodios de fase REM sugiere que estas variables podrían estar reguladas homeostáticamente de forma distinta. La administración de una dosis de solución salina normal como control no provocó cambios significativos en el ciclo vigilia-sueño (N=4), lo que indica que los cambios observados se debieron exclusivamente a la actividad del fármaco, y no a la manipulación de los animales.

4.2.4 Efectos de la privación de 3 días por administración de desipramina

Con objeto de producir una privación de fase REM más duradera, se administraron 6 dosis de clorhidrato de desipramina (15 mg/kg) a intervalos de 12 h a lo largo de 3 días (N=7 ratas de la cepa Lister Hooded). Se estudió el ciclo vigilia-sueño durante un periodo inicial previo al tratamiento, el periodo de tratamiento y un periodo de recuperación post-tratamiento de 8 días. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante pruebas T para muestras relacionadas.

Durante los 3 días del tratamiento con desipramina, el tiempo en fase REM disminuyó de media un 97,78% ($-1,14 \pm 0,28$ h) (Figura 13.A). Tras el final del tratamiento, la reducción del tiempo en fase REM remitió progresivamente hasta dejar de ser significativa en el día 2 de recuperación post-tratamiento (Figura 13.A). En el día

5 post-tratamiento ocurrió un incremento del 64,25% ($0,75 \pm 0,31$ h) en el tiempo en fase REM, que decayó gradualmente en los días sucesivos y dejó de ser significativo en el día 8 (Figura 13.A).

El tiempo en vigilia no mostró cambios sustanciales durante el periodo de tratamiento con desipramina y el posterior periodo de recuperación (Figura 13.B). Por su parte, el tiempo en fase NREM aumentó un 28,35% ($3,28 \pm 1,01$ h) en el día 1 del tratamiento, continuó siendo superior al valor inicial durante el día siguiente y mostró escasas modificaciones respecto al valor inicial durante el resto del periodo de registro (Figura 13.C).

El tiempo en transiciones a fase REM por día descendió de media un 98,60% ($-0,47 \pm 0,12$ h) durante el periodo de tratamiento, y esta disminución decayó progresivamente hasta dejar de ser significativa en el día 4 de recuperación post-tratamiento (Figura 13.D). A continuación, ocurrió un incremento del tiempo en transiciones a fase REM, que fue significativo durante los días 6 y 7 post-tratamiento y alcanzó un máximo del 36,44% ($0,17 \pm 0,18$ h) durante el día 6 (Figura 13.D).

El tiempo en transiciones abortadas también se redujo durante el periodo de tratamiento, con una caída media del 56,88% ($-0,33 \pm 0,14$ h) (Figura 13.E). Durante el periodo de recuperación post-tratamiento, esta reducción fue remitiendo hasta dejar de ser significativa en el día 4, tras lo que ocurrió un incremento del tiempo en transiciones abortadas que abarcó los días 6, 7 y 8, con un máximo del 62,98% ($0,37 \pm 0,27$ h) en el día 7 (Figura 13.E).

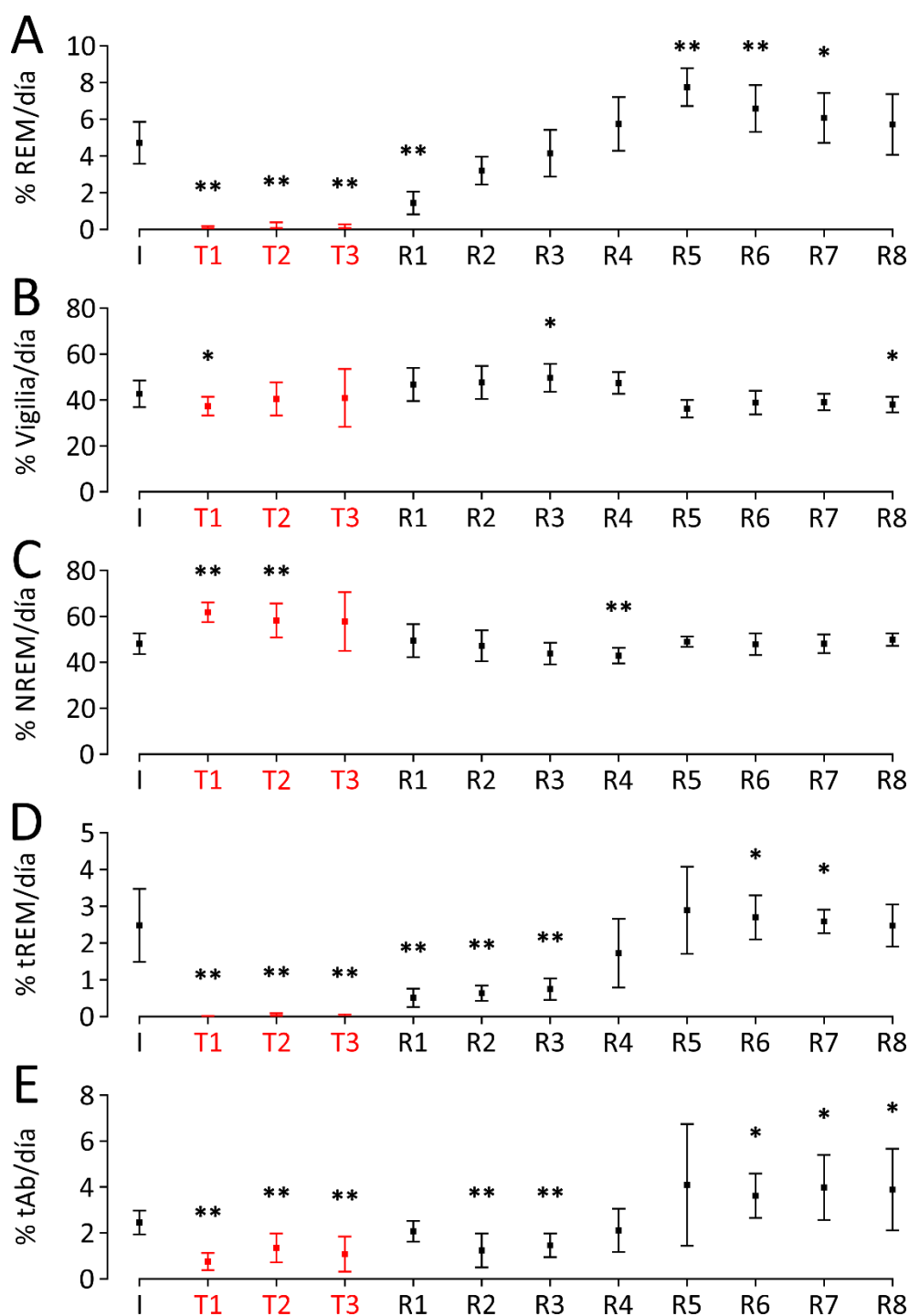


Figura 13. Efectos de la privación de fase REM de 3 días por administración de desipramina sobre el tiempo por día en cada estado del ciclo vigilia-sueño. Se representan los porcentajes del día de registro en fase REM (A), vigilia (B), fase NREM (C), transiciones a fase REM (D; tREM) y transiciones abortadas (E; tAb). I, día inicial; T1 a T3, días del tratamiento con desipramina del 1 al 3; R1 a R8, días de recuperación post-tratamiento del 1 al 8. Se destacan en color rojo los valores correspondientes al periodo de tratamiento con desipramina. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, P<0,05; **, P<0,01 (prueba T para muestras relacionadas). N=7 individuos.

La duración media de los episodios de fase REM aumentó durante los días 2, 3 y 4 del periodo de recuperación, alcanzando un incremento máximo del 99,69% ($68,45 \pm 17,64$ s) a los 2 días tras el fin del tratamiento con desipramina (Figura 14.A). A partir del día 5, la duración fue similar al valor inicial (Figura 14.A). La duración de las transiciones a fase REM varió poco a lo largo del periodo post-tratamiento, mostrando únicamente un descenso en el día 3 (-25,28%, $-7,36 \pm 3,29$ s) (Figura 14.B). Las transiciones abortadas fueron menos duraderas durante los días 2, 3 y 4 post-tratamiento, con una reducción máxima del 37,37% ($-8,88 \pm 3,19$ s) en el día 3 (Figura 14.C).

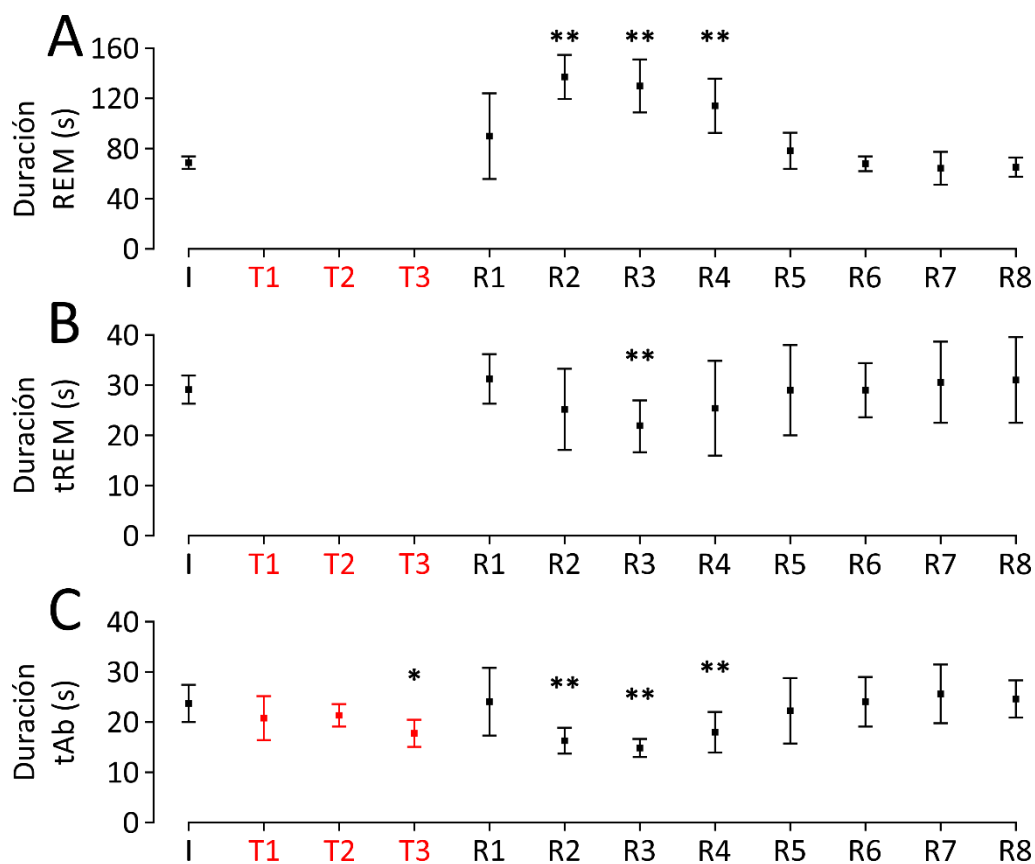


Figura 14. Efectos de la privación de fase REM de 3 días por administración de desipramina sobre la duración de los episodios de fase REM (A), transiciones a fase REM (B; tREM) y transiciones abortadas (C; tAb). I, día inicial; T1 a T3, días del tratamiento con desipramina del 1 al 3; R1 a R8, días de recuperación post-tratamiento del 1 al 8. Se destacan en color rojo los valores correspondientes al periodo de tratamiento con desipramina. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, P<0,05; **, P<0,01 (prueba T para muestras relacionadas). N=7 individuos. Las duraciones de los episodios de fase REM y de transiciones a fase REM no se calcularon para los días P1 a P3 debido al bajo número de muestras.

Durante los tres días del tratamiento con desipramina, la fase REM fue prácticamente suprimida, por lo que su número de episodios descendió una media del 98,61% ($-2,54 \pm 0,62$ episodios/h) (Figura 15.A). El número de episodios continuó siendo inferior al valor inicial durante los días 1, 2 y 3 de recuperación post-tratamiento, se equiparó a este durante el día 4 y mostró un incremento que abarcó del día 5 al 8 (Figura 15.A). El incremento máximo (50,80%, $1,31 \pm 1,02$ episodios/h) se produjo en el día 5 post-privación (Figura 15.A). La disminución del número de episodios de fase REM durante el periodo de tratamiento impidió calcular la duración media de los episodios para este intervalo temporal debido al bajo número de muestras (Figura 14.A).

El número de transiciones a fase REM disminuyó un 97,12% ($-2,31 \pm 0,59$ episodios/h) de media durante el periodo de tratamiento con desipramina y continuó siendo significativamente inferior al valor inicial durante los días 1, 2 y 3 de recuperación (Figura 15.B). Durante los días del 5 al 8 de recuperación, el número de transiciones a fase REM aumentó, alcanzando su incremento máximo en el día 5 (45,32%, $1,08 \pm 0,83$ episodios/h) (Figura 15.B).

Por su parte, el número de transiciones abortadas se redujo en un 50,25% ($-1,85 \pm 0,79$ episodios/h) durante el tratamiento con desipramina y no mostró diferencias significativas con el valor inicial durante los días del 1 al 4 del periodo de recuperación post-tratamiento (Figura 15.C). Durante los días del 5 al 8, el número de transiciones abortadas aumentó, con un incremento máximo del 62,68% ($2,31 \pm 2,36$ episodios/h) en el día 5 de recuperación post-tratamiento (Figura 15.C).

Para esclarecer si la manipulación de las ratas o el vehículo de la desipramina tuvieron algún efecto sobre el ciclo vigilia-sueño, se realizó un control que consistió en la sustitución de las 6 dosis de desipramina por solución salina. No se hallaron diferencias significativas en los tiempos por día en fase REM, en transiciones a fase REM y en transiciones abortadas a lo largo del periodo de registro (prueba T para muestras relacionadas, $P > 0,05$. N=4 individuos).

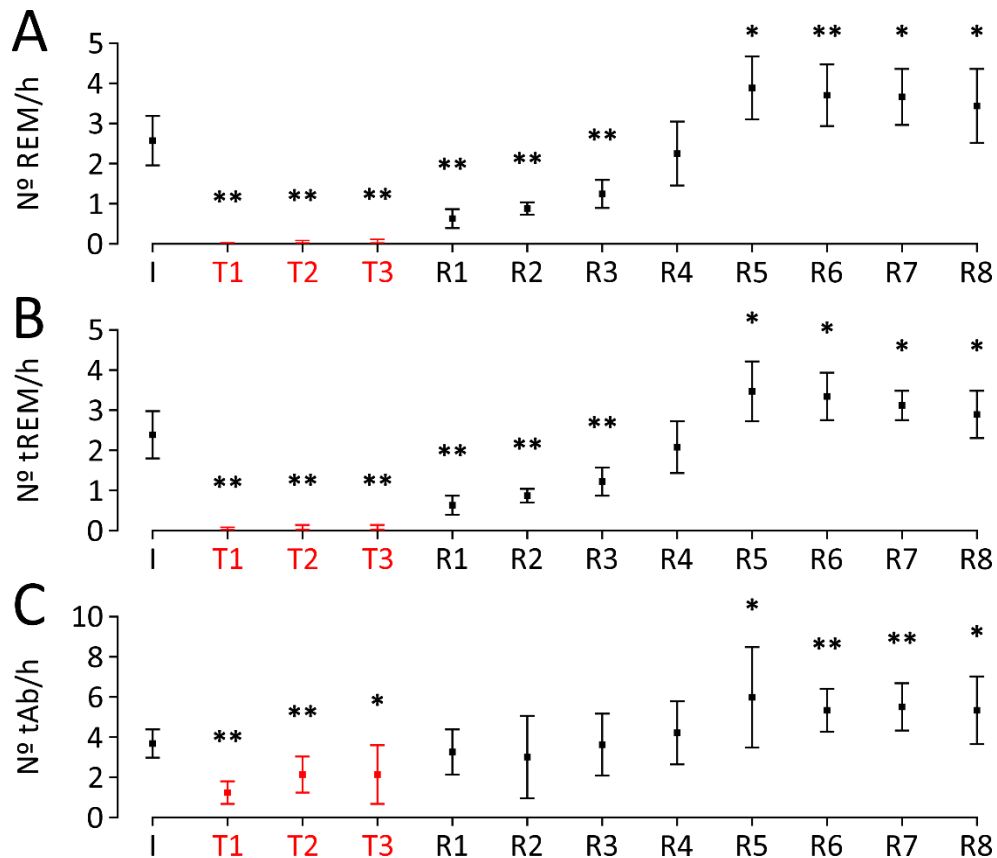


Figura 15. Efectos de la privación de fase REM de 3 días por administración de desipramina sobre el número de episodios de fase REM (A), transiciones a fase REM (B; tREM) y transiciones abortadas (C; tAb). I, día inicial; T1 a T3, días del tratamiento con desipramina del 1 al 3; R1 a R8, días de recuperación post-tratamiento del 1 al 8. Se destacan en color rojo los valores correspondientes al periodo de tratamiento con desipramina. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N=7$ individuos.

De este modo, la administración de desipramina indujo una privación de fase REM que fue selectiva, ya que no redujo la cantidad de fase NREM. Durante los primeros días después del tratamiento, la cantidad de fase REM fue aumentando progresivamente hasta que superó el valor inicial de forma significativa, alcanzando el incremento máximo en el día 5 post-tratamiento. Así, el incremento del tiempo en fase REM ocurrió de manera retardada respecto al método de la plataforma, cuyo incremento máximo se alcanzó en el día 1 post-privación. Este retraso pudo deberse al tiempo de lavado del fármaco tras el final del periodo de tratamiento.

4.3 Efectos de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica

En la literatura se describe que la privación de fase REM induce cambios en la potencia de las actividades delta (0,5-4 Hz) y theta (6-9 Hz) del EEG. Sin embargo, existe poca información acerca de los efectos de la privación sobre las actividades de mayor frecuencia y se desconoce si puede producir cambios en la frecuencia de las oscilaciones del EEG.

Para determinar los efectos de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica, se realizó un estudio de la densidad espectral de potencia del EEG. Se analizaron episodios de vigilia, fase NREM y fase REM a intervalos regulares de 12 h tras la privación y se compararon los espectros de potencia del EEG en cada momento con la situación inicial mediante pruebas T para muestras relacionadas. Adicionalmente, dado que la actividad theta presentó un pico de potencia bien definido que permitió distinguirla claramente del resto de las actividades del EEG, se estudió el efecto de la privación sobre sus valores de frecuencia y potencia.

Los análisis se llevaron a cabo en tres grupos de ratas de la cepa Lister Hooded, que se sometieron a una privación de fase REM por el método de la plataforma durante 4 (N=8 individuos) o 6 días (N=5 individuos), o bien por administración de desipramina durante 3 días (N=8 individuos). Adicionalmente, se realizó un control (N=4 individuos) en el que las ratas se sometieron a un tratamiento idéntico a la privación por desipramina, salvo que las inyecciones fueron de solución salina.

4.3.1 Efectos sobre el EEG durante la fase REM

La privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma provocó un cambio en el perfil de potencia del EEG durante la fase REM, que sugirió un incremento de la frecuencia de sus actividades (Figura 16.A). Este incremento afectó a todo el rango de frecuencias y fue especialmente evidente por debajo de los 20 Hz. El aumento de frecuencia fue máximo durante los primeros episodios de fase REM tras la privación (Figura 16.A) y remitió progresivamente durante el periodo de recuperación post-privación (Figura 16, B-F).

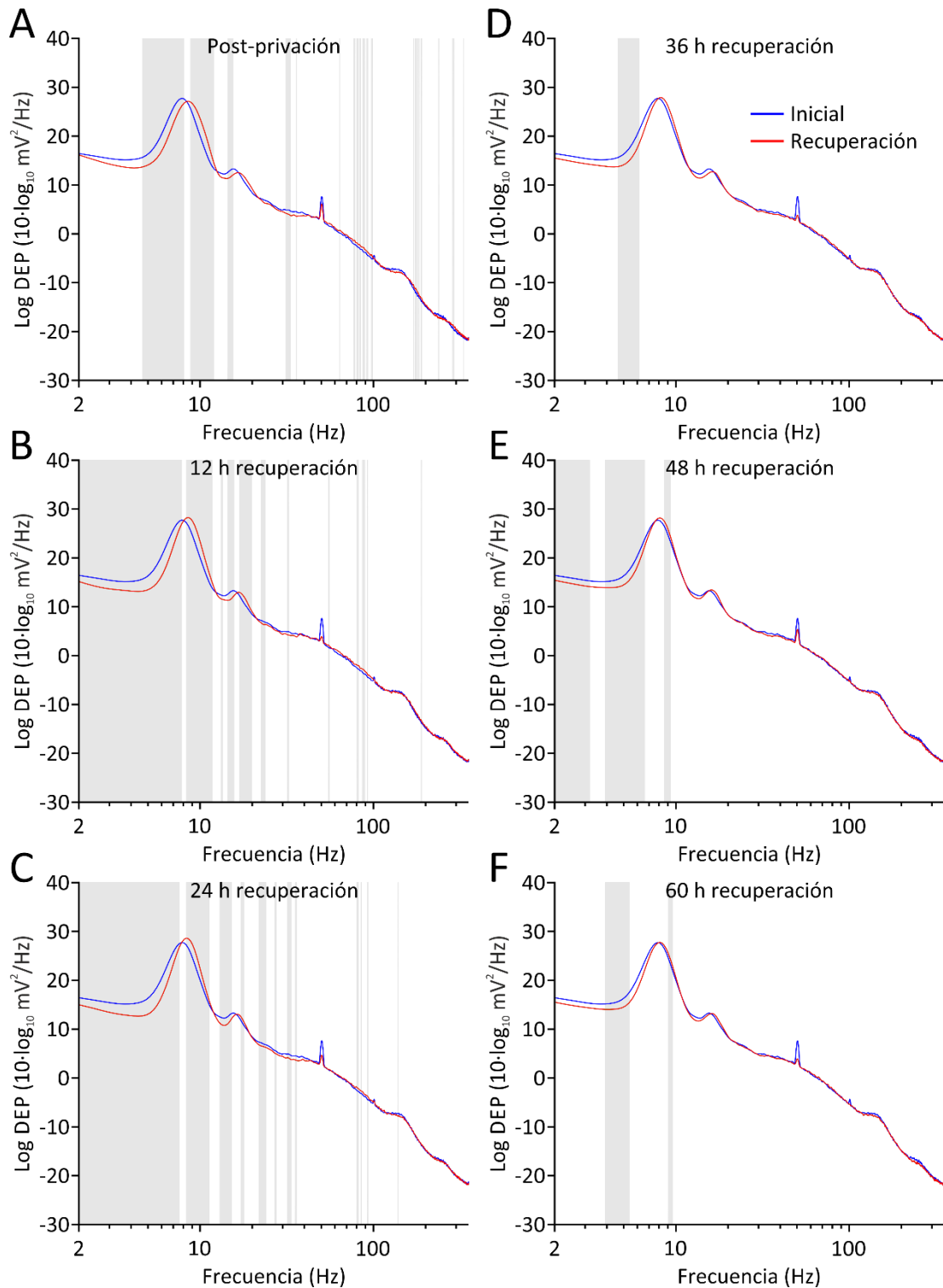


Figura 16. Cambios en la densidad espectral de potencia del EEG de la fase REM tras la privación de 4 días por el método de la plataforma. Se representa el espectro de potencia medio de los primeros episodios de fase REM registrados tras la privación (A) y de los episodios muestreados cada 12 h a lo largo del periodo de recuperación post-privación (B-F). Trazo azul, EEG inicial; trazo rojo, EEG de recuperación post-privación. Las bandas grises representan las diferencias significativas de potencia entre la situación inicial y la situación de recuperación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). $N=8$ individuos.

Con el fin de determinar si el incremento de la duración de la privación podría exacerbar los cambios que se observaron tras los 4 días de privación, se realizó una privación de 6 días por el método de la plataforma (N=5 individuos). Del mismo modo que tras la privación de 4 días, se observaron cambios en el espectro de potencia, que sugirieron la existencia de un incremento en la frecuencia de las actividades del EEG (Figura 17.A). Tras la privación de 6 días, la magnitud de los cambios fue mayor que tras la privación de 4 días y se observaron mejor los incrementos de frecuencia en las bandas de frecuencia más alta (Figura 17.A). Los mayores cambios se observaron durante los primeros episodios de fase REM del periodo de recuperación post-privación, y estas modificaciones decayeron progresivamente en los días sucesivos hasta que el espectro de potencia del EEG volvió a ser similar a la situación inicial (Figura 17.B-F).

La privación de 3 días por administración de desipramina indujo cambios en el perfil de potencia del EEG durante la fase REM que sugirieron un incremento de la frecuencia de sus actividades. El incremento de frecuencia no se produjo al inicio del periodo post-tratamiento, sino que ocurrió de forma retardada y gradual. Así, el espectro de potencia del EEG fue semejante a la situación inicial durante el principio del periodo de recuperación post-privación (Figura 18.A) y las mayores modificaciones se observaron entre las 84 y las 108 h post-tratamiento (Figura 18, C y D). A continuación, los cambios revirtieron progresivamente hasta que el espectro de potencia del EEG volvió a ser semejante a la situación inicial (Figura 18.F).

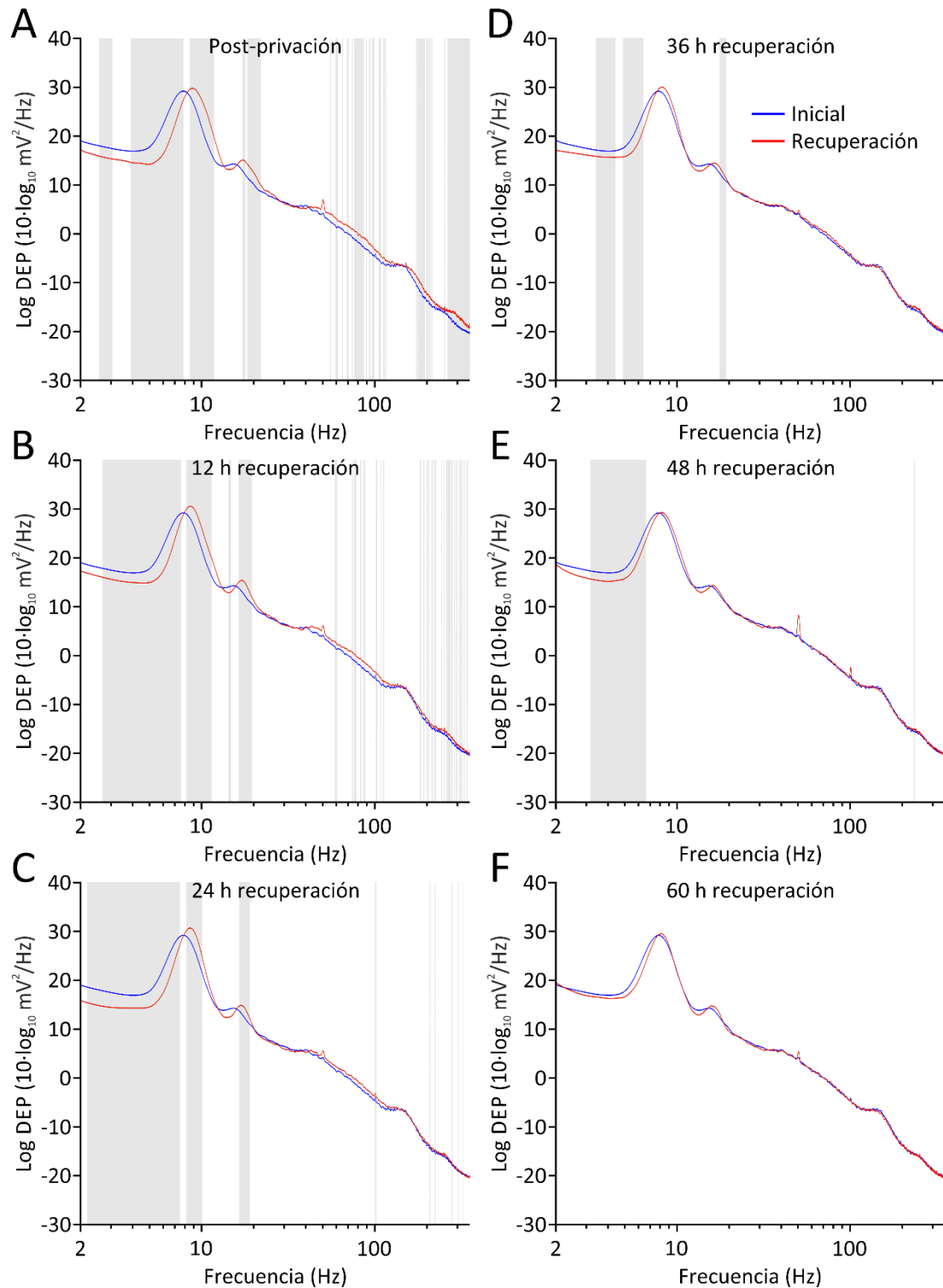


Figura 17. Cambios en la densidad espectral de potencia del EEG de la fase REM tras la privación de 6 días por el método de la plataforma. Se representa el espectro de potencia medio de los primeros episodios de fase REM registrados tras la privación (A) y de los episodios muestreados cada 12 h a lo largo del periodo de recuperación post-privación (B-F). Trazo azul, EEG inicial; trazo rojo, EEG de recuperación post-privación. Las bandas grises representan las diferencias significativas de potencia entre la situación inicial y la situación de recuperación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). $N=5$ individuos.

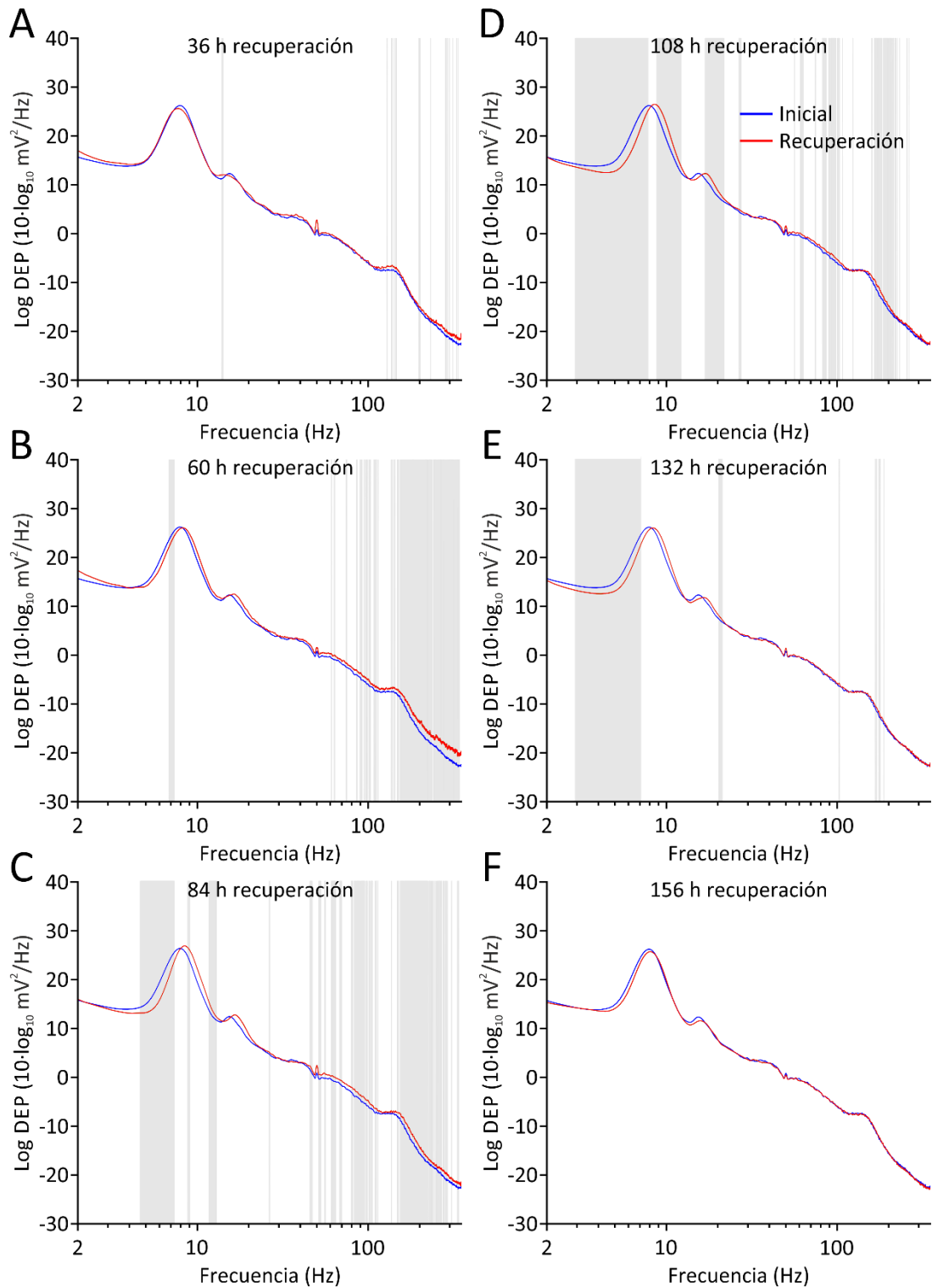


Figura 18. Cambios en la densidad espectral de potencia del EEG de la fase REM tras la privación de 3 días por administración de desipramina. Se representa el espectro de potencia medio de los episodios de fase REM muestreados a las 36 h de recuperación (A) y cada 24 h a lo largo del periodo de recuperación post-tratamiento (B-F). Trazo azul, EEG inicial; trazo rojo, EEG de recuperación post-tratamiento. Las bandas grises representan las diferencias significativas de potencia entre la situación inicial y la situación de recuperación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). $N = 8$ individuos.

Para caracterizar el incremento generalizado de la frecuencia que se observó tras la privación de fase REM, la frecuencia de las actividades del EEG post-privación se redujo mediante el remuestreo de la señal. Para ello, se aumentó la tasa de muestreo de la señal de EEG post-privación, reduciendo, por tanto, la frecuencia de todas las actividades del EEG en la misma proporción. Se seleccionaron los momentos en los que se observaron los cambios máximos en frecuencia, esto es, el inicio del periodo de recuperación tras la privación de 6 días por el método de la plataforma y 108 h después del fin del tratamiento con desipramina. La reducción de la frecuencia se realizó en pasos del 1% y, en cada caso, se llevó a cabo la comparación estadística del espectro de frecuencias de la señal remuestreada con la situación inicial. Este procedimiento se repitió hasta que se halló la situación de menor diferencia con el EEG de la situación inicial. Así, se obtuvo que la mayor parte de las diferencias significativas de potencia para la privación por el método de la plataforma (Figura 19.A) desaparecieron tras reducir la frecuencia del EEG post-privación en un 11% (Figura 19.B). Por su parte, las diferencias significativas de potencia tras el tratamiento con desipramina (Figura 19.C) desaparecieron tras una reducción del 6% en la frecuencia del EEG post-tratamiento (Figura 19.D). De este modo, un incremento generalizado de la frecuencia del EEG explicó satisfactoriamente los cambios inducidos por la privación. Las diferencias significativas remanentes tras la reducción de la frecuencia del EEG post-privación podrían deberse a modificaciones en la potencia de la señal.

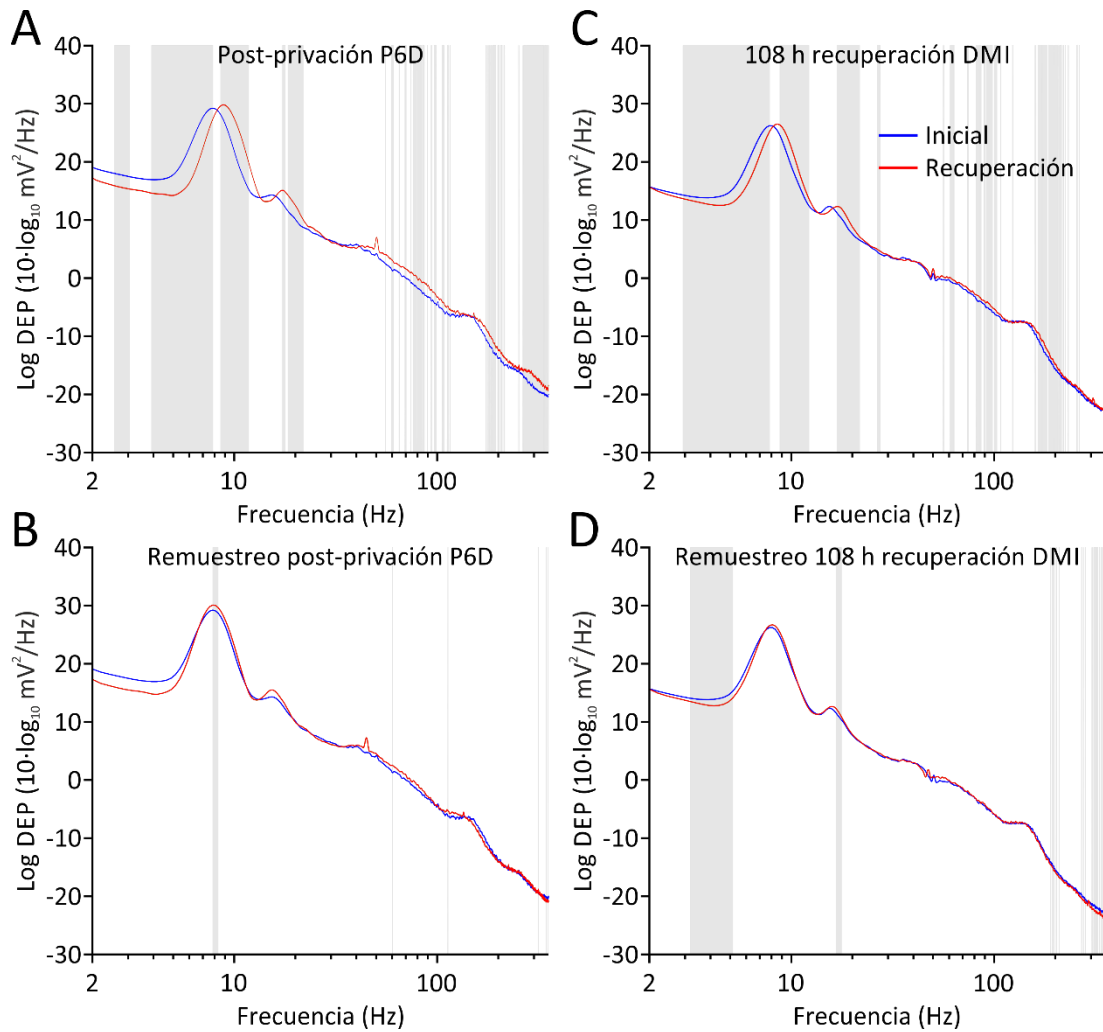


Figura 19. Análisis de la reducción de la frecuencia del EEG de la fase REM tras la privación de 6 días por el método de la plataforma (A y B; P6D) y de 3 días por administración de desipramina (C y D; DMI). Se representa la comparación entre los espectros de potencia medios en la situación inicial y de recuperación post-privación, antes (A y C) y después de reducir la frecuencia del EEG de recuperación un 11% (B) y un 6% (D). Trazo azul, EEG inicial; trazo rojo, EEG de recuperación. Las bandas grises representan las diferencias significativas de potencia entre la situación inicial y la situación de recuperación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). $N=5$ (A y B) y 8 individuos (C y D).

Dado que la oscilación theta muestra un pico de potencia conspicuo y se distingue claramente de las demás actividades del EEG, se procedió a realizar un análisis concreto de la frecuencia y la potencia de esta actividad. En la Figura 20 se muestra un ejemplo representativo de la variación de la frecuencia de la actividad theta a lo largo del tiempo de registro en un animal privado de fase REM durante 6 días por el método de la

plataforma. Como se puede observar, la frecuencia de theta aumentó tras la privación respecto a la situación inicial, y este incremento decayó gradualmente.

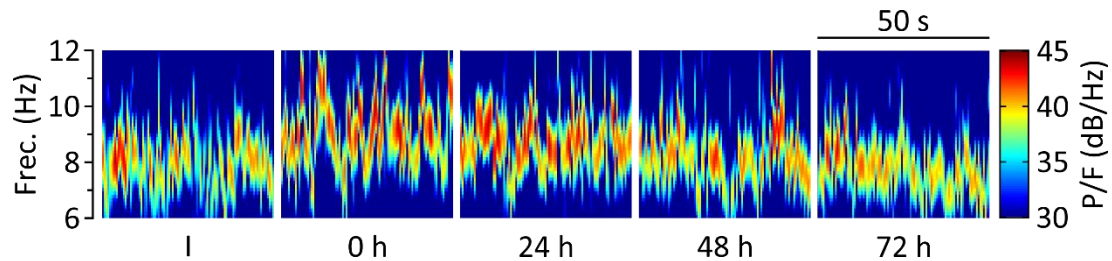


Figura 20. Ejemplo de espectrograma del EEG de la fase REM de una rata sometida a una privación de 6 días por el método de la plataforma. Se representan intervalos 50 s de fase REM pertenecientes a la situación inicial (I), al primer episodio de fase REM tras finalizar el periodo de privación (0 h) y a episodios seleccionados cada 24 h a continuación. El código de color representa la potencia de la señal por unidad de frecuencia (P/F), expresada en dB/Hz. Obsérvese que la oscilación theta experimentó un incremento de frecuencia después del protocolo de privación, que decayó progresivamente.

Para caracterizar los cambios en la oscilación theta, se realizó un análisis de la modificación de la frecuencia y de la magnitud del pico de potencia respecto a la situación inicial a lo largo del periodo de recuperación post-privación.

La privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma produjo un incremento significativo del 8,76% ($0,69 \pm 0,16$ Hz) en la frecuencia del pico de theta durante la fase REM al inicio del periodo post-privación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$) (Figura 21.A). La privación de 6 días, por su parte, indujo un aumento del 13,08% ($1,03 \pm 0,28$ Hz; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$) en la frecuencia del pico de theta durante la fase REM al inicio del periodo post-privación (Figura 21.B). El incremento de la frecuencia de theta que se observó tras 6 días de privación fue significativamente superior al que se produjo tras 4 días de privación (prueba T para muestras independientes, $P < 0,05$). En ambos casos, el incremento de la frecuencia del pico de theta decayó progresivamente a lo largo del periodo de recuperación hasta que dejó de ser significativo.

La privación de 3 días por administración de desipramina produjo un descenso inicial leve, aunque significativo (3,03%, $-0,24 \pm 0,29$ Hz; prueba T para muestras

relacionadas, $P < 0,05$), de la frecuencia del pico de theta a las 24 h post-tratamiento (Figura 21.C). Posteriormente, la frecuencia se equiparó con el valor inicial y lo superó a las 72 h de recuperación post-tratamiento, alcanzando el incremento máximo de frecuencia a las 108 h post-tratamiento (7,69%, $0,61 \pm 0,16$ Hz; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$) (Figura 21.C). A continuación, el incremento de frecuencia decayó hasta dejar de ser significativo a las 156 h (Figura 21.C).

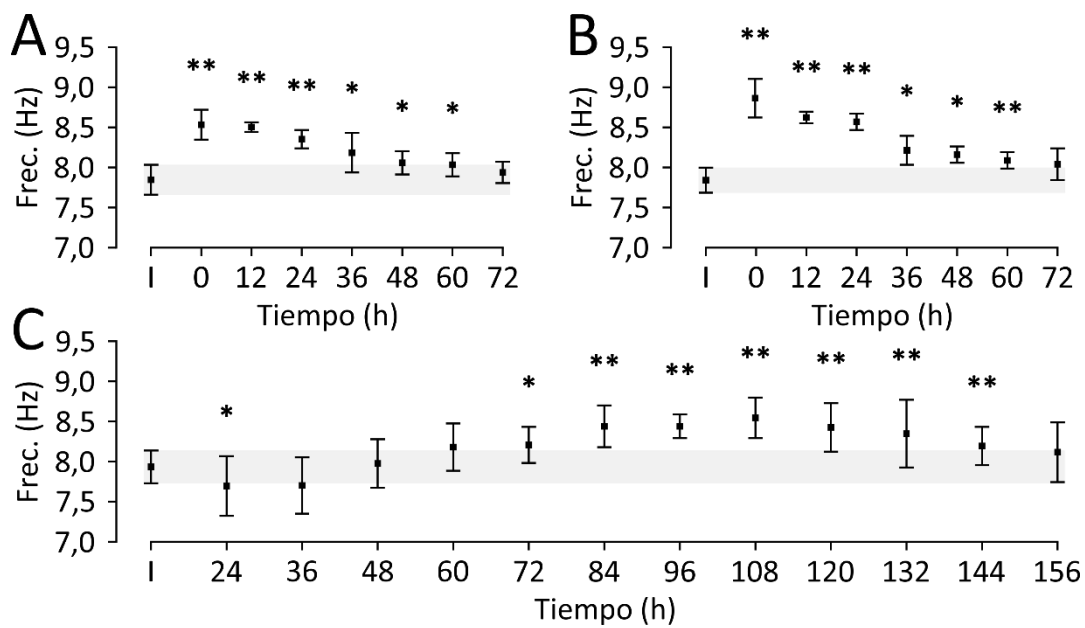


Figura 21. Frecuencia del pico de potencia de la oscilación theta durante la fase REM en la situación inicial (I) y a lo largo del periodo de recuperación tras la privación. (A), privación de 4 días por el método de la plataforma; (B), privación de 6 días por el método de la plataforma; (C), privación de 3 días por administración de desipramina. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Las bandas grises marcan la desviación típica del valor inicial para facilitar la interpretación de la figura. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N = 8$ (A, C) y 5 (B) individuos.

La privación de 4 días por el método de la plataforma produjo un incremento de la magnitud del pico de potencia de theta, que solo fue significativo a las 24 h post-privación (23,48%, $148,11 \pm 127,50$ mV^2/Hz ; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,05$) (Figura 22.A). De igual manera, la privación de 6 días produjo un aumento del pico de potencia de theta que fue significativa a las 12 y 24 h post-privación, con un

máximo del 41,78% ($364,70 \pm 174,32 \text{ mV}^2/\text{Hz}$) a las 24 h (Figura 22.B). La privación mediante la administración de desipramina, sin embargo, no produjo incrementos significativos en la magnitud del pico de potencia de theta, sino únicamente una reducción del 8,18% ($-123,71 \pm 200,31 \text{ mV}^2/\text{Hz}$) a las 24 h post-tratamiento (Figura 22.C).

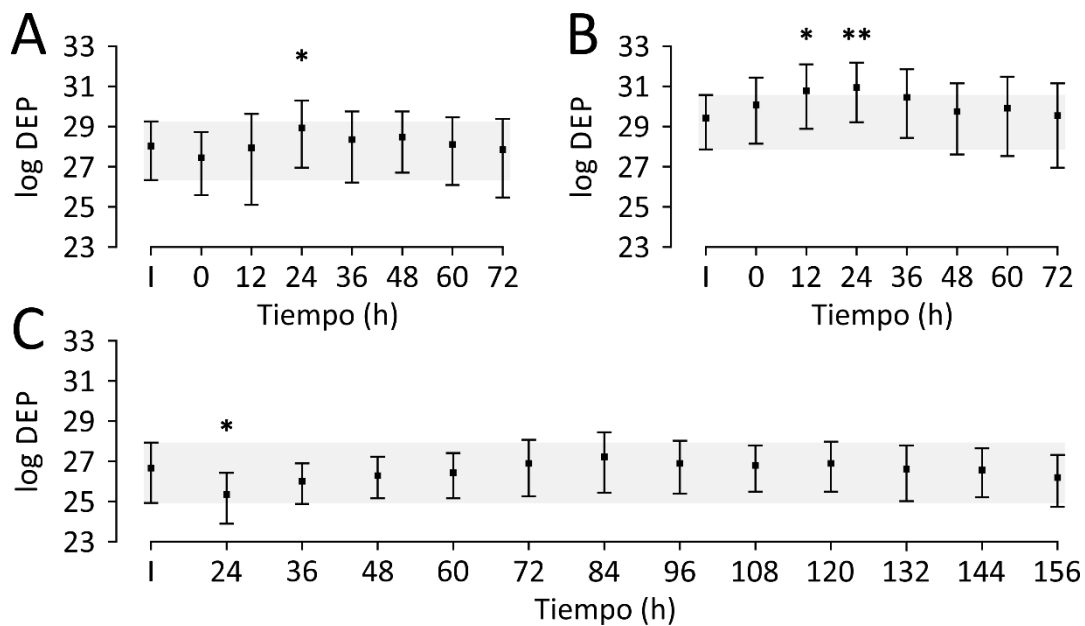


Figura 22. Valor del pico de potencia de la oscilación theta durante la fase REM en la situación inicial (I) y a lo largo del periodo de recuperación tras la privación. (A), privación de 4 días por el método de la plataforma; (B), privación de 6 días por el método de la plataforma; (C), privación de 3 días por administración de desipramina. log DEP, logaritmo de la densidad espectral de potencia ($10 \cdot \log_{10} \text{ mV}^2/\text{Hz}$). Las barras de error representan las desviaciones típicas. Las bandas grises marcan la desviación típica del valor inicial para facilitar la interpretación de la figura. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. * , P<0,05; ** , P<0,01 (prueba T para muestras relacionadas). N=8 (A, C) y 5 (B) individuos.

4.3.2 Efectos sobre el EEG durante la vigilia tranquila

Con objeto de reducir la variabilidad en el análisis de la vigilia, se utilizaron únicamente episodios de vigilia tranquila. Esto se hizo porque el EEG presentó una mayor homogeneidad durante la vigilia tranquila que durante la vigilia activa, así como una menor contaminación por la actividad muscular y una menor propensión a contener artefactos debidos al movimiento de los cables de registro. Adicionalmente, se observó

que tras la privación por el método de la plataforma aumentó la proporción de vigilia activa (con actividad theta de potencia y frecuencia elevadas, y contaminación intensa por la actividad muscular) respecto a la de vigilia tranquila (con actividad theta de menor potencia y frecuencia, y menor contaminación). Por tanto, utilizar exclusivamente episodios de vigilia tranquila evitó que los cambios en las proporciones de vigilia activa y tranquila en la muestra analizada afectasen a los resultados del presente estudio.

Durante la vigilia tranquila se observó un incremento de la frecuencia de la oscilación theta tras la privación de fase REM. En la Figura 23 se muestra el espectro de potencia del EEG durante los momentos en los que se apreciaron mayores diferencias significativas entre las situaciones inicial y post-privación. El incremento de la frecuencia de theta fue evidente tras la privación de 4 (Figura 23.A) y de 6 días (Figura 23.B) por el método de la plataforma, aunque fue difícil de apreciar tras la privación de 3 días por administración de desipramina (Figura 23.C).

Tras la privación de 6 días por el método de la plataforma se observó un incremento de la potencia del EEG que pudo corresponderse con un aumento generalizado de frecuencia (Figura 23.B). Sin embargo, este incremento no fue significativo en las bandas de frecuencia superior a theta, probablemente debido a la elevada variabilidad del espectro de potencia del EEG durante la vigilia. Tras remuestrear la señal de EEG post-privación para reducir la frecuencia de sus actividades en un 11%, la comparación visual de su espectro de potencia con la situación inicial mostró que ambas señales se asemejaron más, pero continuaron teniendo diferente aspecto (Figura 23.D), lo que sugirió un posible incremento generalizado de la potencia del EEG tras la privación.

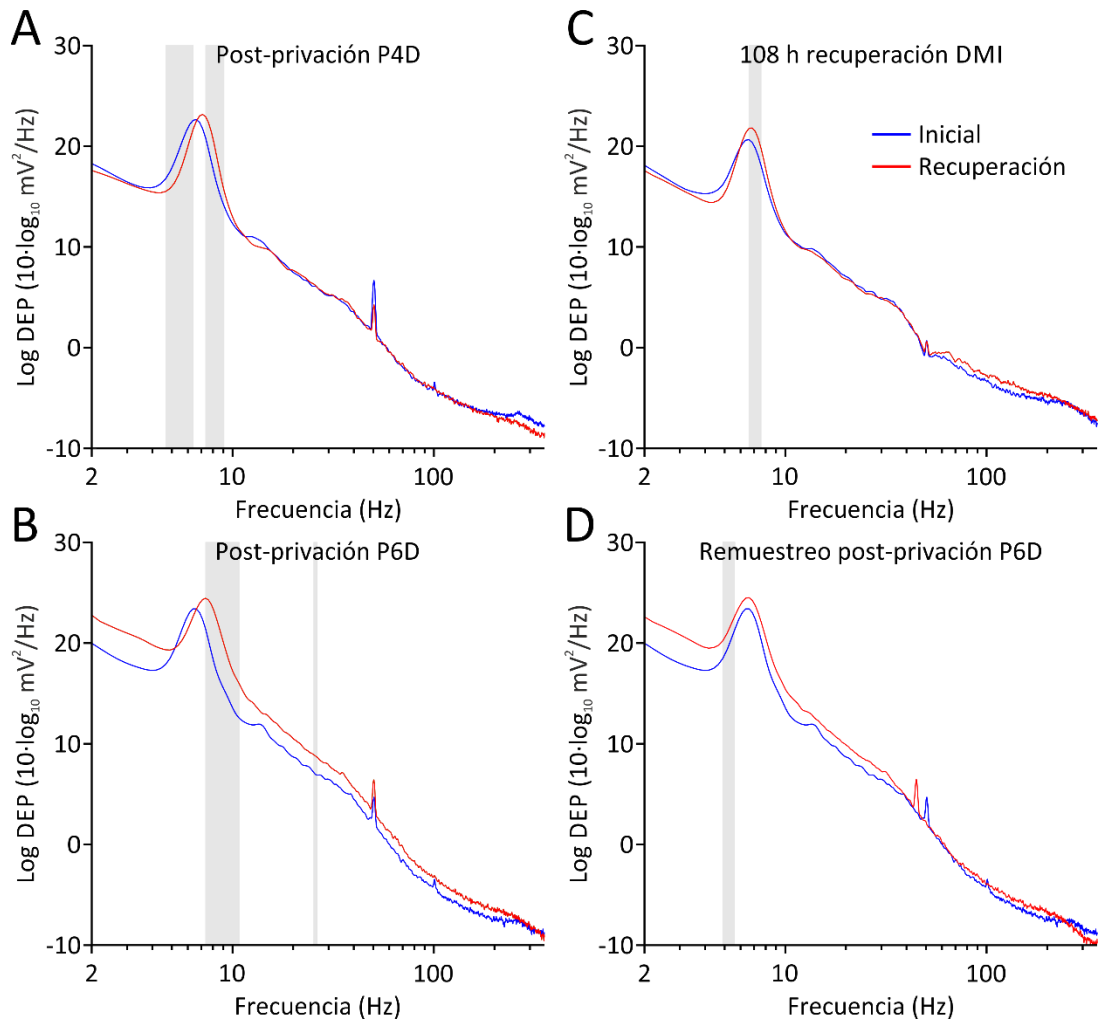


Figura 23. Cambios en la densidad espectral de potencia del EEG de vigilia inducidos por la privación de 4 (A; P4D) y de 6 días (B; P6D) por el método de la plataforma, y por la privación de 3 días por administración de desipramina (C; DMI). Se representan los momentos tras la privación cuyo espectro de potencia medio mostró mayores diferencias significativas respecto a la situación inicial, así como el resultado de reducir un 11% la frecuencia del EEG tras la privación de 6 días por el método de la plataforma (D; remuestreo P6D). Trazo azul, EEG inicial; trazo rojo, EEG de recuperación. Las bandas grises representan las diferencias significativas de potencia entre la situación inicial y la situación de recuperación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). $N=8$ (A, C) y 5 (B, D) individuos.

El análisis de la frecuencia en el pico de potencia de theta mostró que las privaciones de 4 y 6 días por el método de la plataforma indujeron un incremento, que fue máximo al inicio del periodo de recuperación post-privación en ambos casos. El incremento fue del 8,42% ($0,55 \pm 0,13$ Hz; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$) tras la privación de 4 días (Figura 24.A) y del 13,22% ($0,86 \pm 0,49$ Hz; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,05$) tras la privación de 6 días (Figura 24.B). En los días

sucesivos, los incrementos de la frecuencia fueron decayendo progresivamente hasta que dejaron de ser significativos. No hubo diferencias significativas entre las magnitudes de los incrementos de frecuencia tras 4 y 6 días de privación (prueba T para muestras independientes, $P > 0,05$).

Tras la privación por administración de desipramina ocurrió un descenso ($3,99\%$, $-0,26 \pm 0,20$ Hz) en la frecuencia del pico de theta a las 24 h post-tratamiento respecto al valor inicial (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,05$) (Figura 24.C). A continuación, tuvo lugar un incremento de la frecuencia del pico de theta, que fue ocurrió de forma retardada y fue de escasa magnitud, con un máximo del $3,76\%$ ($0,25 \pm 0,24$ Hz; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,05$) a las 108 h de recuperación (Figura 24.C).

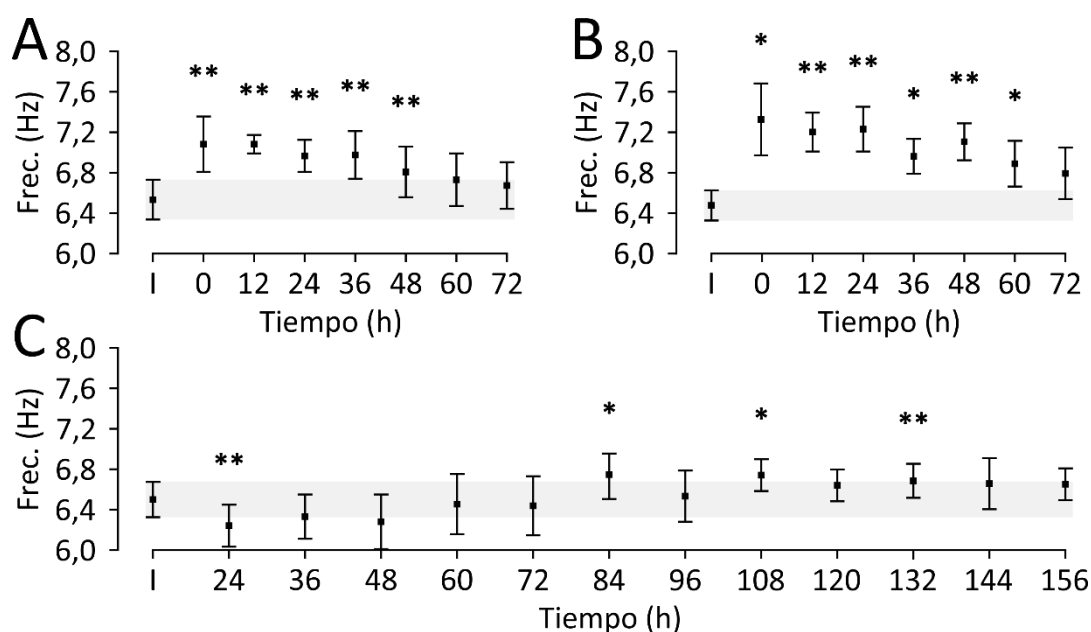


Figura 24. Frecuencia del pico de potencia de la oscilación theta durante la vigilia en la situación inicial (I) y a lo largo del periodo de recuperación tras la privación. (A), privación de 4 días por el método de la plataforma; (B), privación de 6 días por el método de la plataforma; (C), privación de 3 días por administración de desipramina. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Las bandas grises marcan la desviación típica del valor inicial para facilitar la interpretación de la figura. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N = 8$ (A, C) y 5 (B) individuos.

En cuanto a la magnitud del pico de potencia de theta, la privación de 6 días por el método de la plataforma indujo un incremento que solo fue significativo a las 12 h de recuperación post-privación (51,02%, $115,37 \pm 85,41$ mV²/Hz; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,05$) (Figura 25.B). La privación de 4 días por el método de la plataforma no produjo incrementos en la potencia de theta durante la vigilia en el periodo post-privación (Figura 25.A). La privación por administración de desipramina provocó un aumento sostenido de la potencia de theta, que abarcó desde las 36 hasta las 120 h tras el final del periodo de tratamiento, con un máximo del 36,04% ($44,19 \pm 39,09$ mV²/Hz; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,05$) a las 84 h (Figura 25.C).

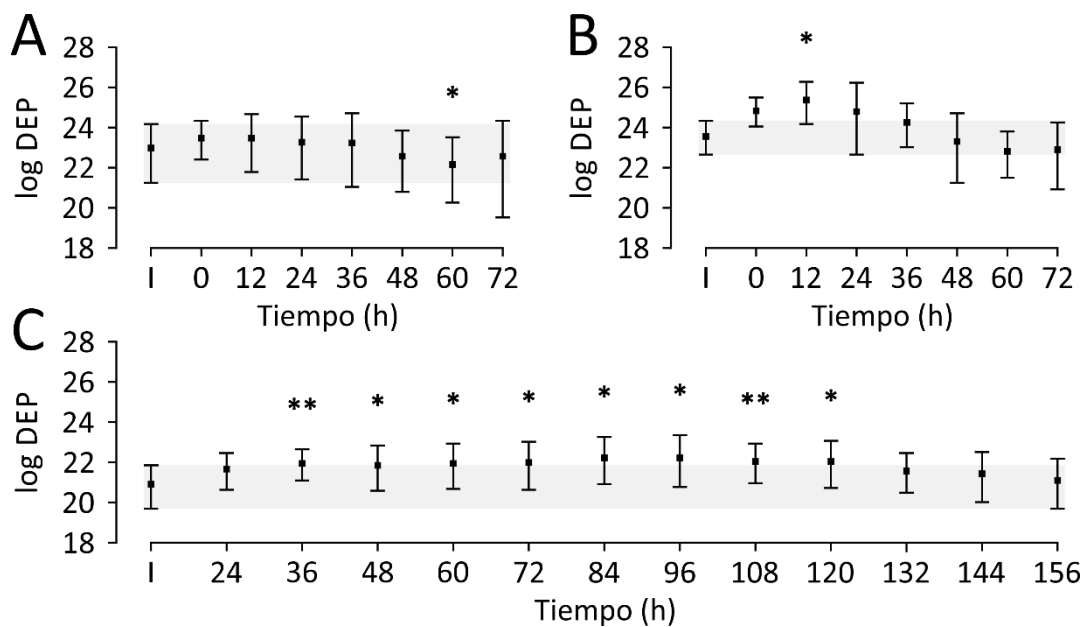


Figura 25. Valor del pico de potencia de la oscilación theta durante la fase REM en la situación inicial (I) y a lo largo del periodo de recuperación tras la privación. (A), privación de 4 días por el método de la plataforma; (B), privación de 6 días por el método de la plataforma; (C), privación de 3 días por administración de desipramina. log DEP, logaritmo de la densidad espectral de potencia ($10 \cdot \log_{10}$ mV²/Hz). Las barras de error representan las desviaciones típicas. Las bandas grises marcan la desviación típica del valor inicial para facilitar la interpretación de la figura. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N=8$ (A, C) y 5 (B) individuos.

4.3.3 Efectos sobre el EEG durante la fase NREM

La privación de fase REM por el método de la plataforma produjo cambios en el EEG durante la fase NREM. Los cambios fueron mayores en los primeros episodios de fase NREM que se registraron tras el periodo de privación (Figura 26, A y D) y desaparecieron gradualmente a lo largo del periodo post-privación (Figura 26, C y F). La privación de 6 días (Figura 26, D-F) dio lugar a cambios de mayor magnitud que la privación de 4 días (Figura 26, A-C). La privación mediante la administración de desipramina, sin embargo, no produjo cambios apreciables en el EEG durante la fase NREM.

La caracterización del incremento de la frecuencia de las actividades del EEG tras la privación durante la fase NREM se llevó a cabo de manera similar a como se hizo para la fase REM (ver apartado 4.3.1). Así, se seleccionó la situación post-privación en la que el EEG mostró las mayores diferencias con la situación inicial (en este caso, los primeros episodios de fase NREM tras la privación de 6 días por el método de la plataforma) (Figura 26.A) y se llevó a cabo un remuestreo de la señal de EEG para reducir su frecuencia. El análisis mostró que el incremento de frecuencia fue del 12% y corroboró que este fenómeno explicó satisfactoriamente los cambios observados en el EEG, ya que las diferencias significativas con la situación inicial desaparecieron en su mayoría (Figura 27.B).

Los resultados del presente bloque muestran que la privación de fase REM produjo un incremento de la frecuencia de las actividades del EEG, cuya magnitud dependió de los estados del ciclo vigilia-sueño y del protocolo de privación empleado. El incremento de frecuencia se observó inmediatamente después de finalizar la privación por el método de la plataforma, mientras que se produjo de forma retardada tras la privación por administración de desipramina.

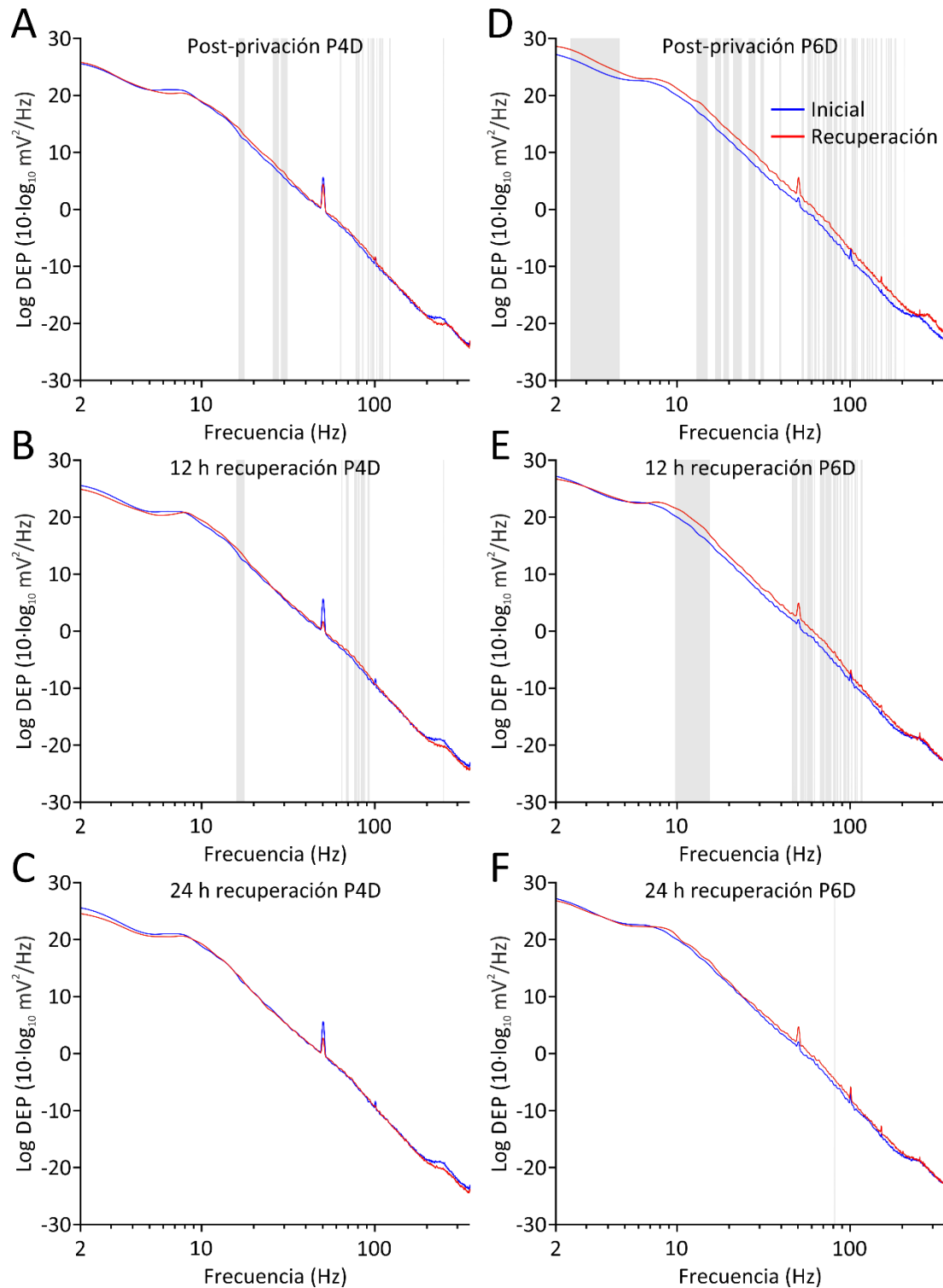


Figura 26. Cambios en la densidad espectral de potencia del EEG de la fase NREM durante las primeras 24 h de recuperación tras la privación de 4 (A-C; P4D) y de 6 días (D-F; P6D) por el método de la plataforma. Trazo azul, EEG inicial; trazo rojo, EEG de recuperación post-privación. Las bandas grises representan las diferencias significativas de potencia entre la situación inicial y la situación de recuperación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). $N=8$ (A-C) y 5 individuos (D-E).

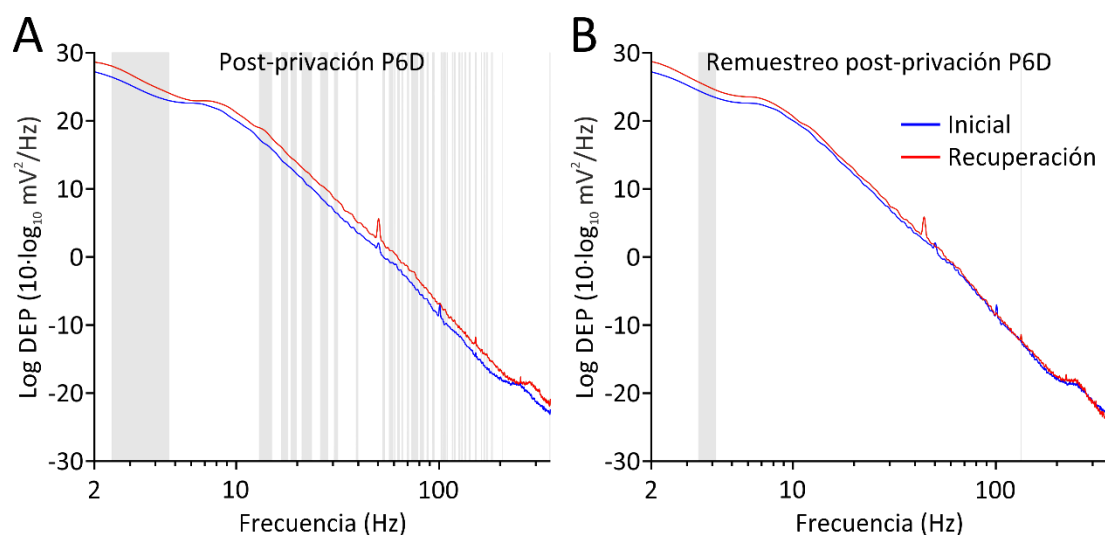


Figura 27. Análisis de la reducción de la frecuencia del EEG de la fase NREM tras la privación de 6 días por el método de la plataforma (P6D). Se representa la comparación entre los espectros de potencia medios antes (A) y después (B) de una reducción del 12% en la frecuencia del EEG de recuperación. Trazo azul, EEG inicial; trazo rojo, EEG de recuperación post-privación. Las bandas grises representan las diferencias significativas de potencia entre la situación inicial y la situación de recuperación (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). $N=5$ individuos.

4.4 Efectos de la privación de fase REM sobre el reflejo vestibulo-ocular

El reflejo vestibulo-ocular ha sido estudiado exhaustivamente y el circuito neuronal que lo produce se conoce bien. Esto, unido a su relativa simplicidad, lo convierte en un buen modelo para el estudio de los efectos de la privación de sueño sobre los sistemas sensoriales y motores. Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan caracterizado los efectos de la privación sobre el reflejo vestibulo-ocular, y esta laguna de conocimiento es particularmente acusada en lo referente a la privación selectiva de fase REM. En el presente bloque se analizaron los efectos de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma y de 3 días por administración de desipramina sobre el reflejo vestibulo-ocular.

Para estudiar los efectos de la privación de fase REM sobre las propiedades del reflejo vestibulo-ocular, se prepararon 14 ratas de la cepa Lister Hooded para el registro de sus actividades electroencefalográficas y electromiográficas, así como para el registro de sus movimientos oculares mediante la técnica del seguidor magnético de la posición ocular. El protocolo de inducción del reflejo vestibulo-ocular consistió en una

estimulación sinusoidal con frecuencias de 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 Hz y con una velocidad pico de 60 °/s. En los animales que se sometieron a una privación de 4 días por el método de la plataforma (N=7 individuos), las propiedades del reflejo vestibulo-ocular se analizaron en la situación inicial (previa a la privación), al finalizar el periodo de privación y después de 5 días de recuperación post-privación. En los animales que se privaron de fase REM por administración de desipramina durante 3 días (N=7 individuos), las propiedades del reflejo se analizaron en la situación inicial, al finalizar el periodo de tratamiento y a los 4 y 7 días post-tratamiento.

El nivel de alerta de los animales condicionó la ganancia del reflejo vestibulo-ocular y las características de las fases rápidas. Concretamente, la reducción del nivel de alerta, que se detectó mediante el estudio del EEG y el EMG, se acompañó de una reducción de la ganancia del reflejo y del número de fases rápidas por ciclo de estimulación. Bastó una estimulación suave para revertir esta caída. Para evitar que los efectos del nivel de alerta se confundiesen con los de la privación de fase REM, se analizaron únicamente los ciclos de estimulación vestibular en los que las características del EEG y el EMG mostraron que los individuos se encontraban en vigilia activa.

4.4.1 Efectos de la privación de fase REM sobre la ganancia del reflejo vestibulo-ocular

4.4.1.1 Cambios inducidos por la privación por el método de la plataforma sobre agua

En todos los animales, la privación de 4 días por el método de la plataforma provocó una reducción de la ganancia y de la magnitud de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular. La Figura 28 muestra un ejemplo representativo de los movimientos oculares de una rata, provocados por una estimulación sinusoidal en la situación inicial y tras el periodo de privación.

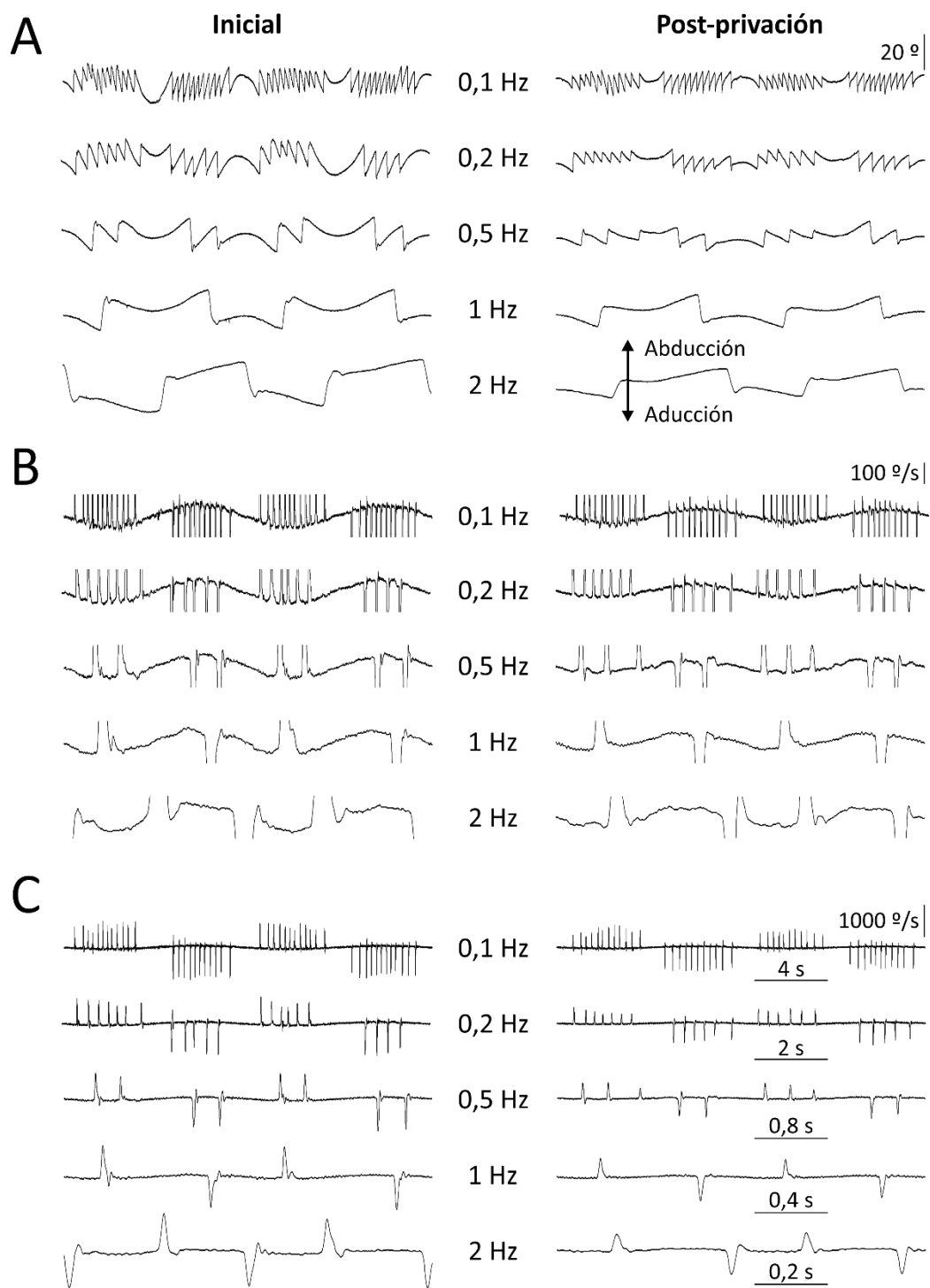


Figura 28. Ejemplo representativo de los movimientos oculares en el plano horizontal inducidos por una estimulación vestibular sinusoidal con velocidad pico de 60 °/s y frecuencias de 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 Hz en un animal. Se representan la situación inicial (primera columna) y la situación después de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma (segunda columna). Se muestran los trazos de posición (A) y de velocidad del ojo (B y C). Los trazos de velocidad se muestran en dos escalas diferentes para que se aprecien los detalles de la ganancia del reflejo (B) y la velocidad pico de las fases rápidas (C).

El análisis de la fase lenta del reflejo vestíbulo-ocular mostró que la ganancia media del reflejo disminuyó en un 26,44% (de $0,85 \pm 0,10$ a $0,62 \pm 0,11$) tras la privación por el método de la plataforma (Figura 29). La caída post-privación de la ganancia fue significativa para todas las frecuencias de estimulación utilizadas. Tras un periodo de recuperación post-privación de 5 días, la ganancia fue similar al valor inicial en todos los casos (Figura 29). Estas comparaciones se llevaron a cabo mediante pruebas T para muestras relacionadas.

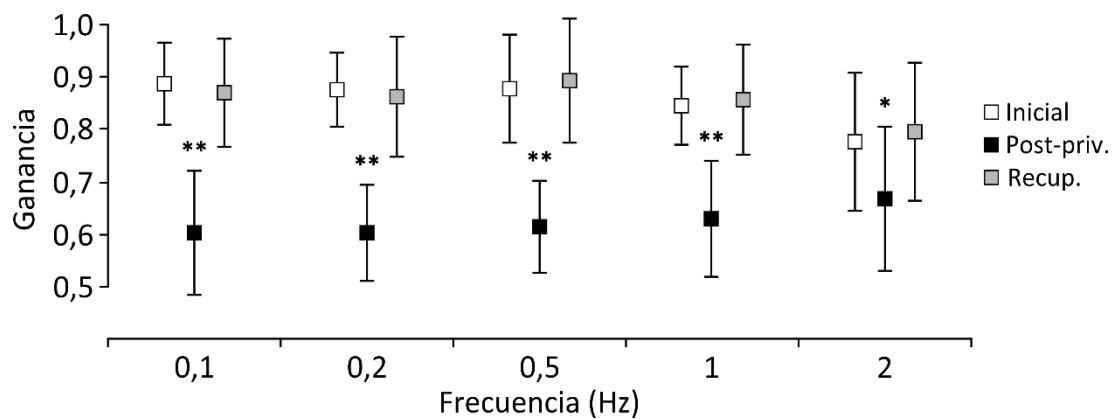


Figura 29. Variaciones en la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular tras la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma. Se representa, para las frecuencias de estimulación indicadas en el eje de abscisas, la ganancia en la situación inicial (blanco), inmediatamente después de la privación (negro) y tras un periodo de 5 días de recuperación post-privación (gris). Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N=7$ individuos.

Los valores de la ganancia, desglosados en función de la frecuencia de estimulación y de la situación experimental (inicial, post-privación y de recuperación), se muestran en la Tabla 3.

Frecuencia	Situación		
	Inicial	Post-privación	Recuperación
0,1 Hz	0,89 ± 0,08	0,60 ± 0,12	0,87 ± 0,10
0,2 Hz	0,88 ± 0,07	0,60 ± 0,09	0,86 ± 0,11
0,5 Hz	0,88 ± 0,10	0,62 ± 0,09	0,89 ± 0,11
1 Hz	0,85 ± 0,07	0,63 ± 0,11	0,86 ± 0,11
2 Hz	0,78 ± 0,13	0,67 ± 0,14	0,80 ± 0,13

Tabla 3. Valores de la ganancia por frecuencia de estimulación vestibular en la situación inicial, al finalizar la privación de 4 días por el método de la plataforma (Post-privación) y tras un periodo de 5 días de recuperación. Se muestran los valores medios y las desviaciones típicas.

4.4.1.2 Cambios inducidos por la privación por administración de desipramina

Al igual que la privación por el método de la plataforma, la privación de fase REM por administración de desipramina indujo una caída de la ganancia del reflejo vestibulo-ocular y de la magnitud de las fases rápidas en todos los animales. En la Figura 30 se muestra un ejemplo representativo de los movimientos oculares durante una estimulación vestibular sinusoidal antes y después del tratamiento con desipramina.

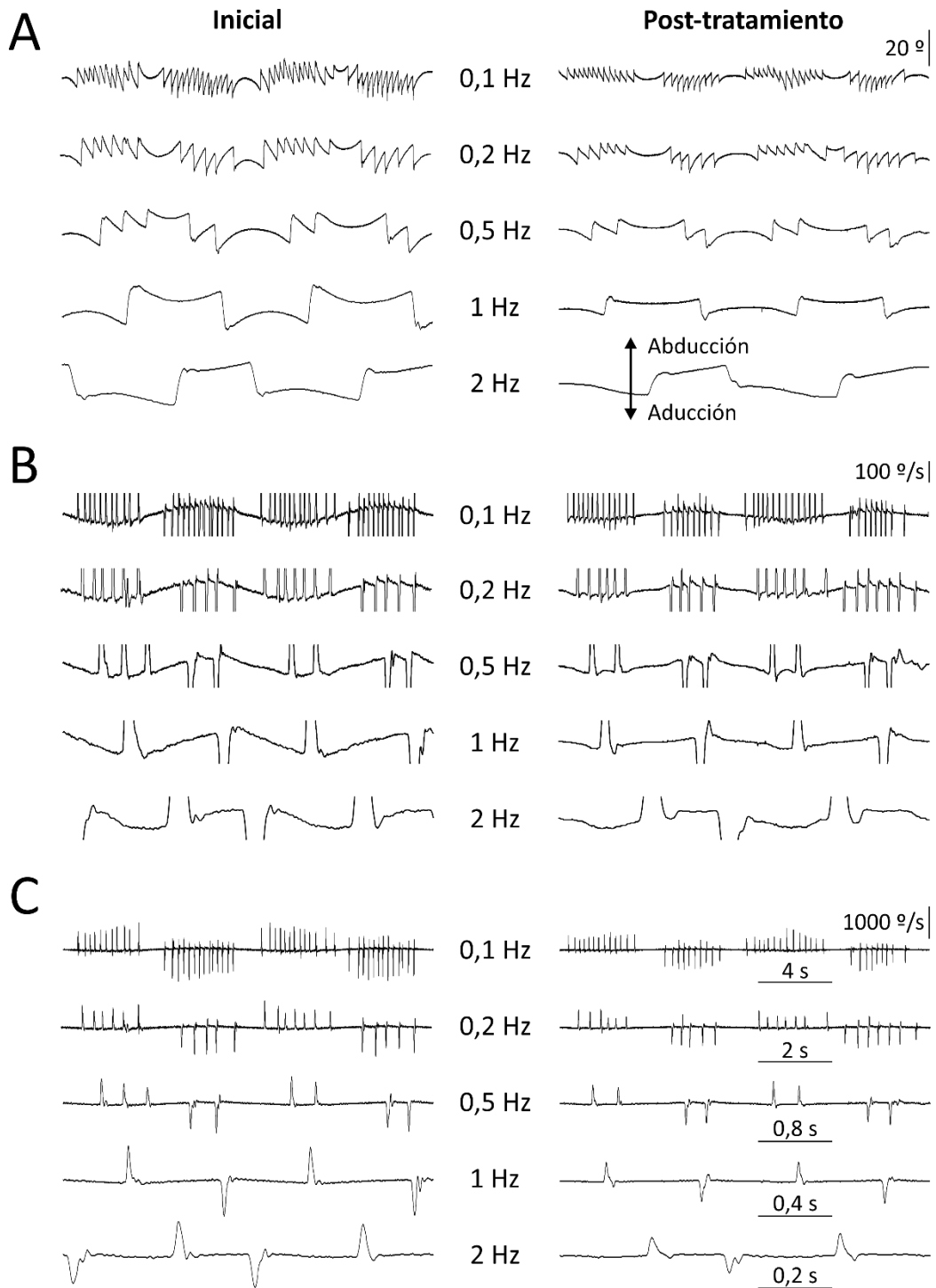


Figura 30. Ejemplo representativo de los movimientos oculares en el plano horizontal inducidos por una estimulación vestibular sinusoidal con velocidad pico de 60 °/s y frecuencias de 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 Hz en un animal. Se representan la situación inicial (primera columna) y la situación después de la privación de fase REM de 3 días por administración de desipramina (segunda columna). Se muestran los trazos de posición (A) y de velocidad del ojo (B y C). Los trazos de velocidad se muestran en dos escalas diferentes para que se aprecien los detalles de la ganancia del reflejo (B) y la velocidad pico de las fases rápidas (C).

Tras la privación de 3 días por administración de desipramina, la ganancia del reflejo vestibulo-ocular mostró una disminución media del 27,41% (de $0,89 \pm 0,09$ a $0,65 \pm 0,09$) (Figura 31). A los 4 días post-tratamiento, la ganancia del reflejo continuó siendo inferior a la inicial, con una reducción media del 16,02% respecto al valor control (de $0,89 \pm 0,09$ a $0,75 \pm 0,07$) (Figura 31). No obstante, a los 4 días post-tratamiento, la ganancia en todas las frecuencias de estimulación fue significativamente mayor que en la situación post-tratamiento (15,70% de media, de $0,65 \pm 0,09$ a $0,75 \pm 0,07$), lo que indicó que se produjo una recuperación parcial de la ganancia en este intervalo de tiempo. A los 7 días de recuperación post-tratamiento, la ganancia del reflejo no difirió significativamente del valor inicial para ninguna frecuencia de estimulación (Figura 31). Estas comparaciones se llevaron a cabo mediante pruebas T para muestras relacionadas.

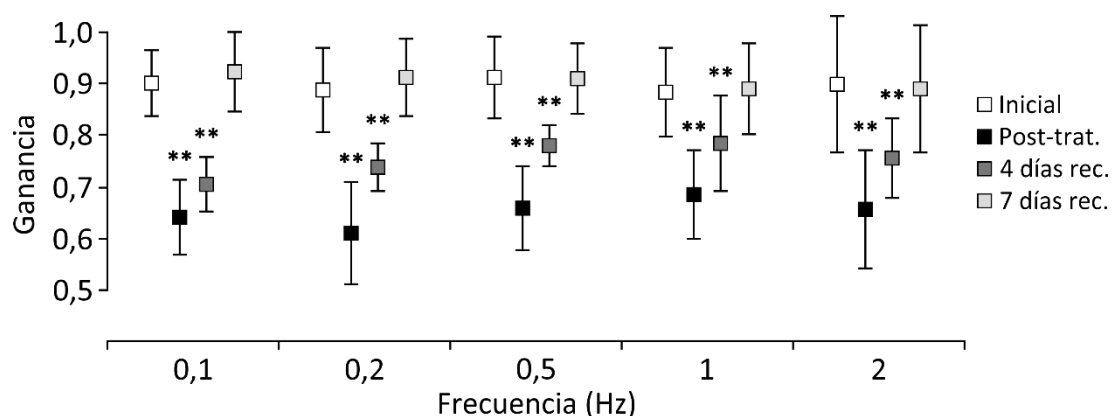


Figura 31. Variaciones en la ganancia del reflejo vestibulo-ocular tras la privación de fase REM de 3 días por administración de desipramina. Se representa, para las frecuencias de estimulación vestibular indicadas en el eje de abscisas, la ganancia en la situación inicial (blanco), inmediatamente después del tratamiento (negro), y tras 4 (gris oscuro) y 7 días (gris claro) de recuperación post-tratamiento. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N = 7$ individuos.

Los valores de la ganancia, desglosados en función de la frecuencia de estimulación y de la situación experimental, se muestran en la Tabla 4.

Frecuencia	Situación			
	Inicial	Post-tratamiento	Recuperación 4 días	Recuperación 7 días
0,1 Hz	0,90 ± 0,06	0,64 ± 0,07	0,70 ± 0,05	0,92 ± 0,07
0,2 Hz	0,89 ± 0,08	0,61 ± 0,10	0,74 ± 0,05	0,91 ± 0,07
0,5 Hz	0,91 ± 0,08	0,66 ± 0,08	0,78 ± 0,04	0,91 ± 0,07
1 Hz	0,88 ± 0,09	0,69 ± 0,09	0,78 ± 0,09	0,89 ± 0,09
2 Hz	0,89 ± 0,13	0,66 ± 0,11	0,76 ± 0,08	0,89 ± 0,12

Tabla 4. Valores de la ganancia por frecuencia de estimulación vestibular en la situación inicial, al finalizar la privación de 3 días por administración de desipramina (Post-tratamiento) y a los 4 y 7 días de recuperación. Se muestran los valores medios y las desviaciones típicas.

La realización de un control sustituyendo las inyecciones de desipramina por solución salina no produjo cambios en la ganancia del reflejo para ninguna frecuencia de estimulación vestibular (prueba T para muestras relacionadas, $P > 0,05$, $N = 4$ individuos).

Dado que tanto la aplicación del método de la plataforma como la administración de desipramina indujeron una caída de la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular, se puede concluir que esta se debió a la privación de fase REM.

4.4.2 Efectos de la privación de fase REM sobre las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular

Para el análisis del efecto de la privación de fase REM sobre las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular se seleccionaron las fases rápidas que ocurrieron durante la estimulación sinusoidal con frecuencia de 0,1 Hz, ya que estas fueron más numerosas por ciclo de estimulación que para las frecuencias de estimulación superiores. Se cuantificó el número de fases rápidas por ciclo y se analizaron la amplitud, la velocidad pico y la duración de cada fase rápida.

4.4.2.1 Cambios inducidos por la privación por el método de la plataforma sobre agua

Tras la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma, la amplitud y la velocidad pico de las fases rápidas disminuyeron con respecto a los valores iniciales en un 30,61% (de $13,64 \pm 1,37^\circ$ a $9,46 \pm 1,17^\circ$) (Figura 32.A) y en un 34,75% (de $976,24 \pm 107,75^\circ/s$ a $636,92 \pm 65,24^\circ/s$) (Figura 32.B), respectivamente (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$).

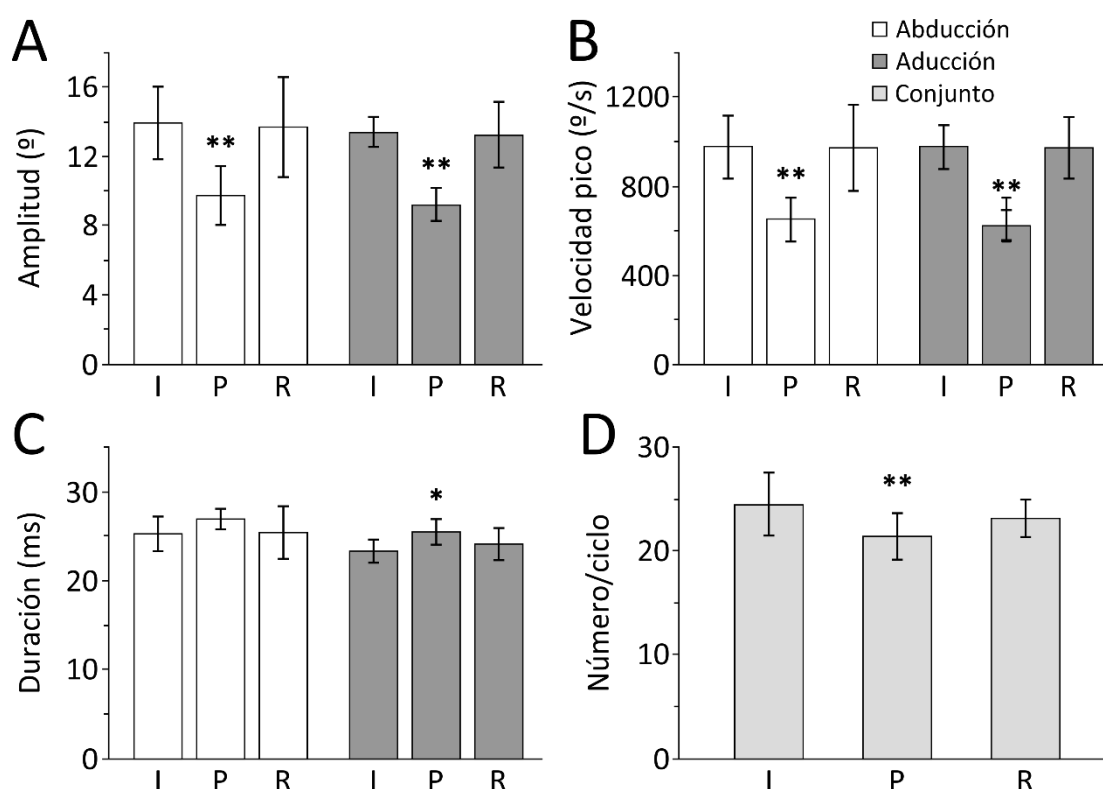


Figura 32. Variaciones en la amplitud (A), velocidad pico (B) y duración (C) de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular, y en el número de fases rápidas por ciclo de estimulación sinusoidal (D), en respuesta a la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma. Las letras en los ejes de abscisas representan: I, valores en la situación inicial; P, valores tras el periodo de privación; R, valores tras el periodo de recuperación post-privación. Se representan en blanco los valores correspondientes a los movimientos en la dirección de abducción, en gris oscuro los correspondientes a los movimientos en la dirección de aducción y en gris claro los valores conjuntos para ambas direcciones. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N=7$ individuos.

La duración media de las fases rápidas en la dirección de aducción aumentó ligeramente (9,51%, de $23,31 \pm 1,30$ ms a $25,53 \pm 1,44$ ms; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,05$) tras la privación. Sin embargo, el incremento de la duración no fue significativo para los movimientos en la dirección de abducción (6,38%, de $25,33 \pm 1,93$ ms a $36,94 \pm 1,10$ ms; prueba T para muestras relacionadas, $P > 0,05$) (Figura 32.C). El número medio de fases rápidas por ciclo de estimulación sinusoidal se redujo en un 12,51% (de $24,49 \pm 2,97$ movimientos/ciclo a $21,43 \pm 2,21$ movimientos/ciclo; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$) (Figura 32.D). Las magnitudes de los cambios en la amplitud, la velocidad pico y la duración de las fases rápidas fueron similares para los movimientos de abducción y de aducción (prueba T para muestras relacionadas, $P > 0,05$).

Dada la similitud entre las fases rápidas en las direcciones de abducción y de aducción, los movimientos oculares en ambas direcciones se agruparon para estudiar los efectos de la privación por el método de la plataforma sobre las relaciones entre la amplitud y la velocidad pico. Para cada animal se midieron las amplitudes y las velocidades pico en 80 fases rápidas en la dirección de abducción y en 80 en la de aducción, tanto en la situación inicial como tras el protocolo de privación (N=7 individuos). Mediante la herramienta *aoctool* de MATLAB se realizó un análisis de la covarianza (ANCOVA) de ambas variables, que mostró que las pendientes de las rectas de ajuste fueron de $50,14$ °/s/° tanto en la situación inicial como post-privación y que ambas pendientes no difirieron estadísticamente ($F=0,00$, $P > 0,05$) (Figura 33).

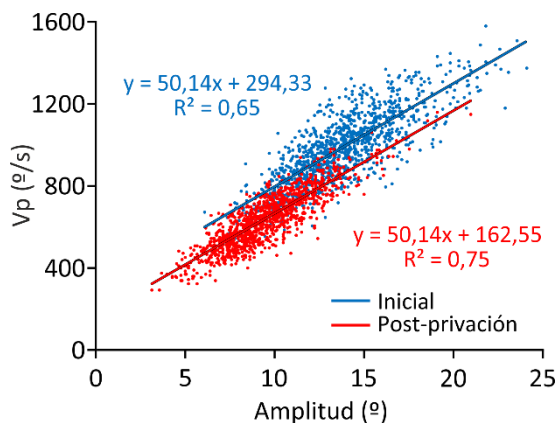


Figura 33. Efectos de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma sobre la relación amplitud-velocidad pico de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular. Azul, situación inicial; rojo, situación tras la privación. No se hallaron diferencias significativas entre las pendientes de las rectas inicial y post-privación (prueba ANCOVA, $F=0,00$, $P > 0,05$). N=7 individuos (80 movimientos oculares en cada dirección por individuo).

4.4.2.2 Cambios inducidos por la privación por administración de desipramina

La privación por desipramina indujo una disminución significativa de las amplitudes (25,87%, de $12,92 \pm 1,28^\circ$ a $9,58 \pm 0,93^\circ$) (Figura 34.A) y de las velocidades pico (25,77%, de $884,77 \pm 77,60^\circ/\text{s}$ a $656,80 \pm 65,33^\circ/\text{s}$) (Figura 34.B) de las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular respecto a los valores iniciales (prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$). Esta reducción fue de magnitud similar entre los movimientos en las direcciones de abducción y de aducción (prueba T para muestras relacionadas, $P > 0,05$). A los 4 días de recuperación post-tratamiento, las amplitudes y las velocidades pico de las fases rápidas continuaron siendo inferiores al valor inicial en un 17,83% (de $12,92 \pm 1,28^\circ$ a $10,62 \pm 0,74^\circ$) (Figura 34.A) y en un 13,95% (de $884,77 \pm 77,60^\circ/\text{s}$ a $761,30 \pm 76,14^\circ/\text{s}$) (Figura 34.B), respectivamente. A los 7 días post-tratamiento, las fases rápidas no mostraron diferencias en ningún parámetro respecto a la situación inicial. No se hallaron cambios significativos en las duraciones de las fases rápidas (Figura 34.C) ni en el número de fases rápidas por ciclo de estimulación (Figura 34.D), cuyos valores fueron de $26,29 \pm 1,54$ ms y de $23,57 \pm 2,36$ movimientos/ciclo en la situación inicial, respectivamente.

La realización de un control mediante la administración de solución salina no produjo cambios en ninguna de las propiedades de las fases rápidas (prueba T para muestras relacionadas, $P > 0,05$, $N=4$ individuos).

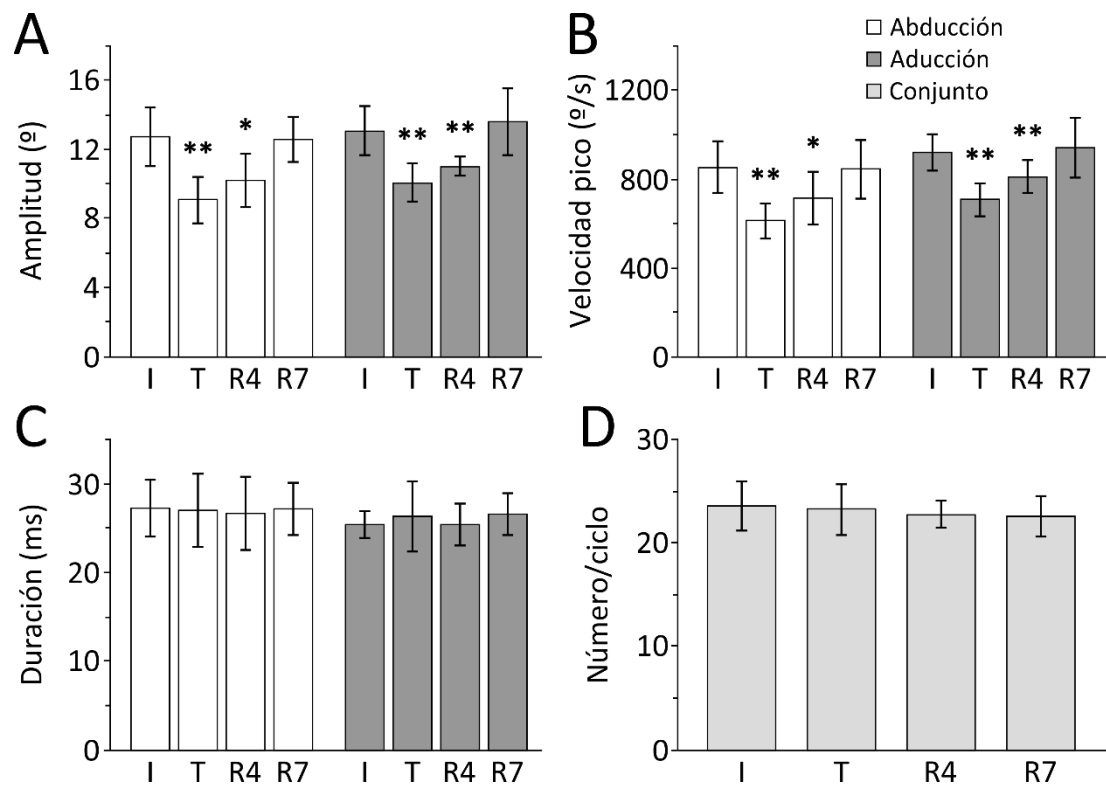


Figura 34. Variaciones en la amplitud (A), velocidad pico (B) y duración (C) de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular, y en el número de fases rápidas por ciclo de estimulación sinusoidal (D), en respuesta a la privación de fase REM de 3 días por administración de desipramina. Las letras en los ejes de abscisas representan: I, valores en la situación inicial; T, valores tras el periodo de tratamiento; R4, valores tras 4 días de recuperación post-tratamiento; R7, valores tras 7 días de recuperación. Se representan en blanco los valores correspondientes a los movimientos en la dirección de abducción, en gris oscuro los correspondientes a los movimientos en la dirección de aducción y en gris claro los valores conjuntos para ambas direcciones. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N = 7$ individuos.

El estudio del efecto de la privación de fase REM por administración de desipramina sobre la relación amplitud-velocidad pico de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular se realizó, al igual que para el grupo de animales privados por el método de la plataforma (ver apartado 4.4.2.1), analizando 80 fases rápidas en cada dirección (de abducción y de aducción) por animal, tanto en la situación inicial como post-tratamiento ($N = 7$ individuos). El análisis de la covarianza mediante *aoctool* (ANCOVA) mostró que no hubo diferencias significativas en las pendientes de las rectas de ajuste entre la situación inicial y tras la privación ($F = 2,94$, $P > 0,05$) (Figura 35).

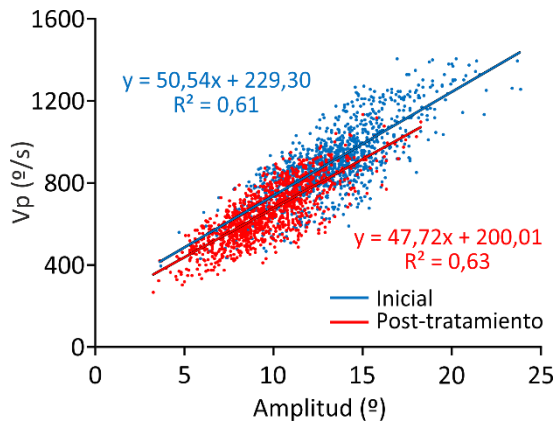


Figura 35. Efectos de la privación de fase REM de 3 días por administración de desipramina sobre la relación amplitud-velocidad pico de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular. Azul, situación inicial; rojo, situación tras el tratamiento con desipramina. No se hallaron diferencias significativas entre las pendientes de las rectas inicial y post-tratamiento (prueba ANCOVA, $F=2,94$, $P>0,05$). $N=7$ individuos (80 movimientos oculares en cada dirección por individuo).

De este modo, la privación de fase REM, tanto por el método de la plataforma como por administración de desipramina, indujo una disminución de la amplitud y la velocidad pico de las fases rápidas, pero no alteró la relación entre ambas variables.

4.5 Efectos de la privación de fase REM sobre los movimientos oculares rápidos durante la fase REM

Para determinar los efectos de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma sobre los movimientos oculares rápidos, se compararon las características de dichos movimientos en la situación inicial, al finalizar el periodo de privación y tras el periodo de recuperación post-privación de 5 días ($N=6$ individuos de la cepa Lister Hooded). Para ello se seleccionaron automáticamente aquellos movimientos que superaron los 25 °/s. En la Figura 36 se muestra un ejemplo representativo de la posición y de la velocidad de rotación del ojo derecho de un animal durante un episodio de fase REM en la situación inicial (Figura 36.A), tras el periodo de privación (Figura 36.B) y tras el periodo de recuperación post-privación (Figura 36.C).

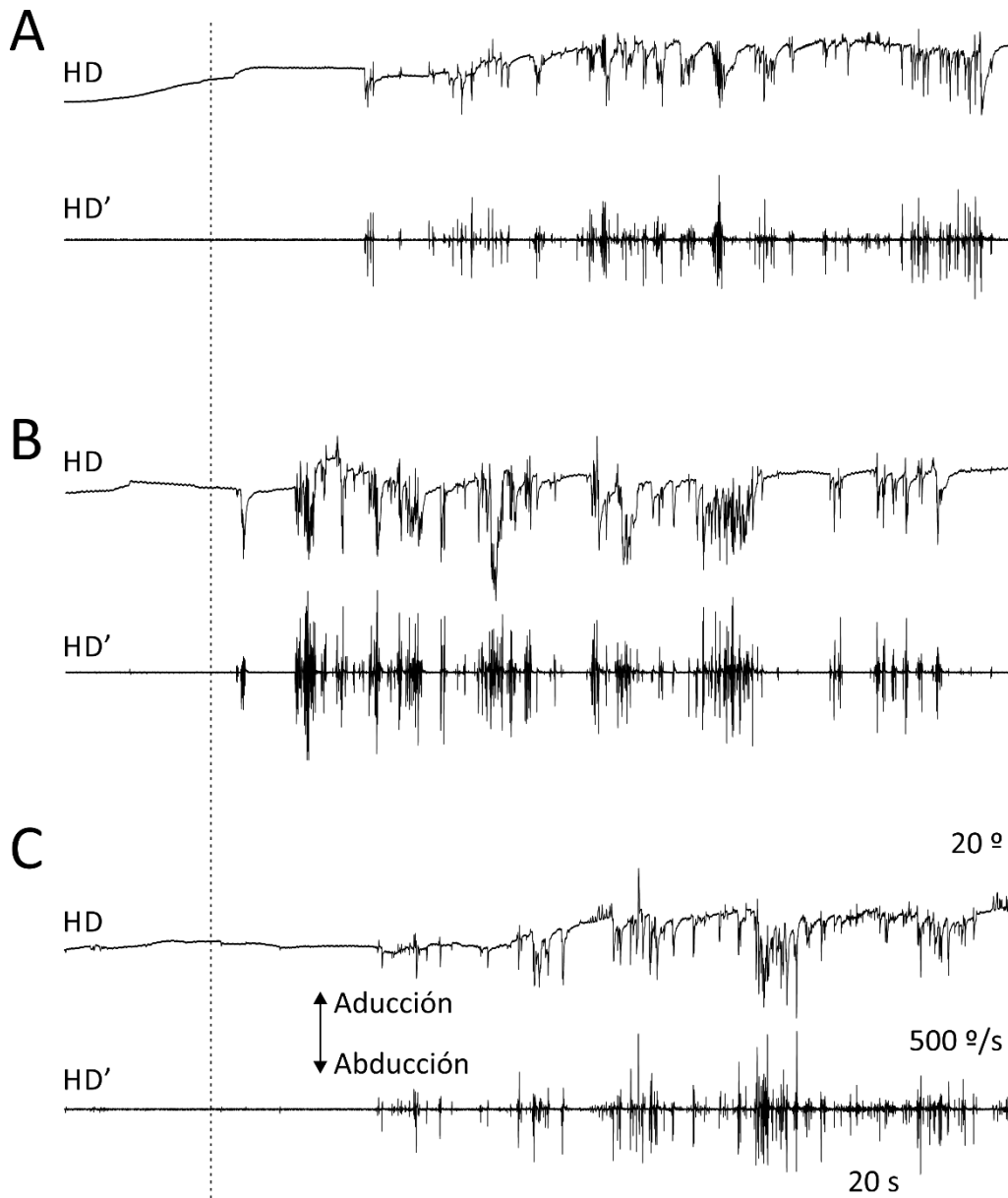


Figura 36. Ejemplo representativo de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM en la situación inicial (A), tras la privación de 4 días por el método de la plataforma (B) y tras un periodo de 5 días de recuperación (C) en un animal. HD, señal de posición del ojo derecho en el plano horizontal; HD', señal de velocidad del ojo derecho en el plano horizontal. La línea vertical discontinua señala el inicio de la transición a fase REM. Las escalas de tiempo, amplitud y velocidad de rotación ocular se mantuvieron constantes entre los apartados A, B y C.

Las distribuciones de las amplitudes, las velocidades pico y las duraciones de los movimientos oculares rápidos no fueron normales, de modo que se utilizaron pruebas U de Mann-Whitney para las comparaciones estadísticas en estos casos.

La privación de fase REM produjo un incremento de la mediana de la amplitud de los movimientos oculares rápidos (Figura 36.B) respecto a la situación inicial (Figura 36.A). Este incremento fue del 125,12% (de 1,67 ° a 3,75 °) en los movimientos en la dirección de abducción y del 119,26% (de 1,50 ° a 3,28 °) en la de aducción (Figura 37.A) ($P < 0,01$). Tras el periodo de recuperación post-privación, la mediana de la amplitud no mostró diferencias significativas con el valor inicial (Figura 37.A).

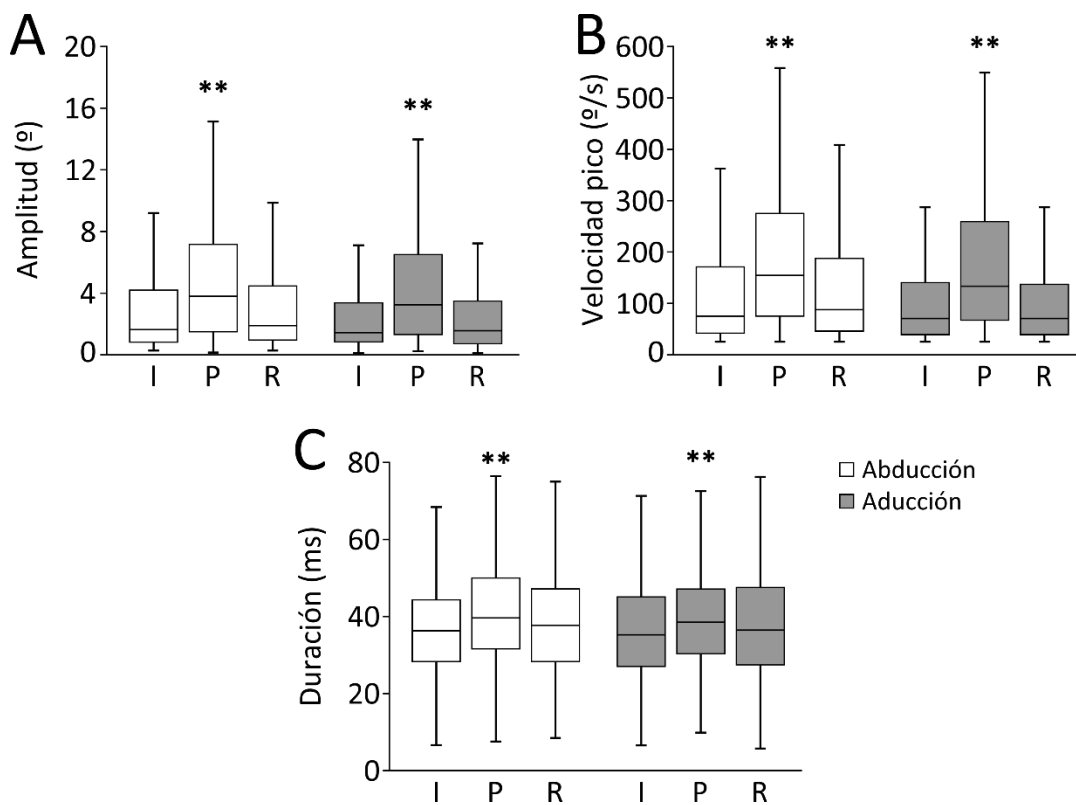


Figura 37. Variaciones en la distribución de las amplitudes (A), velocidades pico (B) y duraciones (C) de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM, en respuesta a la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma. Se muestran la mediana de las distribuciones (línea horizontal en el interior de las cajas), el primer y el tercer cuartil de las distribuciones (márgenes inferior y superior de las cajas, respectivamente) y los valores mínimo y máximo de la distribución (extremos de los bigotes), excluyendo los valores atípicos. Las letras en los ejes de abscisas representan: I, valores en la situación inicial; P, valores tras el periodo de privación; R, valores tras 5 días de recuperación post-privación. Se representan en blanco los valores correspondientes a los movimientos en la dirección de abducción y en gris los correspondientes a los movimientos en la dirección de aducción. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. **, $P < 0,01$ (prueba U de Mann-Whitney). N=6 individuos (100 movimientos por individuo y dirección).

Para determinar si el aumento de la amplitud de los movimientos oculares rápidos post-privación se debió a la aparición de un mayor número de movimientos de elevada amplitud, o bien a un desplazamiento de toda la distribución hacia amplitudes mayores, se compararon los histogramas de frecuencia de las amplitudes de los movimientos en la dirección de abducción y en la de aducción (Figura 38).

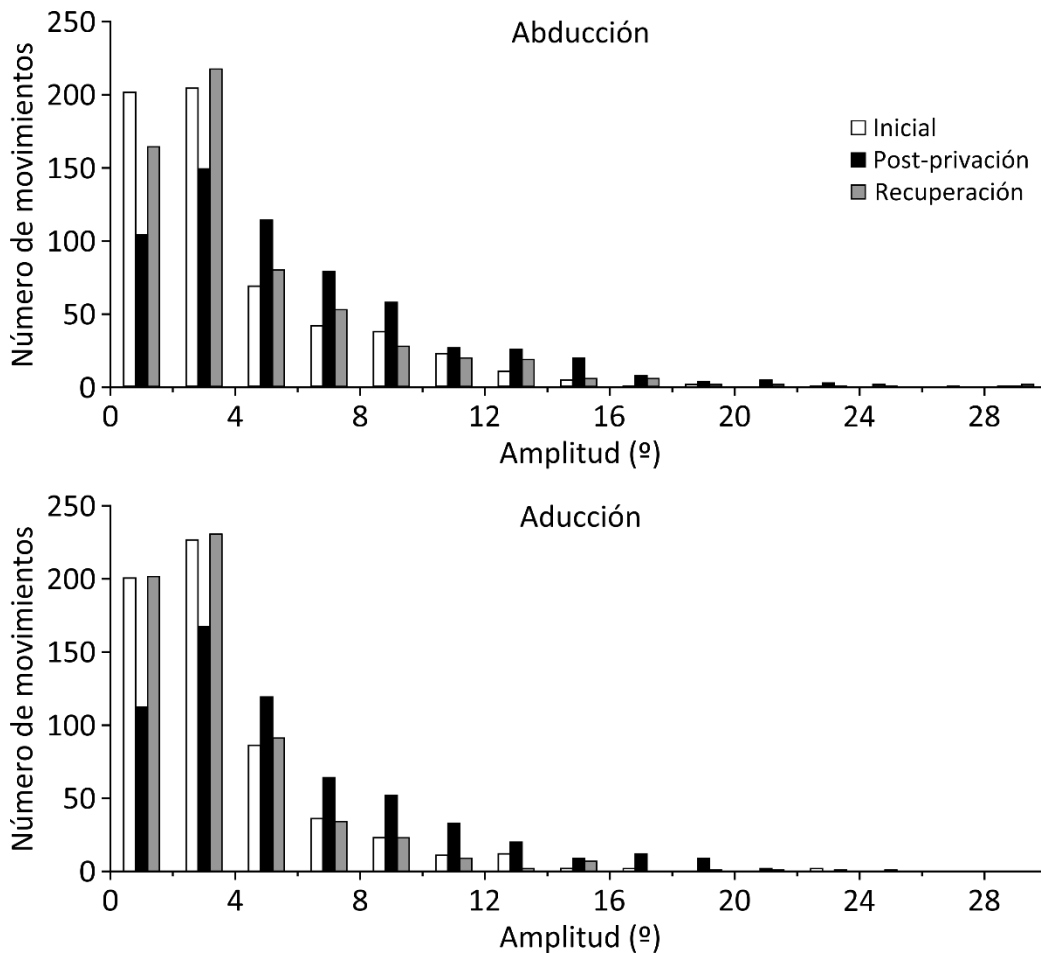


Figura 38. Efectos de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma sobre la distribución de las amplitudes de los movimientos oculares rápidos. Se representa el número de movimientos pertenecientes a cada intervalo de amplitud en la situación inicial (blanco), inmediatamente después de la privación (negro) y tras un periodo de recuperación de 5 días (gris). N=6 individuos (100 movimientos por individuo y dirección). Obsérvese cómo el número de movimientos oculares rápidos de baja amplitud (de 0 a 4 °) se redujo tras la privación, mientras que el número de movimientos mayores de 4 ° aumentó en todos los intervalos de amplitud.

Como se puede apreciar en la Figura 38, el número de movimientos oculares de menor amplitud (de 0 a 4 °) se redujo tras la privación, mientras que el número de movimientos en todas las categorías superiores a 4 ° aumentó, lo que indicó la existencia de un incremento generalizado de la amplitud de los movimientos oculares rápidos tras la privación. La distribución de las amplitudes tras el periodo de 5 días de recuperación post-privación fue más próxima a la de la situación inicial (Figura 38).

La privación de fase REM indujo un incremento de la mediana de la velocidad pico en los movimientos oculares rápidos de abducción (97,51%, de 78,07 °/s a 154,18 °/s) y de aducción (85,29%, de 71,99 °/s a 133,39 °/s) ($P < 0,01$) (Figura 37.B). Tras el periodo de recuperación post-privación, la mediana de la velocidad pico no mostró diferencias significativas con la situación inicial (Figura 37.B).

Del mismo modo que en el caso de las amplitudes, se estudió la distribución de frecuencias de los valores de velocidad pico de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM. Se observó que el número de movimientos oculares de menor velocidad pico (de 0 a 200 °/s) disminuyó tras la privación, mientras que el número de movimientos con velocidad pico superior aumentó (Figura 39). Esto sugirió la existencia de un incremento generalizado de la velocidad pico de los movimientos oculares rápidos tras la privación. La distribución de las amplitudes fue más próxima a la de la situación inicial tras el periodo de recuperación post-privación.

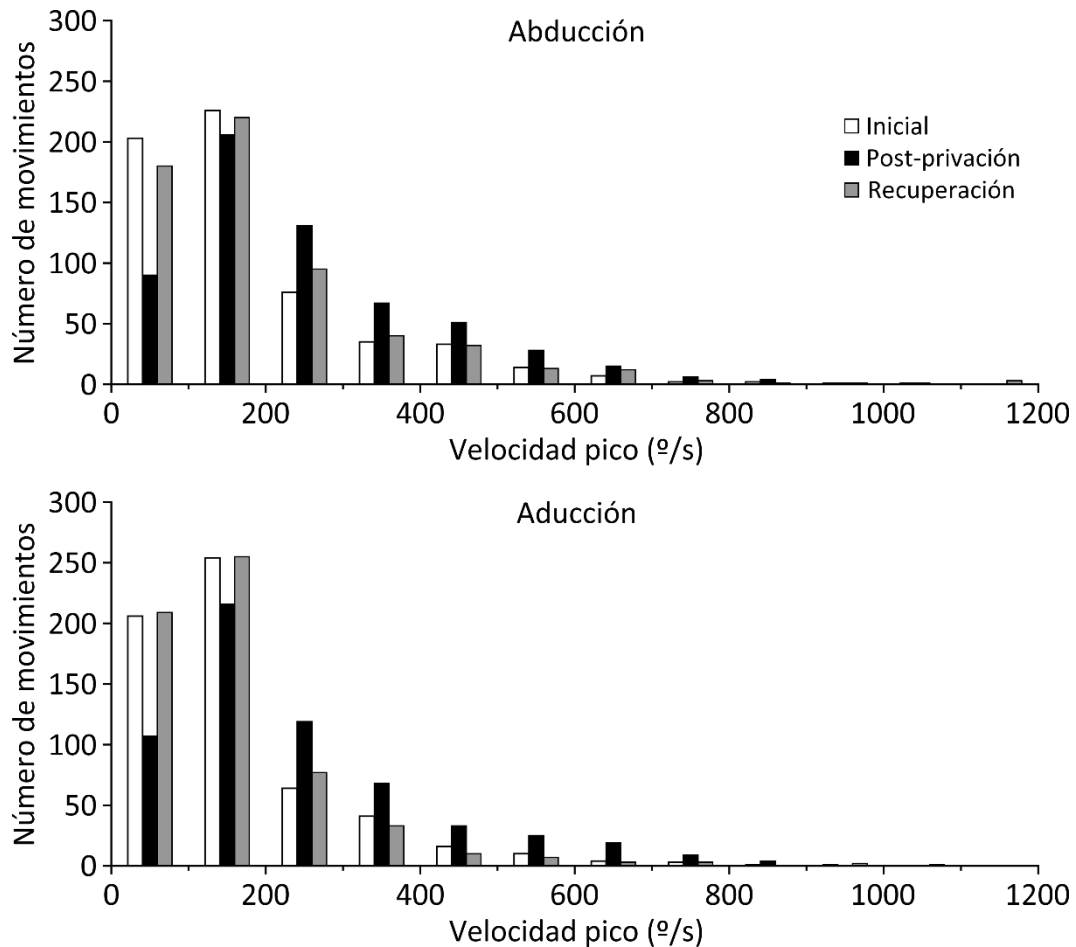


Figura 39. Efectos de la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma sobre la distribución de las velocidades pico de los movimientos oculares rápidos. Se representa el número de movimientos pertenecientes a cada intervalo de velocidades pico en la situación inicial (blanco), inmediatamente después de la privación (negro) y tras un periodo de recuperación de 5 días (gris). N=6 individuos (100 movimientos por individuo y dirección). Obsérvese cómo el número de movimientos de baja velocidad pico (de 0 a 200 °/s) se redujo tras la privación, mientras que el número de movimientos con velocidad pico superior a 200 °/s aumentó en todos los intervalos de velocidad.

La mediana de la duración de los movimientos oculares rápidos experimentó un incremento leve, aunque significativo, tras la privación de fase REM, que fue del 8,51% (de 36,45 ms a 39,55 ms) en los movimientos de abducción y del 8,36% (de 35,30 ms a 38,25 ms) en los movimientos de aducción (Figura 37.C). Después del periodo de recuperación post-privación, la mediana de la duración no mostró diferencias respecto a la situación inicial (Figura 37.C).

Tras la privación de fase REM se observó una disminución del 71,91% (de 11,85 s a 3,33 s; prueba T para muestras relacionadas, $P < 0,01$) en la latencia media de aparición del primer movimiento ocular rápido desde el inicio de la transición a fase REM (Figura 40.A). La latencia de aparición del primer movimiento ocular no mostró diferencias con el valor inicial después del periodo de recuperación post-privación (Figura 40.A).

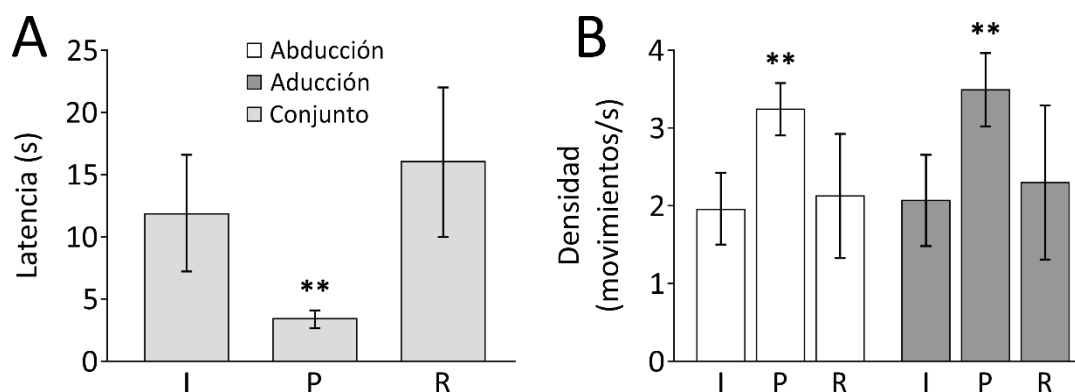


Figura 40. Variaciones en la latencia de aparición del primer movimiento ocular rápido (A) y en la densidad de movimientos oculares (B) durante la fase REM, en respuesta a la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma. Las letras en los ejes de abscisas representan: I, valores en la situación inicial; P, valores tras el periodo de privación; R, valores tras 5 días de recuperación post-privación. Se representan en blanco los valores correspondientes a los movimientos en la dirección de abducción, en gris oscuro los correspondientes a los movimientos en la dirección de aducción y en gris claro los valores conjuntos para ambas direcciones. Las barras de error representan las desviaciones típicas. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la situación inicial. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (prueba T para muestras relacionadas). $N=6$ individuos.

La privación indujo un aumento de la densidad de movimientos oculares rápidos, es decir, un incremento en el número de movimientos por unidad de tiempo (Figura 40.B). Para cuantificar este incremento se contabilizaron los movimientos oculares en cada episodio de fase REM. Este número se dividió por el tiempo transcurrido entre el primer y el último movimiento ocular rápido del episodio correspondiente. El aumento de la densidad de movimientos oculares rápidos fue del 65,80% (de $1,95 \pm 0,46$ movimientos/s a $3,23 \pm 0,48$ movimientos/s) para los movimientos en la dirección de abducción y del 69,21% (de $2,06 \pm 0,59$ movimientos/s a $3,49 \pm 0,48$ movimientos/s) para los movimientos de aducción (Figura 40.B) (prueba T para muestras relacionadas,

$P < 0,01$). Tras el periodo de recuperación post-privación, la densidad de movimientos no mostró diferencias significativas respecto a la situación inicial (Figura 40.B).

Finalmente, para determinar si la privación de 4 días por el método de la plataforma alteró la relación entre la amplitud y la velocidad pico de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM, se analizaron 100 movimientos en la dirección de abducción y 100 en la de aducción en cada animal, tanto en la situación inicial como tras el periodo de privación ($N=6$ individuos). La comparación de las pendientes de ajuste (ANCOVA) de la relación amplitud-velocidad pico antes y después de la privación mostró una disminución leve, aunque significativa, de las pendientes tras la privación, tanto en el caso de los movimientos en la dirección de abducción ($-9,13\%$, $F=22,91$, $P < 0,01$) como en la de aducción ($-4,91\%$, $F=4,68$, $P < 0,05$) (Figura 41).

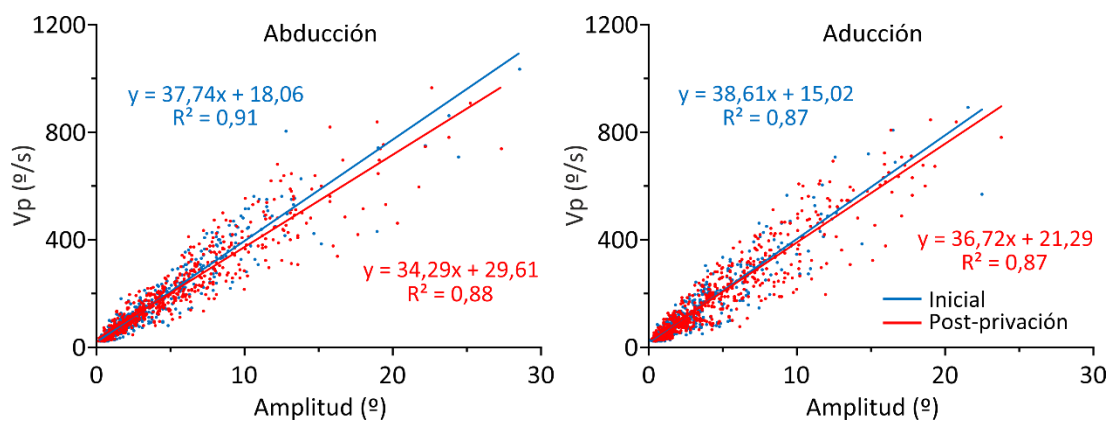


Figura 41. Efectos de la privación de fase REM durante 4 días por el método de la plataforma sobre la relación amplitud-velocidad pico de los movimientos oculares rápidos. Azul, situación inicial; rojo, situación post-privación. Vp, velocidad pico. Hubo un leve descenso de la pendiente de la recta post-privación respecto a la situación inicial para los movimientos en ambas direcciones (prueba ANCOVA. Abducción: $F=22,91$, $P < 0,01$; Aducción: $F=4,68$, $P < 0,05$). $N=6$ individuos (100 movimientos oculares en cada dirección por individuo).

De este modo, la privación de fase REM de 4 días por el método de la plataforma indujo un incremento de la densidad, la amplitud, la velocidad pico y la duración de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM, y el primer movimiento ocular rápido tendió a aparecer con una latencia menor desde el inicio de la transición a fase REM tras la privación.

5 DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo del índice ponderado de HFO para la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño

En la presente Tesis Doctoral se desarrolló el índice ponderado de HFO. Este índice permitió la identificación de la vigilia y las fases NREM y REM del sueño en la rata mediante el análisis de las actividades de alta frecuencia (110 a 300 Hz) del EEG. Para evaluar su eficacia se comparó su rendimiento con el de un método convencional de análisis del ciclo vigilia-sueño.

Una correcta discriminación entre los estados de alerta es fundamental para la reconstrucción precisa del ciclo vigilia-sueño. Dado el gran número de cambios a nivel central y periférico que conllevan las transiciones entre estados, normalmente es necesario el estudio de múltiples variables fisiológicas para garantizar la fiabilidad de dicha identificación. Sin embargo, la complejidad de los análisis aumenta de forma proporcional a la cantidad de variables que se toman en consideración simultáneamente, y esto tiene un impacto negativo sobre la eficacia del análisis manual del ciclo, lo que es especialmente cierto en estudios que requieren el análisis de gran cantidad de registros. Adicionalmente, la complejidad de la cirugía para la preparación de los animales para el registro crece al incorporarse variables como el EMG o los movimientos oculares. Por tanto, un método de análisis que implique una cirugía y un análisis sencillos constituiría una valiosa herramienta para el estudio del sueño. El índice ponderado de HFO cumple estos requisitos, dado que es de fácil interpretación y para su obtención se requiere únicamente la implantación de electrodos epidurales sobre la corteza cerebral de la rata.

5.1.1 Fundamentos, obtención e interpretación del índice ponderado de HFO

El índice se fundamenta en el estudio de dos componentes de alta frecuencia del espectro del EEG: la HFO, que abarca desde 110 hasta 160 Hz, y la contaminación derivada de la actividad muscular, que ocupa un espectro de frecuencias mucho más amplio y se propaga hacia la corteza cerebral por conducción de volumen. Ambas bandas muestran un comportamiento muy distinto en función del estado del ciclo

vigilia-sueño. La HFO se registra en la corteza de la rata durante la vigilia y la fase REM, y está ausente durante la fase NREM (Scheffer-Teixeira y Tort, 2017). La aparición de la HFO delimita con exactitud el inicio de la transición a fase REM (Sánchez-López y col., 2018), lo que la convierte en un excelente marcador para la discriminación entre estados. El EEG de la vigilia presenta, además de la HFO, una contaminación procedente de la actividad muscular que puede abarcar desde los 20 hasta los 600 Hz (Muthukumaraswamy, 2013). La contaminación por la actividad muscular disminuye en gran medida durante las fases NREM y REM como consecuencia de la reducción o supresión del tono muscular, exceptuando la aparición de brotes puntuales y breves de actividad muscular fásica. Teniendo en cuenta que la HFO coexiste con la contaminación del EEG por la actividad muscular durante la vigilia, que ambas están ausentes durante la fase NREM y que solo la HFO ocurre de forma consistente durante la fase REM, el índice ponderado de HFO se diseñó para cuantificar la relación entre las potencias de ambas bandas a lo largo del tiempo.

El índice ponderado de HFO se calculó como el cociente entre la amplitud de la señal de EEG filtrada entre 110 y 200 Hz y la amplitud de la señal filtrada entre 110 y 300 Hz. Los valores cercanos a 1 indican una HFO de gran amplitud frente a una escasa contaminación por la actividad muscular, mientras que los valores bajos indican lo opuesto. De este modo, la vigilia se caracterizó por presentar un índice de valor medio reducido debido a la gran amplitud de la contaminación por la actividad muscular. El valor instantáneo del índice fue muy variable a lo largo de los episodios de vigilia debido a que la contaminación por la actividad muscular, a pesar de ser de elevada amplitud en términos generales, fluctuó en función de la postura y del nivel de actividad del individuo. El valor medio del índice aumentó durante la fase NREM respecto a la vigilia, lo que se debió a la drástica disminución de la contaminación por la actividad muscular que conllevaron la desaparición de la actividad fásica de la musculatura esquelética y la reducción del tono muscular. Durante la fase REM, el índice alcanzó su valor máximo debido a la aparición de una HFO de elevada amplitud y al desarrollo de la atonía muscular.

5.1.2 Evaluación de la concordancia entre el índice ponderado de HFO y el método de análisis convencional

Para evaluar la eficacia del índice ponderado de HFO como método autónomo para la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño, se comprobó la similitud de los polisomnogramas producidos por este método con los que se obtuvieron mediante un análisis convencional basado en el estudio de las bandas delta, theta y sigma del EEG y de la actividad del EMG. Se encontró que la coincidencia entre los polisomnogramas producidos por el índice ponderado de HFO y el método de análisis convencional fue del 90,29%, lo que indicó una elevada similitud.

El porcentaje de coincidencia, a pesar de ofrecer una estimación orientativa de la similitud entre dos métodos de análisis, puede no representar de forma precisa la concordancia real entre ambos. Esto se debe a que, incluso si los métodos de análisis asignasen los estados de forma completamente aleatoria, se esperaría un cierto porcentaje de coincidencia por efecto del azar, que no reflejaría similitud (Fleiss y col., 2013). Para eliminar la posibilidad de que parte de la similitud observada entre el índice ponderado de HFO y el método de análisis convencional pudiera deberse al efecto del azar en la identificación, se determinó la concordancia entre ambos mediante el coeficiente kappa de Cohen. Este coeficiente representa la razón entre la proporción de coincidencias observadas y la proporción máxima de coincidencias posible, una vez sustraída la proporción de coincidencias esperadas por azar a ambos valores. El coeficiente kappa para el conjunto de los polisomnogramas fue de 0,82.

Landis y Koch (1977) crearon una escala nominal orientativa para la interpretación de los valores de kappa en función la bondad de la concordancia (Tabla 5).

<u>Valor de kappa</u>	<u>Bondad de la concordancia</u>
<0,00	Pobre
0,00 a 0,20	Ligera
0,21 a 0,40	Razonable
0,41 a 0,60	Moderada
0,61 a 0,80	Sustancial
0,81 a 1,00	Casi perfecta

Tabla 5. Escala de bondad de concordancia propuesta por Landis y Koch (1977). Traducida y adaptada.

Fleiss y colaboradores (2013) propusieron una escala orientativa simplificada en la que los valores de kappa inferiores a 0,40 suponen una concordancia “pobre”, los valores entre 0,40 y 0,75 representan una concordancia “razonable o buena” y los valores superiores a 0,75 reflejan una concordancia “excelente”. El valor de kappa de 0,82 que se obtuvo al comparar los polisomnogramas generados por ambos métodos de análisis, por tanto, reflejó una concordancia “casi perfecta” o “excelente”, confirmando que el uso del índice ponderado de HFO es suficiente para una correcta identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño en la rata. Dada la simplicidad de la discriminación de los estados mediante el índice, este método constituiría una alternativa viable que reduciría la carga de trabajo en estudios que impliquen el análisis manual de gran cantidad de registros del ciclo vigilia-sueño, en los que el estudio y la integración de la información ofrecida de múltiples variables podrían resultar agotadores a largo plazo. Por añadidura, dicha sencillez y la baja severidad de la cirugía de instrumentación para el registro facilitarían a investigadores noveles la iniciación a los estudios del ciclo vigilia-sueño.

Aunque el valor global de kappa fue elevado, los valores de kappa por individuo mostraron cierta variabilidad y en algunos casos fueron inferiores a lo que hubiese cabido esperar dada la similitud entre los polisomnogramas obtenidos por ambos métodos. Esto pudo deberse a que el valor de kappa está condicionado por el balance entre la proporción de casos pertenecientes a cada categoría en la matriz de confusión

(Cohen, 1960). Si los casos no están distribuidos equitativamente entre las diferentes categorías (en este caso, vigilia, fase NREM y fase REM), el valor de kappa será menor que si así fuese, a no ser que la concordancia sea perfecta (Cohen, 1960; Feinstein y Cicchetti, 1990). Al ser mucho más abundantes la vigilia y la fase NREM que la fase REM durante el ciclo vigilia-sueño en condiciones normales, el desbalance entre las tres categorías es inevitable. También debe tomarse en consideración que el método de análisis convencional, utilizado como referencia para la evaluación del índice ponderado de HFO, ofrece una reconstrucción adecuada pero no perfecta de la realidad debido a la misma naturaleza continua del ciclo vigilia-sueño. La transición entre estados de alerta es progresiva y el establecimiento de límites entre ellos, por tanto, conlleva subjetividad. La ocurrencia simultánea de actividades propias de diferentes estados de alerta durante las transiciones y la ocasional aparición de combinaciones inusuales de variables electrofisiológicas también pueden dificultar la identificación de los estados (Mileva-Seitz y col., 2005). Dado que la evaluación de los nuevos métodos se realiza estudiando la homología de sus resultados con los obtenidos mediante métodos convencionales, y no por su similitud con la realidad, la máxima concordancia potencial está limitada por las imperfecciones e imprecisiones cometidas por el método convencional de referencia. Así, posibles periodos identificados correctamente mediante el índice ponderado de HFO e incorrectamente por el método convencional serían considerados como incongruencias y reducirían el valor de kappa.

5.1.3 Ventajas y limitaciones del índice ponderado de HFO

Una de las ventajas que ofreció el índice ponderado de HFO fue su autonomía, ya que no requirió una calibración previa por el método convencional para el establecimiento de los valores umbrales para cada estado del ciclo vigilia-sueño. Dado que el índice mostró un comportamiento y un valor promedio característicos en cada estado, la identificación de los estados fue posible sin necesidad de recurrir a otras referencias. Los valores medios del índice difirieron significativamente entre los diferentes estados y sus desviaciones típicas fueron pequeñas, lo que denota que son marcadamente constantes entre individuos.

La simplicidad de la interpretación del índice y la constancia de sus valores medios por estado lo convierten en un buen candidato para la automatización del análisis del ciclo vigilia-sueño, dado que esta requeriría únicamente el diseño de un algoritmo que asignase un estado de alerta en función del valor del índice y la programación de valores umbrales para cada estado. Los métodos de análisis automatizados se clasifican en semiautomáticos y en automáticos en función de si precisan de la realización de calibraciones o análisis manuales de ejemplo por parte del investigador (Robert y col., 1999). Los métodos semiautomáticos, que son los más frecuentes, requieren que el investigador establezca umbrales o valores de referencia para las diferentes variables en cada nuevo individuo (Benington y col., 1994a; Karasinski y col., 1994; Louis y col., 2004; Neckelmann y col., 1994; Rempe y col., 2015; Ruigt y col., 1989; Van Gelder y col., 1991; van Luijtelaar y Coenen, 1984). Los automáticos, por el contrario, no precisan de calibraciones individualizadas, por lo que son independientes de las observaciones del investigador (Clark y Radulovacki, 1988; Stephenson y col., 2009). Dado que los valores medios del índice fueron muy constantes entre individuos, la realización de calibraciones individualizadas no sería precisa, por lo que la automatización del análisis, potencialmente, podría ser completa.

Aunque constituye una alternativa viable para la identificación de los estados de alerta, el índice ponderado de HFO presenta algunas limitaciones. La más importante es que no permite detectar el final de la transición a fase REM y el inicio de la fase REM consolidada. Mientras que la aparición de la HFO, unida al bajo tono muscular propio de la fase NREM, hace reconocible el inicio de la transición por la elevación del valor del índice, el final de la transición pasa desapercibido. Sin embargo, de ser precisa la delimitación del periodo de transición, el estudio del desarrollo en amplitud de la HFO (110-160 Hz) ofrecería una estimación fiable de su inicio y su final (Sánchez-López y col., 2018).

Una segunda limitación es que el índice ponderado de HFO depende de la actividad muscular para la identificación de las fases del ciclo vigilia-sueño, por lo que los episodios de sueño que presenten una actividad muscular inusualmente elevada podrían confundirse con vigilias con baja actividad muscular. En el presente trabajo, esto pudo contribuir a que las discrepancias en las que se diagnosticó vigilia mediante un

método y fase NREM mediante el otro fuesen más frecuentes que los demás tipos de error.

Finalmente, en el presente trabajo se observaron casos en los que el sueño estuvo interrumpido por transiciones breves de pocos segundos de duración. A menudo se trató de transiciones reales, cuya existencia fue confirmada por el método de análisis convencional. Sin embargo, en algunas ocasiones, el estudio de los registros mediante el análisis convencional no corroboró que se tratase de transiciones, ya que no se acompañaron de los cambios usuales en el resto de las variables electrofisiológicas. Estos casos se debieron a brotes aislados y breves de actividad motora que generaron una contaminación por actividad muscular particularmente intensa en el EEG, alterando el valor del índice.

5.2 Efectos de la privación de fase REM sobre el ciclo vigilia-sueño

Se conoce que la pérdida de fase REM da lugar a un fenómeno de rebote de sueño de carácter homeostático, cuya magnitud es directamente proporcional a la deuda de sueño (Franken, 2002). De forma paralela a la ocurrencia del rebote, los síntomas físicos, metabólicos y endocrinos de la privación de sueño revierten progresivamente (Rechtschaffen y col., 1999). En la presente Tesis Doctoral se han descrito diversos cambios en las actividades electroencefalográfica y oculomotora tras la privación de fase REM y cabría esperar, por tanto, que la remisión de las alteraciones observadas guardase una relación temporal con la cinética del rebote. Para comprobarlo, se estudió detalladamente la modificación de la arquitectura del ciclo vigilia-sueño durante el periodo posterior a la privación. De este modo, fue posible determinar la cinética temporal del rebote y establecer las relaciones entre esta y la dinámica de la modificación del EEG y de los movimientos oculares. El análisis del ciclo vigilia-sueño a lo largo del periodo experimental se llevó a cabo estudiando simultáneamente el índice ponderado de HFO, la actividad del EMG y la actividad del EEG en las bandas delta, theta, sigma y HFO. La utilización simultánea de estas variables, unida a la sencillez de la interpretación del índice, permitió una identificación fiable y rápida de los estados de vigilia, fase NREM, transiciones a fase REM, fase REM y transiciones abortadas.

La privación de fase REM se llevó a cabo utilizando dos métodos distintos: la técnica de la plataforma sobre agua y la administración de desipramina. Se conoce que la técnica de la plataforma produce una marcada reducción de la cantidad de fase REM e incluso su completa desaparición (Machado y col., 2004), lo que la convierte en un medio muy eficaz para la privación de esta fase del sueño. No obstante, su especificidad no es absoluta y existen evidencias de que también produce una reducción de la cantidad de fase NREM (Grahnstedt y Ursin, 1985; Machado y col., 2004), así como una modificación de sus características (Endo y col., 1997), lo que podría hacer que los efectos de la carencia de fase NREM se confundiesen con los de la privación de fase REM. Adicionalmente, no existen controles que repliquen fielmente las condiciones de la privación por el método de la plataforma sin afectar al ciclo vigilia-sueño (Mendelson y col., 1974), por lo que resulta difícil descartar la posible influencia de factores como la privación parcial de fase NREM, la inmovilidad forzada o el estrés en los resultados. El control empleado con mayor frecuencia, que implica el uso de plataformas de diámetro grande para permitir al animal desarrollar fase REM, también provoca alteraciones del ciclo vigilia-sueño (Machado y col., 2004). Por estos motivos, en la presente Tesis Doctoral se realizó una privación de naturaleza farmacológica como prueba para descartar la implicación de dichos factores en los resultados experimentales, ya que no implica la restricción del movimiento de los individuos y admite la realización de controles apropiados mediante la administración de solución salina, que permite determinar los efectos de la manipulación de los individuos.

Para la privación farmacológica se escogió utilizar fármacos antidepresivos dado que muchos de ellos inhiben en gran medida la ocurrencia de fase REM (McCarthy y col., 2016; Palagini y col., 2013; Wilson y Argyropoulos, 2005). Diversos antidepresivos tricíclicos inhiben la fase REM marcadamente y presentan, simultáneamente, un efecto sedante que en ocasiones se ha atribuido a su antagonismo con los receptores H₁ de histamina (Wilson y Argyropoulos, 2005), cuya inhibición se asocia con un incremento de la abundancia de la fase NREM (Haas y Panula, 2003). Experimentos realizados en humanos (Kupfer y col., 1991) y en ratas (Khazan y Brown, 1970) han demostrado que la desipramina, un tricíclico que reduce la recaptación de noradrenalina y, en menor medida, la de serotonina (Wilson y Argyropoulos, 2005), ejerce una marcada inhibición

de la fase REM y un efecto sedante menos pronunciado que otros antidepresivos de la misma familia (Mayers y Baldwin, 2005).

5.2.1 Eficacia y especificidad de la desipramina como medio para la privación de fase REM

La eficacia de la desipramina como medio para la privación selectiva de fase REM se evaluó midiendo la magnitud y la cinética temporal de la inhibición de esta fase por una única dosis del fármaco. Se obtuvo que este tratamiento suprimió la ocurrencia de fase REM y de transiciones a fase REM en la rata durante un periodo de $20,69 \pm 2,66$ h, lo que confirmó su efectividad. Las transiciones abortadas no fueron totalmente suprimidas durante este periodo, aunque el tiempo en este estado se redujo considerablemente. Los individuos no mostraron signos de estrés ni alteraciones evidentes del comportamiento.

Tras verificar la eficacia de la privación por desipramina, se planteó la realización de una privación farmacológica de mayor duración. Se sabe que la eficacia de la inhibición de la fase REM depende de la concentración de desipramina en el encéfalo (Baumann y col., 1983) y que las dosis superiores a 10 mg/kg elevan la concentración cortical de desipramina en mayor medida que dosis más bajas (Argenti y D'Mello, 1994). Ya que no se han reportado efectos nocivos para la administración de dosis de 15 (Argenti y D'Mello, 1994) y de 20 mg/kg (Kozisek y col., 2007) cada 12 h durante varios días en ratas adultas, se decidió administrar 6 dosis de 15 mg/kg de desipramina a lo largo de 3 días en el presente trabajo. Con ello se pretendió mantener su concentración cerebral lo bastante elevada como para producir una privación de fase REM completa y prolongada. Se comprobó que este protocolo redujo el tiempo por día en fase REM y en transición a fase REM en un 97,78% y en un 98,60%, respectivamente, durante el periodo de tratamiento. Esto demostró que la administración periódica del fármaco fue capaz de producir una inhibición duradera y casi completa de la fase REM. La reducción del tiempo por día en transición abortada fue menos acusada (56,88%), lo que sugirió que la desipramina bloquea la consolidación de la fase REM y desfavorece, pero no impide, la aparición de episodios de transición.

Un efecto adicional de la administración de múltiples dosis del antidepresivo fue el incremento del tiempo en fase NREM, que fue significativo durante los 2 primeros días del periodo de tratamiento. Esto concuerda con el efecto sedante que se atribuye a la desipramina y a otros antidepresivos tricíclicos (Wilson y Argyropoulos, 2005). Dado que no se produjo una reducción del tiempo en fase NREM como la que se atribuye al método de la plataforma (Grahstedt y Ursin, 1985; Machado y col., 2004), las modificaciones observadas en el EEG y en el reflejo vestíbulo-ocular en el presente trabajo, que fueron comunes a ambos métodos de privación, no pueden estar relacionadas con una carencia de fase NREM en el caso de la privación por el método de la plataforma. Adicionalmente, la ausencia de efectos de la manipulación y de las inyecciones intraperitoneales de solución salina sobre el ciclo vigilia-sueño, la actividad electroencefalográfica y el reflejo vestíbulo-ocular excluyeron al estrés como un potencial responsable de los cambios derivados de la privación por desipramina.

5.2.2 Modificación y homeostasis del ciclo vigilia-sueño tras la privación de fase REM

5.2.2.1 Cinética temporal del rebote

Las privaciones por el método de la plataforma y por administración de desipramina indujeron la aparición de un rebote en el que el tiempo en fase REM y en transiciones, abortadas o no, se elevó. La cinética temporal de este rebote, sin embargo, difirió entre ambos métodos de privación.

El rebote generado por la privación mediante la técnica de la plataforma ocurrió de forma inmediata, tan pronto como la restricción a la entrada en fase REM desapareció por el traslado de los individuos a la cámara de aislamiento. La duración del rebote fue semejante tras la privación de 4 y de 6 días: en ambos casos, la cantidad de fase REM se equiparó con el valor inicial durante el cuarto día tras el fin del periodo de privación. Esto es coherente con las observaciones de Morden y colaboradores (1967), que apreciaron que el incremento de la duración de la privación de 3 a 6 días produjo escasos cambios en el rebote subsiguiente. El hecho de que la recuperación tras una privación de mayor duración ocurriese sin una acentuación del rebote les llevó a sugerir

que la diferencia podría radicar en un incremento de la “intensidad” de la fase REM durante este periodo (Morden y col., 1967). Sin embargo, en el presente trabajo se apreció que el aumento del tiempo en fase REM y en transiciones a fase REM fue más acusado tras la privación de 6 días, lo que implica que el incremento de la presión de fase REM generada por la privación hizo que el rebote, aunque no más duradero, fuese de mayor magnitud. Adicionalmente, dado que las transiciones a fase REM y las abortadas comparten una serie de características con la fase REM (Sánchez-López y col., 2018) y que a menudo se ignoran al clasificarse como fase NREM en los estudios sobre el sueño (Benington y col., 1994a), existe la posibilidad de que su incremento contribuya a mejorar la eficiencia de la recuperación durante el periodo de rebote y que esto haya pasado desapercibido en otros trabajos.

El efecto de la privación de fase REM de 3 días por desipramina sobre el ciclo vigilia-sueño mostró diferencias con el de la privación por el método de la plataforma. Tras el fin del tratamiento con desipramina se produjo un periodo en el que el tiempo en fase REM y en transiciones, abortadas o no, fue inferior a los valores iniciales. El rebote tuvo lugar de forma retrasada en el tiempo. La escasez de fase REM tras el periodo de tratamiento con desipramina y la aparición tardía del rebote se debieron, probablemente, a la persistencia de la desipramina en el organismo, ya que este fármaco produce un bloqueo total de la aparición de fase REM cuando alcanza un umbral crítico de concentración en el encéfalo y una inhibición parcial cuando su concentración desciende bajo dicho umbral (Baumann y col., 1983). El remanente de desipramina en el encéfalo en concentraciones sub-umbrales pudo retrasar la aparición del rebote de fase REM a pesar de la elevada presión homeostática. Existen estudios en humanos que apoyan la posibilidad de que la presión de fase REM pueda verse enmascarada –y su compensación homeostática, impedida– por acción farmacológica. Unos pacientes tratados durante meses con fenelzina, un antidepresivo inhibidor de la monoaminoxidasa, experimentaron una supresión total de la fase REM durante un periodo de 3 a 6 meses, tras el que volvieron a desarrollar episodios de fase REM de forma espontánea sin que se observase un rebote (Landolt y de Boer, 2001). La posterior reducción de la dosis del fármaco, sin embargo, se acompañó de un marcado rebote de fase REM (Landolt y de Boer, 2001), lo que sugiere que, a pesar de que la aparición de

episodios de fase REM fue posible al cabo de varios meses de tratamiento, la inhibición ejercida por el fármaco impidió el desarrollo del rebote. Esto pone de manifiesto la existencia de una presión homeostática acumulada, enmascarada, en este caso, por la fenelzina.

El retraso del rebote ofrece información relevante a la hora de establecer un vínculo entre la fase REM y las modificaciones en la actividad electroencefalográfica y el reflejo vestíbulo-ocular que se observaron en la rata en el presente trabajo. Dement y colaboradores (1966) demostraron, en humanos, la necesidad de incrementar la cantidad de fase REM para compensar una carencia previa. Lo hicieron mediante un experimento clásico que consistió en realizar una privación selectiva de fase REM y, a continuación, impedir a los sujetos desarrollar una cantidad de esta fase superior al valor de base durante 5 noches (Dement y col., 1966). Este protocolo produjo un retraso artificial de la ocurrencia del rebote, que tuvo lugar cuando cesó la restricción del sueño, lo que sugiere que la presión homeostática de fase REM –y, por tanto, los efectos de la privación– persiste, aunque los individuos puedan desarrollar una cantidad normal de fase REM. De este modo, se hace patente la necesidad de un rebote para la recuperación tras la privación. Siguiendo esta línea de razonamiento, la remisión tardía de los cambios observados en el EEG y en el reflejo vestíbulo-ocular en los presentes experimentos tras la privación por desipramina podría atribuirse al retraso en la ocurrencia del rebote de fase REM.

5.2.2.2 Cinética temporal de los cambios en la duración y el número de episodios de fase REM

Un segundo fenómeno que diferenció a ambos métodos de privación fue la evolución de la duración media de los episodios de fase REM y de su número por hora durante el periodo de recuperación post-privación. Tras la privación por el método de la plataforma, el rebote de fase REM se produjo por un incremento simultáneo de la duración media de los episodios y de su número, lo que condujo a que el tiempo en este estado se situase entre el triple y el cuádruple de su valor original durante el primer día de recuperación. Este incremento simultáneo de ambos parámetros es coherente con

observaciones previas en la rata (Borbély y Neuhaus, 1979). Sin embargo, la privación por desipramina produjo inicialmente un incremento de la duración de los episodios de fase REM y una reducción simultánea de su número por hora, seguidos por un rebote en el que la duración de los episodios fue normal y el número de episodios por hora aumentó significativamente. El incremento del número de episodios de fase REM fue responsable del aumento del tiempo en fase REM sobre su valor inicial durante el periodo de rebote. De este modo, ocurrió una segregación temporal entre el incremento de la duración de los episodios y el de su número. Este desfase sugiere que la relación de ambos fenómenos con la presión homeostática de fase REM es diferente, dado que el incremento de la duración de los episodios remitió durante el día 4 de recuperación tras la privación de 3 días por desipramina y estuvo ausente durante el periodo de rebote, mientras que el incremento del número de episodios coincidió con el rebote. Esto contrasta con la opinión de algunos autores, que afirman que el incremento de la duración de los episodios de fase REM constituye un marcador específico de la presión de fase REM y de la ocurrencia del rebote, mientras que el incremento del número de episodios constituiría un efecto secundario del estrés inherente a la privación por el método de la plataforma o de la reducción del tiempo total de sueño (Kitka y col., 2009). En el presente trabajo se ha demostrado que es posible la ocurrencia de un rebote debido exclusivamente al incremento del número de episodios fase REM, sin un aumento simultáneo de la duración de estos, y que la remisión del incremento de la duración no correlaciona con la desaparición de la deuda de fase REM tras la privación por desipramina. Dado que el incremento del número de episodios de fase REM se observó tras la privación por desipramina, que no redujo el tiempo en fase NREM, es improbable que este fenómeno esté causado por la reducción del tiempo total en sueño. Todo esto sugiere, por tanto, que el incremento del número de episodios de fase REM, y no el aumento en la duración de estos, constituye un buen indicador de la presión de este estado y de la ocurrencia del rebote.

Existen diversas evidencias que apuntan a que el estrés no es una causa probable de los cambios en el ciclo vigilia-sueño observados en la presente Tesis Doctoral. El control mediante la administración de solución salina no provocó cambios significativos en la arquitectura del sueño en el presente trabajo, por lo que el incremento en el

número de episodios de fase REM y en la duración de estos no puede atribuirse al estrés provocado por la manipulación de los animales. Adicionalmente, se ha reportado que las situaciones altamente estresantes –tales como la inmovilización sin un entrenamiento previo de habituación– pueden inducir en la rata un marcado incremento del tiempo en las fases NREM y REM, semejando el fenómeno del rebote (Marinesco y col., 1999; Rampin y col., 1991). En el presente trabajo, los individuos que se emplearon como control mediante la administración de solución salina se inmovilizaron para el registro del reflejo vestibulo-ocular y no se observaron cambios en su ciclo vigilia-sueño. Esto pudo deberse a que la exposición repetitiva a la inmovilización provocó la habituación de los animales y la consecuente reducción del estrés inducido por el procedimiento (Kant y col., 1985), lo que concordaría con la reducción del rebote de fase REM que Rampin y colaboradores (1991) reportaron tras someter a las ratas a sucesivas inmovilizaciones a lo largo de varios días. De este modo, dado que la manipulación para la administración de desipramina y el registro de los movimientos oculares en condiciones de inmovilidad no afectaron al ciclo vigilia-sueño, es posible deducir que los cambios provocados por los protocolos de la plataforma y de administración de desipramina se debieron específicamente a la privación de fase REM.

5.3 Efecto de la privación de fase REM sobre la actividad electroencefalográfica

5.3.1 Modificación del EEG a lo largo del ciclo vigilia-sueño

La privación de fase REM provocó cambios en el EEG de la rata que, de forma general, fueron coherentes con un incremento de su frecuencia. Este incremento de la frecuencia afectó al EEG durante todos los estados del ciclo vigilia-sueño. La magnitud y la cinética temporal de los cambios dependieron del método de privación, de la duración de la privación y del estado del ciclo vigilia-sueño.

Durante la fase REM, el incremento de la frecuencia del EEG fue generalizado y afectó a todo el rango de frecuencias estudiado. Su ocurrencia coincidió con el periodo de rebote de fase REM inducido por la privación. De este modo, el método de la plataforma dio lugar a un incremento de frecuencia al inicio del periodo de recuperación tras la privación y el tratamiento con desipramina lo hizo de forma retardada. El

incremento de la duración de la privación por el método de la plataforma de 4 a 6 días exacerbó el aumento en frecuencia, haciéndolo más evidente y sugiriendo la existencia de una relación entre el tiempo de privación y la magnitud del cambio.

Durante la vigilia tranquila se hallaron incrementos significativos de la frecuencia únicamente en la actividad theta. Dichos incrementos coincidieron en el tiempo con el rebote y fueron más marcados tras la privación por el método de la plataforma que por administración de desipramina. Las diferencias presentes en bandas de frecuencia superiores a theta no fueron significativas, lo que pudo deberse a la contaminación del EEG con la señal derivada de la actividad muscular (Muthukumaraswamy, 2013). Esta contaminación, que en el presente trabajo abarcó el rango de frecuencias comprendido entre 50 y 500 Hz, presentó una potencia mayor que las actividades del EEG y, por tanto, pudo enmascarar cambios en frecuencia del EEG. Asimismo, la elevada variabilidad del nivel de actividad muscular durante la vigilia –y, por consiguiente, de la potencia de la contaminación– conllevó una alta desviación típica, lo que probablemente contribuyó a que las diferencias entre los espectros de densidad de potencia antes y después de la privación no fuesen significativas.

Durante la fase NREM, el método de la plataforma provocó cambios en el EEG que fueron coherentes con un incremento de su frecuencia y cuya magnitud fue dependiente del tiempo de privación. La privación por desipramina, sin embargo, no provocó alteraciones significativas en el EEG durante la fase REM, por lo que cabe la posibilidad de que los cambios observados tras la privación por el método de la plataforma se deban a una reducción de la cantidad de fase NREM. No obstante, dado que los cambios tras la privación de 4 días por el método de la plataforma fueron leves, también existe la posibilidad de que la privación de 3 días por administración de desipramina no fuese lo bastante duradera como para inducir la modificación del EEG durante esta fase.

La interpretación de los cambios producidos por la privación de fase REM en el EEG como un incremento de frecuencia fue directa en el caso de theta e indirecta en el caso de las bandas de frecuencia superiores. La actividad theta da lugar a un pico de potencia claramente definido y distinguible en el EEG, lo que facilitó la identificación de su incremento de frecuencia dado que este fenómeno se caracteriza por la disminución

de la potencia en una franja de frecuencias y el incremento simultáneo de la potencia en una franja adyacente de frecuencia superior (Deboer, 1998). Sin embargo, no se hallaron picos de potencia claramente definidos en las bandas de frecuencia superiores, por lo que fue precisa otra aproximación para determinar si los cambios se debieron a un incremento de la frecuencia. En el EEG de los mamíferos existe una correlación negativa entre la potencia y la frecuencia a lo largo del espectro de frecuencias del EEG (Freeman y col., 2000), de forma que, en términos generales, las actividades de frecuencia baja tienen mayor potencia que las de frecuencia alta. De este modo, un incremento de la frecuencia del EEG se manifestaría como un aumento generalizado de su potencia, ya que todas las actividades pasarían a ocupar una franja de frecuencias superior a la usual. Para determinar si este fue el caso, se redujo la frecuencia de la señal de EEG post-privación para devolver a las oscilaciones a su franja de frecuencias original y se repitió la comparación estadística con el EEG de la situación inicial. Al emplear este protocolo se obtuvo que la mayoría de las diferencias significativas de potencia entre el EEG en la situación inicial y el EEG alterado por la privación desaparecieron, confirmando que el incremento de frecuencia explicó satisfactoriamente los cambios observados.

La coincidencia en el tiempo del incremento de la frecuencia del EEG con el rebote de fase REM constituyó un indicio adicional de que los cambios observados se debieron a la privación de fase REM y no a otros efectos inespecíficos de los protocolos de privación. Asimismo, la ocurrencia del incremento de frecuencia tras la privación por el método de la plataforma y por administración de desipramina, pero no tras el control por administración de solución salina, confirmó que el estrés, la inmovilidad forzada y la privación parcial de fase NREM que se atribuye al método de la plataforma (Grahnedt y Ursin, 1985; Machado y col., 2004; Mendelson y col., 1974; Pujol y col., 1968) no fueron responsables de los fenómenos observados.

Se ha descrito que la privación de sueño, tanto la total (Borbély y col., 1984; Dijk y col., 1987; Vyazovskiy y Tobler, 2005) como la selectiva de la fase REM (Corsi-Cabrera y col., 1994), produce un incremento de la potencia de theta. Esto ha conducido a que se proponga que la potencia de theta durante la vigilia es un buen indicador de la propensión al sueño (Vyazovskiy y Tobler, 2005). En el presente trabajo se observó que la privación de 6 días por el método de la plataforma indujo un incremento de la

potencia de theta durante la vigilia y la fase REM, mientras que la privación de 3 días por administración de desipramina únicamente produjo este efecto durante la vigilia. La privación de 4 días por el método de la plataforma no produjo cambios sustanciales en la potencia de theta. Esto podría indicar que el incremento de la potencia de theta depende de la magnitud de la privación y que esta actividad no se ve afectada del mismo modo durante la vigilia que durante la fase REM. Por tanto, el incremento de la frecuencia de theta, que mostró una clara correlación temporal con el rebote de fase REM y se produjo de forma consistente tras la privación, independientemente del protocolo empleado, podría considerarse un mejor indicador de la presión o propensión a la fase REM que el incremento de potencia.

La ocurrencia de un incremento en la frecuencia del EEG como consecuencia de la privación de fase REM y su coincidencia en el tiempo con el periodo de rebote sugiere que la fase REM tiene un papel importante en la homeostasis de las oscilaciones cerebrales. Esto resulta coherente, dada la importancia que se atribuye a las oscilaciones en los procesos cognitivos y la influencia negativa que tiene la privación de sueño sobre estos (Brown y col., 2012; Diekelmann y Born, 2010; Walker y Stickgold, 2004; Watson y Buzsáki, 2015).

5.3.2 Posibles causas del incremento de la frecuencia del EEG

5.3.2.1 Cambios en la temperatura cerebral

La temperatura tiene un gran impacto sobre la velocidad a la que transcurren los procesos biológicos. Whishaw y Vanderwolf (1971) demostraron en la rata que la frecuencia de la actividad theta durante la vigilia puede modificarse experimentalmente mediante la inducción de cambios en la temperatura corporal. Observaron que la hipotermia podía reducir la frecuencia de la oscilación theta registrada en el hipocampo hasta alcanzar los 2 Hz, mientras que la hipertermia podía elevarla hasta los 12 Hz. La variación de la frecuencia de las actividades del EEG con la temperatura corporal también se ha reportado, bajo anestesia, en el gato (Koella y Ballin, 1954) y en humanos (Russ y col., 1987). La frecuencia de las actividades del EEG también varía ante cambios de temperatura de origen fisiológico, no solo mediante la inducción experimental de

hipotermia o hipertermia. Estudios en el hámster ruso (*Phodopus sungorus*) han mostrado que la disminución de la temperatura de la corteza cerebral se acompaña de una reducción de la frecuencia del ritmo theta (Deboer, 2002), y que dicha reducción de frecuencia se vuelve más pronunciada ante la caída de temperatura que ocurre al comenzar el estado de letargia (Deboer y Tobler, 1995). Estas evidencias conducen a la conclusión de que los cambios de temperatura asociados a la administración de fármacos, a procedimientos experimentales y a procesos fisiológicos pueden producir la elevación o la reducción de la frecuencia de las actividades del EEG (Deboer, 1998). Dado que la privación de fase REM provoca alteraciones en la termorregulación (Rechtschaffen y Bergmann, 2002), un hipotético incremento de la temperatura cerebral ocasionado por los protocolos de privación podría explicar la modificación de la frecuencia del EEG que se observó en el presente trabajo.

Diversos estudios han mostrado que la privación total de sueño induce un leve incremento de la temperatura cerebral en la rata. Franken y colaboradores (1991) reportaron que una privación total de sueño de 24 h de duración produce un incremento de la temperatura cortical. Asimismo, Everson y colaboradores (1994) detectaron un aumento leve de la temperatura cortical (de aproximadamente 0,3 °C) a lo largo de un periodo de 12 días en el que se restringió severamente la cantidad de sueño mediante la técnica del disco sobre el agua (Rechtschaffen y Bergmann, 1995), sin que dicho incremento pareciera volverse más pronunciado en función del tiempo de privación. La temperatura del hipotálamo durante la vigilia también se ve afectada por la privación total de sueño de larga duración (Feng y col., 1995; Obermeyer y col., 1991), reportándose aumentos de aproximadamente 0,4 °C (Obermeyer y col., 1991).

Dado que la privación total de sueño se asocia con un leve incremento de la temperatura cerebral y que se ha demostrado que la temperatura modifica la frecuencia de las actividades del EEG, la combinación de ambos fenómenos parece una explicación plausible para el incremento generalizado de la frecuencia del EEG que se observó tras la privación de fase REM en el presente trabajo. No obstante, existen evidencias que no apoyan esta hipótesis. Shaw y colaboradores (1998) llevaron a cabo un estudio en la rata para determinar si el incremento de la temperatura producido por la privación de sueño podía atribuirse a la pérdida de fase REM o a la de fase NREM. Realizaron privaciones

totales de sueño y privaciones selectivas de fase REM de muy larga duración, que mantuvieron hasta que los individuos mostraron síntomas de encontrarse en estado terminal. Hallaron que la privación selectiva de fase REM no provocó el aumento de la temperatura hipotalámica en ningún momento del periodo de privación, mientras que la privación total sí lo hizo, lo que condujo a la conclusión de que la pérdida de fase NREM fue la responsable de este fenómeno. De este modo, la privación por el método de la plataforma, a la que se atribuye una reducción en la cantidad de fase NREM (Grahstedt y Ursin, 1985; Machado y col., 2004) podría desencadenar un incremento de la temperatura cerebral, y esto podría explicar el incremento en la frecuencia del EEG que se observó en el presente trabajo. Sin embargo, Feng y colaboradores (1995) reportaron que tras una privación total de sueño de larga duración (de 14 a 21 días) en la rata, que redujo drásticamente la cantidad de fase NREM, el incremento de temperatura resultante fue significativo solo durante el primer día de recuperación y remitió rápidamente a continuación. En la presente Tesis Doctoral se observó que el incremento de la frecuencia de la oscilación theta tras el método de la plataforma fue significativo hasta el tercer día de recuperación post-privación, correlacionando pobremente con la dinámica de remisión de la elevación de temperatura reportada por Feng y colaboradores (1995). Dado que la reducción de la cantidad de fase NREM por el método de la plataforma es de menor severidad y duración que la que se reporta en los experimentos de Feng y colaboradores (1995), parece improbable que un hipotético incremento de temperatura pudiera persistir durante 3 días dadas las condiciones experimentales del presente trabajo. Adicionalmente, el incremento de la frecuencia del EEG tras la privación de fase REM por desipramina no puede atribuirse a este fenómeno, ya que no se produjo ninguna reducción de la cantidad de fase NREM. Por los motivos anteriormente mencionados, la elevación de la temperatura cerebral se puede considerar una causa posible, aunque improbable, para el incremento de la frecuencia del EEG.

El incremento de la frecuencia del EEG ocurrió de forma retardada tras la privación por desipramina, lo que probablemente se debió a la influencia del fármaco hasta su eliminación del organismo. La administración intraventricular de imipramina, que tiene efectos similares a los de la desipramina sobre la neurotransmisión (Wilson y

Argyropoulos, 2005), provoca una respuesta hipertérmica prolongada en la rata (Francesconi y Mager, 1976). La metabolización de la imipramina en el organismo de la rata es muy rápida y da lugar a desipramina, que posee una vida media más larga (Dingell y col., 1964) y alcanza una concentración cerebral mucho más alta (DeVane y col., 1984), por lo que se postula que los efectos de la imipramina podrían deberse a la desipramina generada como producto de su metabolismo (DeVane y col., 1984). Así, es coherente hipotetizar que la administración de desipramina podría desencadenar una reacción hipertérmica duradera en la rata. Este incremento de temperatura no concordaría con la reducción inicial de la frecuencia de theta observada tras el tratamiento con desipramina y con la ocurrencia retardada del incremento de frecuencia. Por consiguiente, es improbable que el efecto de la desipramina sobre el EEG esté relacionado con la temperatura cerebral.

5.3.2.2 Excitabilidad neuronal

Vyazovskiy y colaboradores (2009) demostraron que la tasa de disparo de las neuronas corticales de la rata aumenta paulatinamente a lo largo de la vigilia y desciende durante el sueño, implicando la existencia de una regulación homeostática de la actividad neuronal asociada al sueño. Este descenso de la frecuencia de descarga se ha relacionado con una modulación de la excitabilidad cortical (Cirelli, 2017). Watson y colaboradores (2016) observaron que durante la fase NREM ocurre una disminución de la tasa de disparo de las neuronas que descargan con mayor frecuencia, mientras que durante la fase REM se produce una disminución de actividad en todos los grupos de neuronas de la corteza de la rata. El aumento de la tasa de disparo de las neuronas durante la vigilia y su reducción durante el sueño también se ha detectado en el hipocampo (Miyawaki y Diba, 2016). Dicha disminución se relacionó con la alternancia de las fases NREM y REM durante el sueño (Miyawaki y Diba, 2016). Existen, pues, abundantes evidencias de que el sueño tiene un papel importante en la homeostasis de la actividad neuronal. Mientras que algunos estudios respaldan que ambas fases del sueño contribuyen a la homeostasis de la tasa de disparo, otros muestran evidencias contrarias. Grosmark y colaboradores (2012) estudiaron la tasa de disparo de las neuronas en la región CA1 del hipocampo y encontraron que esta aumenta durante la

fase NREM y disminuye durante la fase REM, de forma proporcional a la potencia de la oscilación theta. Esto sugiere una mayor relevancia de la fase REM en la disminución de la fuerza sináptica y en la regulación de la tasa de disparo de las neuronas (Niethard y Born, 2019). Descubrimientos como este han reforzado la percepción de que las fases NREM y REM del sueño podrían tener funciones complementarias pero diferentes en el mantenimiento del funcionamiento del encéfalo y, concretamente, en su balance excitación-inhibición (Vyazovskiy y Delogu, 2014). Asimismo, dan a entender que los mecanismos homeostáticos que operan sobre la tasa de disparo en la corteza cerebral y en el hipocampo son similares (Miyawaki y Diba, 2016). Existen, no obstante, estudios en los que se afirma que la privación de fase REM provoca una reducción de la excitabilidad de las neuronas piramidales del hipocampo en lugar de un aumento (McDermott y col., 2003; Yang y col., 2008).

La tasa de disparo de las neuronas depende de varios factores, entre los que se encuentran la fuerza sináptica, el efecto de los factores neuromoduladores y el balance excitación-inhibición (Cirelli, 2017). El balance excitación-inhibición, concretamente, tiene un papel clave en la generación y modulación de la actividad cerebral (Isacson y Scanziani, 2011). Atallah y Scanziani (2009) demostraron que, en el hipocampo, la magnitud de las salidas excitadoras de las neuronas piramidales y la de las salidas inhibitoras de las interneuronas condicionan la frecuencia de la oscilación gamma. Hallaron que la actividad excitadora originada por las neuronas piramidales desencadena una salida inhibitora de magnitud proporcional en las interneuronas, debido al aumento del número de interneuronas reclutadas. El incremento de la magnitud de la entrada inhibitora hacia las neuronas piramidales, a su vez, provoca un aumento del tiempo de recuperación tras la hiperpolarización, lo que retrasa la generación del siguiente ciclo de gamma y, por tanto, reduce su frecuencia. Esto es coherente con estudios previos en los que se demuestra que la frecuencia de la oscilación gamma depende de la constante de tiempo de los potenciales postsinápticos inhibitorios (Wang y Buzsáki, 1996; Whittington y col., 1995). Asimismo, demuestra que las alteraciones en el balance excitación-inhibición pueden provocar cambios en la frecuencia de las oscilaciones. De este modo, una reducción de la magnitud de la actividad inhibitora causada por la privación de fase REM podría ser el origen del

incremento de la frecuencia del EEG que se reporta en el presente trabajo. Dado que la frecuencia de una oscilación puede variar en función de las características de los potenciales postsinápticos inhibidores (Wang y Buzsáki, 1996) y que se ha propuesto que la oscilación theta del hipocampo emerge de interacciones locales entre las células piramidales y las interneuronas inhibitoras (Colgin, 2013), una inhibición menos intensa o duradera también podría ser el motivo del aumento de la frecuencia de theta y, por tanto, ser una explicación extrapolable a otras actividades del EEG. Asimismo, el desplazamiento del balance excitación-inhibición a favor de la excitación podría contribuir directamente al incremento de la frecuencia de theta, ya que una entrada excitadora de mayor magnitud al núcleo supramamilar, al que se atribuye la transformación de la señal tónica procedente de las estructuras activadoras del puente en una señal rítmica (Vertes y Kocsis, 1997), podría provocar un incremento de la frecuencia del ritmo resultante (Pan y McNaughton, 2004).

5.3.2.3 Neurotransmisión

En el presente trabajo se observó que la frecuencia de la oscilación theta se redujo al inicio del periodo de recuperación tras la privación de 3 días por administración de desipramina, y que el incremento de la frecuencia del EEG, al igual que el rebote, ocurrió de forma retardada. La persistencia de la desipramina en el organismo constituye la causa probable de estos fenómenos, ya que el incremento de la frecuencia del EEG ocurrió de forma inmediata al finalizar la privación por el método de la plataforma.

Se conoce que diversos fármacos ansiolíticos y antidepresivos, entre los que se encuentran los tricíclicos emparentados con la imipramina, reducen la frecuencia de la oscilación theta que se registra en el hipocampo (McNaughton y col., 2007). La inhibición de la síntesis de serotonina por un tratamiento previo con *para*-clorofenilalanina abole la reducción de la frecuencia de theta causada por la administración de imipramina, poniendo de manifiesto la existencia de una relación directa entre el aumento de la abundancia de serotonina y la reducción de la frecuencia de theta (Zhu y McNaughton, 1994). La activación de los receptores 5-HT₆ de serotonina del hipocampo mediante la administración de un fármaco agonista también provoca una reducción de la frecuencia

de theta (Ly y col., 2013), lo que corrobora esta relación. Asimismo, la administración de reboxetina, un antidepresivo que inhibe la recaptación de noradrenalina de forma altamente selectiva, también provoca una reducción de la frecuencia del ritmo theta en el hipocampo (McNaughton y col., 2007). Dado que la desipramina inhibe la recaptación de noradrenalina y, en menor medida, la de serotonina (Wilson y Argyropoulos, 2005), la reducción de la frecuencia de theta que se observó en el presente estudio durante la fase temprana del periodo de recuperación tras el tratamiento con este antidepresivo y la ocurrencia tardía del incremento de frecuencia respecto al método de la plataforma podrían atribuirse al aumento de la disponibilidad de ambos neurotransmisores.

Aunque se hace patente la relación entre el incremento de las actividades noradrenérgica y serotoninérgica y la caída de la frecuencia de theta, no se han encontrado estudios que apoyen que la reducción de la disponibilidad de estos neurotransmisores pueda producir un aumento de la frecuencia. Ly y colaboradores (2013) hallaron que la administración de un agonista de los receptores 5-HT₆ de serotonina produce una disminución de la frecuencia de theta y que, sin embargo, la administración de un antagonista no provoca su incremento. Asimismo, Zhu y McNaughton (1994) comprobaron que el agotamiento de la serotonina revierte la reducción de la frecuencia de theta provocada por la imipramina, pero no reportaron incrementos de la frecuencia como consecuencia de la caída del tono serotoninérgico. Adicionalmente, en la literatura existen evidencias conflictivas en cuanto al efecto de la privación de fase REM sobre las concentraciones de serotonina y noradrenalina en el encéfalo. Se ha reportado que la privación de fase REM por el método de la plataforma eleva (Lopez-Rodriguez y col., 2003), reduce (Blanco-Centurion y Salin-Pascual, 2001; Farooqui y col., 1996) o no modifica los niveles de serotonina (Stern y col., 1971) en diferentes estructuras encefálicas. En cuanto a la noradrenalina, también existen discrepancias. Se ha reportado que su concentración en el encéfalo no se ve afectada por la privación (Stern y col., 1971). Sin embargo, Porkka-Heiskanen y colaboradores (1995) mostraron que la concentración de noradrenalina en la corteza y el hipocampo desciende durante una privación por el método de la plataforma y aumenta progresivamente durante el periodo de recuperación. En el mismo sentido, Mallick y Singh (2011) defienden que la privación de la fase REM induciría un incremento de la

concentración de noradrenalina, que se debería a la reducción simultánea de la actividad de la monoaminoxidasa (Thakkar y Mallick, 1993), enzima encargada de su degradación, y al incremento de la expresión de la tirosina hidroxilasa (Basheer y col., 1998; Porkka-Heiskanen y col., 1995), que constituye el paso limitante en su ruta de biosíntesis.

Teniendo en cuenta que la reducción de la frecuencia de theta observada tras el tratamiento con antidepresivos se ha relacionado con el aumento de la disponibilidad de serotonina y noradrenalina (McNaughton y col., 2007), el incremento de la concentración de estos neurotransmisores durante el periodo de recuperación no explicaría el aumento de la frecuencia del EEG que se observó en el presente trabajo. Por ello, y dado que no se han encontrado estudios que apoyen firmemente que la privación de fase REM produzca una disminución de la disponibilidad de noradrenalina y serotonina (o que esta disminución afecte a la frecuencia del EEG), la posible implicación de estos neurotransmisores en el incremento post-privación de la frecuencia del EEG no queda clara.

5.3.3 Implicaciones del incremento de la frecuencia del EEG

El aumento de la frecuencia de los ritmos del EEG podría tener impacto a múltiples niveles, abarcando el procesamiento cognitivo, la relación entre el sueño y la epilepsia, y la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño.

5.3.3.1 Las oscilaciones y el procesamiento cognitivo

Se cree que las oscilaciones tienen un papel fundamental en la coordinación de múltiples regiones del encéfalo y en la compartimentación y transmisión de información (Watson y Buzsáki, 2015). En particular, las oscilaciones theta y gamma, presentes durante la vigilia y la fase REM del sueño, se han relacionado íntimamente con diversos procesos cognitivos. A la oscilación theta se le ha atribuido importancia en el aprendizaje, la consolidación de la memoria y la navegación espacial (Colgin, 2013; Diekelmann y Born, 2010; Lengyel y col., 2005; Vertes y Kocsis, 1997). Se ha especulado

que la oscilación gamma podría estar implicada en la coordinación temporal de redes de neuronas que procesan información relacionada, y se ha vinculado con la transmisión de información, el almacenamiento y la recuperación de la memoria y la integración sensorial (Colgin y col., 2009; Fries y col., 2007; Mably y Colgin, 2018). Asimismo, se ha propuesto que la frecuencia de gamma puede afectar a la dirección del flujo de información entre distintas estructuras encefálicas (Colgin y col., 2009). Adicionalmente, se ha propuesto que theta actúa como sincronizador de la producción de brotes de gamma en la corteza, lo que se cree que podría contribuir a la coordinación temporal de áreas físicamente distantes (Buzsáki y Wang, 2012; Sirota y col., 2008).

Dado que las oscilaciones del EEG reflejan la actividad general del cerebro, cabría esperar que la modificación de las características de las oscilaciones indicase una alteración de las funciones cerebrales. Estudios del EEG en humanos han revelado que diversos trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas coexisten con cambios en la potencia y en la frecuencia de diferentes oscilaciones (Herrmann y Demiralp, 2005; Nimrich y col., 2015). En la esquizofrenia se han asociado distintos síntomas tanto con el incremento como con la reducción de la potencia de las oscilaciones de alta frecuencia del EEG (Herrmann y Demiralp, 2005; Uhlhaas y Singer, 2010). El deterioro cognitivo leve en humanos se acompaña de una reducción de la frecuencia pico de la oscilación alfa (8 a 12 Hz) del magnetoencefalograma (Garcés y col., 2013). Se ha establecido una correlación entre el deterioro cognitivo asociado con la enfermedad de Alzheimer y la reducción de la frecuencia de la actividad eléctrica del hipocampo y de la corteza cerebral (Engels y col., 2016). Hasta la fecha se desconoce si la alteración de las oscilaciones puede ser la causa de parte de las deficiencias cognitivas que se asocian con dichas patologías o si, por el contrario, ambos fenómenos son meras consecuencias de las alteraciones celulares y fisiológicas propias de las patologías. No obstante, existe un creciente cúmulo de evidencias que apuntan a que la perturbación de las actividades oscilatorias del cerebro podría estar en el origen de los problemas cognitivos. En un modelo genético de la enfermedad de Alzheimer en el ratón por expresión de la apolipoproteína E4 humana, la aparición de deficiencias en el aprendizaje y la memoria correlaciona con una disminución de la potencia de gamma bajo y de la abundancia de complejos *sharp wave-ripple* en el hipocampo durante la

vigilia tranquila (Gillespie y col., 2016). Si en los ratones modificados genéticamente se impide la expresión de apolipoproteína E4 en las neuronas GABAérgicas del giro dentado, las alteraciones cognitivas no se producen y esto correlaciona con una normalización de la potencia de gamma bajo, aunque no de la abundancia de complejos *sharp wave-ripple*. Esto se tomó como una evidencia de que el funcionamiento normal de gamma es necesario para el procesamiento cognitivo (Gillespie y col., 2016; Mably y Colgin, 2018). En el mismo sentido, la reducción experimental de la potencia de theta durante la fase REM mediante el silenciamiento optogenético de las neuronas GABAérgicas del septo medial provoca una disrupción de la consolidación de la memoria en el ratón sin que el ciclo vigilia-sueño se vea afectado (Boyce y col., 2016), lo que también apunta a que la integridad de las oscilaciones es precisa para un procesamiento cognitivo normal. La supresión de theta mediante el silenciamiento farmacológico del septo medial también produce déficits en el aprendizaje en la rata, que revierten cuando se genera en el hipocampo un ritmo regular de frecuencia similar a theta mediante estimulación eléctrica (McNaughton y col., 2006), lo que corrobora la importancia de la presencia de esta actividad.

Dado que la modificación de las oscilaciones puede acarrear efectos deletéreos, existe la posibilidad de que el incremento de la frecuencia del EEG que se observó en el presente trabajo sea parcialmente responsable de las deficiencias cognitivas asociadas con la privación de sueño. No obstante, la relación más clara se establece entre el deterioro del procesamiento cognitivo y la disminución de las actividades oscilatorias del cerebro, por lo que es arriesgado especular sobre un posible efecto deletéreo de su incremento. De hecho, la frecuencia de theta muestra una correlación directa con el rendimiento de la rata en el laberinto de agua, de forma que, cuanto mayor es su frecuencia, menor es el tiempo que los individuos necesitan para hallar la plataforma oculta (Pan y McNaughton, 2004). Esto ha conducido a que se proponga que el incremento de la frecuencia de theta podría tener efectos beneficiosos sobre el procesamiento cognitivo (McNaughton y col., 2007). Dado que en el presente trabajo se ha observado que el incremento de la frecuencia del EEG y el rebote de fase REM ocurren de forma simultánea, cabría la posibilidad de que el incremento de la frecuencia

fuese el reflejo de un fenómeno homeostático relacionado con la reversión de los cambios inducidos por la privación.

5.3.3.2 Frecuencia de las oscilaciones y epilepsia

El incremento de la frecuencia del EEG que se observó en el presente trabajo como consecuencia de la privación de fase REM también podría tener importantes implicaciones en relación con la epilepsia. Se conoce que la privación de sueño, tanto la total como la selectiva de la fase REM, provoca una disminución de la intensidad de estimulación eléctrica necesaria para generar ataques epilépticos en la rata (Grahnedt, 1986). Asimismo, la privación de sueño se asocia con un incremento de la excitabilidad cortical en pacientes con epilepsia (Badawy y col., 2006). Por el contrario, el incremento de la cantidad de fase REM en la rata mediante la inyección de carbacol en la formación reticular del puente eleva el umbral de intensidad de la estimulación eléctrica necesaria para evocar un disparo sostenido en la amígdala, lo que indica una menor propensión a sufrir ataques epilépticos (Kumar y Raju, 2001).

El incremento de la propensión a los ataques epilépticos tras la privación de sueño podría guardar una relación con la frecuencia de las oscilaciones del EEG. La administración de fenitoína, un medicamento antiepiléptico, provoca una reducción de la frecuencia del ritmo theta en el hipocampo de la rata cuando se administra en dosis comparables a las terapéuticas (Yeung y col., 2012). La pregabalina, que posee propiedades antiepilépticas, ansiolíticas y analgésicas, comparte este mismo efecto sobre theta (Siok y col., 2009). Adicionalmente, diversos fármacos ansiolíticos y antidepresivos cuya administración reduce la frecuencia de theta también poseen un efecto antiepiléptico. Se ha reportado que los antidepresivos tricíclicos como la imipramina, la desipramina y la amitriptilina tienen un efecto antiepiléptico sobre ratas genéticamente propensas a padecer epilepsia (Dailey y Jobe, 1985). La administración de diazepam en el ratón reduce la frecuencia del EEG de forma generalizada, incluyendo a las actividades theta, gamma bajo y gamma alto (Scheffzük y col., 2013), y su aplicación local sobre la corteza cerebral de ratas epilépticas limita marcadamente la generación de potenciales epiléptiformes (Eder y col., 1997).

Dado que la frecuencia del EEG, incluida la de theta, aumenta tras la privación de fase REM en la rata y que la privación de sueño se ha asociado con una mayor incidencia de ataques epilépticos, no sería incoherente especular sobre una posible relación entre la frecuencia de las oscilaciones y la epilepsia. En el modelo de epilepsia inducida por pilocarpina en la rata se ha hallado que la frecuencia de theta en el hipocampo es superior en las ratas epilépticas que en los individuos normales (Colom y col., 2006), lo que refuerza esta apreciación. También parecen apoyar esta hipótesis el hecho de que los fármacos con efecto ansiolítico a menudo provoquen una reducción de la frecuencia de la oscilación theta (McNaughton y col., 2007), que los fármacos antiepilépticos y antidepresivos posean propiedades ansiolíticas (Mula, 2016) y que los antidepresivos y los ansiolíticos puedan mostrar propiedades antiepilépticas (Jobe y Browning, 2005; Mula, 2016; Trimble, 2002). Por consiguiente, estudiar si los cambios en la frecuencia de theta correlacionan con variaciones en la incidencia de los episodios epilépticos podría poner de manifiesto una variable predictora de la propensión a esta patología.

5.3.3.3 Frecuencia de las oscilaciones y análisis del ciclo vigilia-sueño

Dado que la identificación precisa de los estados del ciclo vigilia-sueño requiere del análisis del EEG y que este se ve afectado por la privación de fase REM, el incremento de la frecuencia del EEG reportado en la presente Tesis Doctoral podría tener relevancia no solo en el ámbito fisiológico, sino también en el metodológico.

Normalmente, la identificación de los estados de alerta se basa en el análisis espectral de la señal de EEG mediante la evaluación de la potencia en diversas bandas de frecuencia bien definidas. La banda theta, en concreto, es ampliamente utilizada en el análisis del ciclo vigilia-sueño, ya que su presencia en el EEG es un buen marcador de la vigilia y de la fase REM. Theta ocupa una franja de frecuencias estrecha, cuyos límites inferior y superior se suelen establecer en 6 y 9 Hz, respectivamente (Benington y col., 1994a; Libourel y col., 2015; Neckelmann y col., 1994; Rempe y col., 2015; Stephenson y col., 2009). En el presente trabajo se observó que la privación de fase REM de 6 días por el método de la plataforma produjo un incremento de aproximadamente 1 Hz en la frecuencia del pico de potencia de la actividad theta. Este incremento hace que el pico

de theta se sitúe cerca de los 9 Hz, que constituyen el límite superior de frecuencia que se suele establecer para esta banda en los estudios de sueño. De hecho, dado que la frecuencia de theta es variable, su pico de potencia sobrepasó a menudo los 9 Hz tras la privación. De este modo, la fracción de más alta frecuencia de theta podría quedar excluida de los análisis que contemplen la franja estándar de 6 a 9 Hz, lo que provocaría que se subestimase la potencia de esta actividad. Esto podría conducir a que los incrementos de la frecuencia de theta se interpretasen incorrectamente como disminuciones de potencia, lo que podría derivar en errores de identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño en los estudios que implicasen una privación de la fase REM. Por ello, elevar el límite superior de la banda theta a al menos 10 Hz constituiría una práctica recomendable en este tipo de experimentos.

5.4 Efecto de la privación de fase REM sobre el reflejo vestibulo-ocular

En el presente trabajo, la privación de fase REM, tanto por el método de la plataforma como por administración de desipramina, indujo una reducción de la ganancia y una caída de la amplitud y la velocidad pico de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular. La realización de un control mediante la administración de solución salina no tuvo efecto sobre las propiedades del reflejo, por lo que los cambios observados tras la privación de fase REM fueron específicos de la privación.

Tras la privación por desipramina, la recuperación de la ganancia y de la amplitud y la velocidad pico de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular ocurrió de forma retardada respecto a la privación por el método de la plataforma. Tras los primeros 4 días del periodo de recuperación post-privación, en los que el tiempo medio en fase REM fue inferior o igual a la cantidad inicial, la recuperación del reflejo fue parcial. La recuperación total de la ganancia y de la amplitud y la velocidad pico de las fases rápidas ocurrió a continuación, coincidiendo en el tiempo con el rebote de fase REM. Esto sugiere que la reversión de los síntomas de la privación depende de la cantidad de fase REM durante el periodo post-privación. Por añadidura, la existencia de una relación entre la dinámica de recuperación del reflejo y la cantidad de fase REM enfatiza que los cambios observados se debieron a la privación de fase REM y no a efectos inespecíficos

de los protocolos empleados. Asimismo, pone de relieve la importancia de la fase REM en el mantenimiento del funcionamiento del sistema oculomotor.

5.4.1 Reflejo vestíbulo-ocular y nivel de alerta

La información disponible en la literatura acerca del efecto de la privación de sueño sobre el reflejo vestíbulo-ocular es escasa y no está exenta de discrepancias. Se ha reportado que la ganancia del reflejo en humanos aumenta (Quarck y col., 2006), disminuye (Collins, 1988) o no cambia (Wolfe y Brown, 1968) en respuesta a la privación de sueño. Los resultados del presente trabajo apoyan las observaciones de Collins (1988) y parecen oponerse a las de Quarck y colaboradores (2006). Sin embargo, el incremento de la ganancia que reportaron estos últimos se produjo únicamente cuando emplearon una estimulación vestibular de inicio repentino y abrupto, sin que observaran cambios en la ganancia respecto a la situación inicial cuando la estimulación consistió en una rotación sinusoidal. Esto les llevó a proponer que el incremento observado podría deberse a una modificación del sistema que dirige la atención hacia estímulos relevantes (Quarck y col., 2006), por lo que podría no deberse a la influencia de la privación de sueño sobre el sistema vestíbulo-ocular.

El efecto de la privación de sueño sobre los movimientos oculares sacádicos se ha estudiado en mayor profundidad y ofrece información menos contradictoria. Se ha reportado que la privación de sueño provoca en los humanos una reducción de la velocidad de los sacádicos (Goldich y col., 2010; Rowland y col., 2005; Zils y col., 2005), que es proporcional a la magnitud y duración de la privación (Russo y col., 2003). Zils y colaboradores (2005) hallaron que la privación de sueño, además de reducir la velocidad de los sacádicos, produce una disminución de su amplitud. Hipotetizaron que la alteración pudo deberse a la afectación de las neuronas de brote excitador (Zils y col., 2005), que activan a las motoneuronas extraoculares para producir los movimientos oculares rápidos.

En los estudios en humanos, la disminución de la velocidad de los sacádicos se ha tendido a atribuir a la reducción del nivel de atención de los sujetos experimentales (Goldich y col., 2010; Rowland y col., 2005; Russo y col., 2003). El nivel de alerta también

parece condicionar en gran medida las propiedades del reflejo vestíbulo-ocular, de forma que la magnitud del reflejo disminuye conforme lo hace el nivel de alerta, e incluso puede llegar a producir su desaparición (Collins y col., 1961; Curthoys, 2002). Esta disminución del reflejo se observó en el presente trabajo, y bastó una estimulación sensorial suave de los animales para provocar su reversión. Para prevenir cambios en las variables que se estudiaron por fluctuaciones en el nivel de alerta, los animales se estimularon de manera suave y periódica durante el registro del reflejo vestíbulo-ocular y solo se utilizaron los periodos de registro en los que el EEG mostró las características propias de la vigilia activa.

Los humanos con un bajo nivel de alerta sometidos a una aceleración angular producen fases rápidas de menor velocidad y en menor número que los que mantienen la atención (Collins y col., 1961), lo que sugiere que la velocidad y el número de movimientos oculares son indicadores del estado de alerta (Collins, 1962 y 1974). En el mismo sentido, Ito y colaboradores (1987) comprobaron que la reducción del nivel de alerta en el gato mediante una anestesia ligera conduce a una caída de la magnitud del reflejo vestíbulo-ocular y en el número de fases rápidas. En el presente trabajo se observó una disminución del número de fases rápidas por ciclo de estimulación vestibular tras la privación por el método de la plataforma, pero no se hallaron cambios tras la privación por desipramina. Dado que una reducción del nivel de alerta de los individuos se hubiese acompañado de un descenso en el número de fases rápidas (Collins y col., 1961; Collins, 1962 y 1974), esta constituye una explicación poco satisfactoria para los cambios en el reflejo vestíbulo-ocular observados tras la privación de fase REM. Sin embargo, una reducción del nivel de alerta podría explicar la reducción del número de fases rápidas tras la privación por el método de la plataforma, ya que está descrito que esta técnica provoca una reducción parcial de la cantidad de fase NREM (Grahstedt y Ursin, 1985; Machado y col., 2004), que podría haber provocado un incremento de la somnolencia.

5.4.2 Posibles orígenes de la modificación del reflejo vestíbulo-ocular

Considerar al reflejo vestíbulo-ocular como el producto del arco reflejo de tres neuronas descrito por Lorente de Nó (1933) produce la sensación de que constituye un sistema sencillo. Sin embargo, en su modulación participan múltiples estructuras centrales, como la corteza cerebral (Arshad y col., 2013; Ventre-Dominey y col., 2003) o el cerebelo (Robinson, 1976). Asimismo, existe la posibilidad de que las aferencias sensoriales procedentes de la musculatura extraocular pudieran influir también sobre los movimientos oculares durante el reflejo (Büttner-Ennever y Horn, 2002; Donaldson, 2000). Las caídas de la ganancia y de la amplitud y la velocidad pico del reflejo vestíbulo-ocular que se observaron en la presente Tesis Doctoral, por tanto, podrían deberse a la alteración de una o de varias estructuras y basarse en una afectación sensorial, motora o del procesamiento central. Dada la multiplicidad de posibles orígenes para la disfunción del reflejo vestíbulo-ocular tras la privación y la información disponible, aventurar una causa probable es difícil.

Las neuronas vestibulares de primer orden, que transmiten la información sensorial procedente de los canales semicirculares a los núcleos vestibulares, poseen una tasa de disparo basal que aumenta en respuesta a la despolarización de las células ciliadas de los canales semicirculares y disminuye en respuesta a su hiperpolarización (Goldberg y Fernandez, 1971). Esto permite que la modificación de la tasa de disparo codifique el giro de la cabeza en los dos sentidos de cada plano en el espacio (Leigh y Zee, 1983). La magnitud de la aceleración angular conlleva una modificación proporcional de la tasa de disparo de estas neuronas (Fernandez y Goldberg, 1971), de modo que una disminución de la respuesta de las células ciliadas a la aceleración o una afectación de la modulación de la tasa de disparo de las neuronas vestibulares de primer orden conducirían a la reducción de la eficacia de la compensación del desplazamiento de la cabeza con el movimiento de los ojos, lo que podría explicar la reducción de la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular. No se han hallado trabajos previos en los que se analice el efecto de la privación de fase REM sobre las células ciliadas de los canales semicirculares. No obstante, su efecto sobre las células ciliadas auditivas, que presentan similitudes con las de los canales semicirculares y comparten su origen embrionario (Kelley, 2006), sí se ha estudiado. Una privación de 9 días de duración por el método de

la plataforma produce en la rata deficiencias en el funcionamiento de las células ciliadas de la cóclea, daños en sus estereocilios y una pérdida de audición (Jung y col., 2018). De ocurrir un fenómeno similar en el sistema vestibular, este podría ser responsable de la disminución de la ganancia del reflejo. Los autores de este trabajo especulan sobre una posible alteración de la absorción de fluidos y de la homeostasis iónica como consecuencia de una reacción inflamatoria derivada de la privación (Jung y col., 2018), lo que sugiere que también podría estar implicada una modificación de las propiedades de la endolinfa. Sin embargo, una disfunción de los canales semicirculares no explicaría satisfactoriamente los cambios observados en el presente trabajo. Una reducción de la entrada sensorial desde el sistema vestibular, bien por la disfunción de las células ciliadas o por la de las neuronas vestibulares de primer orden, provocaría la subestimación de la aceleración angular de la cabeza y la consecuente caída del número de fases rápidas. Dado que esto no se observó tras la privación por administración de desipramina, dicha explicación no es, a simple vista, compatible con los resultados obtenidos. Por consiguiente, es probable que el origen u orígenes de la alteración del reflejo vestibulo-ocular se encuentren a continuación de las neuronas vestibulares de primer orden.

Las neuronas vestibulares de primer orden inervan a las de segundo orden, cuyos somas conforman los núcleos vestibulares (Leigh y Zee, 1983). Los núcleos vestibulares, a su vez, emiten proyecciones excitadoras hacia las *burster-driving neurons* del núcleo *prepositus hypoglossi* contralateral (Ohki y col., 1988). La activación de estas células determina la producción de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular (Curthoys, 2002). La producción de las fases rápidas correlaciona con la ocurrencia de brotes de espigas de alta frecuencia en las *burster-driving neurons*, existiendo una relación directa entre las características de dichos brotes (número de espigas por brote y tasa de disparo) y las propiedades de los movimientos oculares asociados (amplitud y velocidad) (Kitama y col., 1995). Asimismo, la duración de los brotes de actividad de estas neuronas es proporcional a la duración de las fases rápidas (Kitama y col., 1995). Dado que el comportamiento de las *burster-driving neurons* condiciona las características de las fases rápidas y que el número de fases rápidas por ciclo de estimulación sinusoidal y su duración se vieron escasamente afectados por la privación de fase REM, parece

probable que el procesamiento de la información vestibular sea normal hasta estas células. En caso contrario, una entrada excitadora disminuida hubiese conllevado la generación de un número menor de fases rápidas. Sin embargo, una alteración a continuación de estas células no provocaría cambios en el número de fases rápidas ni, necesariamente, en su duración, pero sí podría afectar a la magnitud de los movimientos oculares, lo que sería coherente con los resultados obtenidos. Una alteración del procesamiento de la información oculomotora a continuación de los núcleos vestibulares y de las *burst-driving neurons* podría implicar a las neuronas de brote, a las motoneuronas extraoculares y/o a la musculatura extraocular.

La reducción de la ganancia y de la amplitud y la velocidad rápida de las fases rápidas del reflejo vestíbulo-ocular podrían deberse a la modificación de las propiedades de la musculatura extraocular. Berger (1969) propuso que la inervación de la musculatura extraocular durante la fase REM podría ser fundamental para la visión binocular y para la realización de movimientos oculares conjugados. Asimismo, existen evidencias que apuntan a que la privación de fase REM tiene un efecto perjudicial sobre la musculatura. Se ha demostrado que la privación de 4 días por el método de la plataforma induce una atrofia del tibial anterior en la rata (Dattilo y col., 2012). Asimismo, la privación de fase REM durante 7 días por el método de la plataforma provoca una disminución de la expresión de la isoforma II y un aumento paralelo de la expresión de la isoforma I de la cadena pesada de la miosina en el masetero de la rata (Cao y col., 2015), y se sabe que las variaciones en la composición de las miofibrillas producen diferencias en la capacidad contráctil de las fibras musculares (Schiaffino y Reggiani, 1996). En vista de que la privación de fase REM provoca modificaciones en el músculo, estas podrían ser una causa de la reducción de la amplitud y la velocidad pico de los movimientos oculares asociados al reflejo vestíbulo-ocular. Sin embargo, no se ha hallado información acerca del efecto de la privación de sueño sobre las propiedades de la musculatura extraocular.

5.5 Efecto de la privación de fase REM sobre los movimientos oculares rápidos

5.5.1 Modificación de las características de los movimientos oculares rápidos y de su latencia de aparición

La privación selectiva de la fase REM durante 4 días por el método de la plataforma sobre agua provocó un incremento de la actividad oculomotora durante la fase REM, que consistió en un aumento de la amplitud, la velocidad pico, la densidad y la duración de los movimientos oculares rápidos. Estos cambios se acompañaron de una disminución de la latencia de aparición del primer movimiento ocular desde el inicio de la transición a fase REM.

En la literatura existe una importante laguna de conocimiento acerca del efecto de la privación sobre las características de los movimientos oculares rápidos durante el sueño. No se han hallado trabajos previos que analicen la modificación de la magnitud o de la duración de los movimientos oculares rápidos en respuesta a la privación. Sin embargo, algunos estudios ofrecen información acerca del impacto de la privación sobre la densidad de movimientos oculares durante la fase REM.

El incremento de la densidad de movimientos oculares rápidos durante la fase REM que se observó en el presente trabajo concuerda con el incremento de los brotes de actividad oculomotora que se reporta en el gato en estudios clásicos en los que se realizaron privaciones totales de sueño de varias semanas de duración (Ferguson y Dement, 1967). Asimismo, dado que los movimientos oculares rápidos y las mioclonias de la musculatura esquelética son manifestaciones del mismo fenómeno (Escudero y Márquez-Ruiz, 2008), se puede considerar que los presentes resultados coinciden con las observaciones de Morden y colaboradores (1967), que apreciaron una acentuación de las mioclonias tras la privación de 3 días por el método de la plataforma. Sin embargo, contrasta con los decrementos en la densidad de movimientos oculares rápidos que se reportan en humanos en respuesta a la restricción de sueño (Feinberg y col., 1987 y 1988; Lucidi y col., 1996) y con la relación inversa observada por Aserinsky (1973) entre la duración de la vigilia y la densidad de movimientos durante los episodios de fase REM subsiguientes. Esta discrepancia puede deberse a varios motivos. Uno de ellos radica en que las privaciones realizadas en humanos, que fueron de 1 día o menos (Feinberg y col.,

1987 y 1988; Lucidi y col., 1996), podrían no haber sido lo bastante duraderas como para provocar una intensificación de la actividad oculomotora durante la fase REM. La tolerancia de los mamíferos pequeños a la privación de fase REM es menor que la de los mamíferos de mayor tamaño (Amici y col., 2008), incluyendo al humano. Se propone que esto podría deberse a la elevada tasa metabólica de los mamíferos pequeños (Savage y West, 2007). Por ello, la rata podría manifestar los síntomas de carencia de este estado con anticipación respecto a otros modelos animales de mayor tamaño (Morden y col., 1967). Esto implica que podrían ser precisas privaciones de mayor duración para inducir en los humanos un incremento de la densidad de movimientos oculares rápidos comparable con el que se obtuvo en la rata en la presente Tesis Doctoral.

Otra posible explicación para la discrepancia entre los resultados obtenidos en la rata y los reportados en humanos reside en que los experimentos en humanos consistieron en una privación total de sueño y no en una privación selectiva de la fase REM. Mientras que la privación total de sueño normalmente produce en la rata un rebote inicial de fase REM, seguido o no por un rebote ligero de fase NREM (Borbély y Neuhaus, 1979; Endo y col., 1997; Everson y col., 1989; Rechtschaffen y col., 1999), en humanos provoca un rebote de fase NREM sin que se detecten incrementos significativos de la cantidad de fase REM (De Gennaro y Ferrara, 2000; Dijk y Czeisler, 1993; Nakazawa y col., 1978). Sin embargo, la privación selectiva de fase REM inducida por el tratamiento con antidepresivos (Landolt y de Boer, 2001) o por medios instrumentales (Dement y col., 1966) provoca la aparición de marcados rebotes de fase REM, lo que sugiere que en los humanos el incremento de la presión de fase REM da lugar a un rebote cuando la presión de fase NREM es baja (Brunner y col., 1990). Por tanto, cabe la posibilidad de que, en ausencia del antagonismo ejercido por la presión de fase NREM, en los humanos también se pudiera producir un aumento de la densidad de movimientos oculares rápidos comparable con lo observado en la rata tras la privación de fase REM.

Además del incremento en la densidad de movimientos oculares rápidos, Ferguson y Dement (1967) reportaron un progresivo incremento en la densidad de ondas PGO en el gato a lo largo de un periodo de 30 días de restricción severa del tiempo

total de sueño. En conjunto, Ferguson y Dement (1967) interpretaron las modificaciones derivadas de la privación como un incremento compensatorio de la intensidad de la fase REM. Dado que la ocurrencia de ondas PGO coincide con la generación de movimientos oculares durante la fase REM (Escudero y Márquez-Ruiz, 2008; Michel y col., 1964), el incremento paralelo de ambas variables resulta lógico. Karashima y colaboradores hallaron que la ocurrencia de ondas PGO en el gato (Karashima y col., 2002) y de ondas P en la rata (Karashima y col., 2004 y 2005) correlaciona además con un aumento de la frecuencia de la oscilación theta registrada en el hipocampo. Esto podría constituir un vínculo entre los incrementos post-privación de la frecuencia del EEG y de la densidad de movimientos oculares rápidos reportados en la presente Tesis. Adicionalmente, dado que el incremento de la densidad de ondas P en la rata se ha relacionado con una mejora de la eficiencia del aprendizaje (Datta, 2000 y 2006), la densidad aumentada de movimientos oculares rápidos y el incremento de la frecuencia del EEG durante el periodo de recuperación podrían ser correlatos de un proceso homeostático para la reversión de las deficiencias fisiológicas y cognitivas ocasionadas por la carencia de fase REM.

Tanto los movimientos oculares rápidos como las mioclonias de la musculatura esquelética que se producen durante la fase REM se corresponden con la ocurrencia de entradas excitadoras que provocan esporádicamente la generación de potenciales de acción en las motoneuronas, que se encuentran hiperpolarizadas tónicamente durante esta fase (Chase y Morales, 1982; Escudero y Márquez-Ruiz, 2008). Brooks y Peever (2016) afirman que la cinética de aparición de las mioclonias en el músculo y el incremento de su densidad se relacionan con el cambio del balance excitación-inhibición que ocurre a lo largo del inicio de la fase REM, que a su vez depende de la neurotransmisión glicinérgica y GABAérgica. El bloqueo de los receptores de glicina y GABA incrementa la densidad de mioclonias, especialmente durante la primera parte de los episodios de fase REM (Brooks y Peever, 2016). De este modo, el incremento de la densidad de movimientos oculares rápidos provocado por la privación de fase REM podría explicarse por un cambio en el balance excitación-inhibición a favor de la excitación, lo que concordaría con el incremento de la excitabilidad de diferentes estructuras encefálicas discutido en apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral.

Asimismo, el hecho de que este incremento de la densidad de mioclonias sea especialmente marcado durante el inicio de la fase REM (Brooks y Peever, 2016) podría explicar la disminución de la latencia de aparición del primer movimiento ocular.

En el presente trabajo se halló que la relación amplitud-velocidad pico de los movimientos oculares rápidos cambió tras la privación de fase REM. Las pendientes de las rectas de ajuste descendieron levemente, indicando que los movimientos de mayor amplitud tendieron a presentar una velocidad proporcionalmente más baja tras la privación de fase REM que en la situación inicial. Durante la vigilia, la velocidad y la duración de los movimientos oculares aumentan de forma directamente proporcional a la amplitud de estos, y a esta relación se la denomina “secuencia principal” (Bahill y col., 1975). Se trata de una relación muy constante y característica, que permite distinguir los diferentes tipos de movimientos oculares (Vanni-Mercier y col., 1994) e identificar movimientos con características anormales (Bahill y col., 1975). Durante la fase REM también se ha reportado la existencia de una relación lineal entre la amplitud y la velocidad pico de los movimientos oculares rápidos, indicando que las propiedades de estos se rigen por una secuencia principal tanto en la rata (Sánchez-López y Escudero, 2011) como en el gato (Márquez-Ruiz y Escudero, 2008; Vanni-Mercier y col., 1994). La reducción de la pendiente amplitud-velocidad pico de los movimientos oculares rápidos tras la privación de fase REM supone, por tanto, una ligera desviación de la secuencia principal e indica que el procesamiento oculomotor subyacente podría encontrarse alterado. Sin embargo, se sabe que la relación amplitud-velocidad pico de los movimientos oculares no es lineal, sino que describe una curva de saturación, de forma que la velocidad pico tiende a incrementarse en menor medida cuando la amplitud de los movimientos oculares supera un determinado umbral (Inchingolo y Spanio, 1985). Por tanto, es posible que la leve reducción de la pendiente de la recta de ajuste amplitud-velocidad pico que se observó en el presente trabajo se deba, sencillamente, a que los movimientos oculares rápidos fueron de mayor amplitud tras la privación de fase REM.

5.5.2 Implicaciones del incremento de la actividad oculomotora durante la fase REM

La aparición anticipada de los movimientos oculares rápidos tras la privación de fase REM y el incremento de su magnitud y densidad sugieren un incremento de la actividad oculomotora, que contrasta con la disminución de la magnitud de las fases rápidas del reflejo vestibulo-ocular durante la vigilia. Cabe reflexionar sobre si dicha acentuación constituye simplemente un epifenómeno de la presión de fase REM o si, por el contrario, podría poseer un carácter homeostático y jugar un papel en la reversión de las alteraciones provocadas por la privación.

Berger (1969) propuso que la función de la fase REM podría ser la preparación del sistema oculomotor para generar movimientos oculares voluntarios conjugados de gran precisión, lo que requiere un alto grado de coordinación neuromuscular. Según esta hipótesis, la inervación de la musculatura extraocular durante la fase REM tendría un efecto facilitador sobre esta coordinación, permitiendo el establecimiento de conexiones neuromusculares que posteriormente se refinarían durante la vigilia por la entrada visual (Berger, 1969). En el mismo sentido, las mioclonias se han comenzado a relacionar con la maduración, la plasticidad y el refinamiento del sistema sensoriomotor a lo largo del desarrollo juvenil y de la vida adulta de los animales (Blumberg y col., 2013; Peever y Fuller, 2017; Petersson y col., 2003; Tiriac y col., 2015). Se cree que la aparición de mioclonias en la musculatura esquelética –incluyendo a la musculatura extraocular– en el marco de una atonía muscular generalizada podría proveer retroalimentación sensorial crucial para el refinamiento y la adaptación del sistema sensoriomotor ante las condiciones cambiantes del organismo (Tiriac y col., 2015). Asimismo, se ha propuesto que la atonía a la que se superponen estas activaciones de la musculatura podría mejorar la relación de la retroalimentación sensorial de interés frente al ruido de fondo (Blumberg, 2010; Tiriac y col., 2015). Por consiguiente, la acentuación de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM que se ha observado en el presente trabajo podría corresponderse con un proceso homeostático para compensar la supresión de este refinamiento sensoriomotor que supuso el periodo de privación por el método de la plataforma. De ser así, los presentes resultados apoyarían la existencia de una “intensificación” de la fase REM en respuesta a la privación de sueño, propuesta

hace décadas por Morden (1967) y por Ferguson y Dement (1967 y 1968). Adicionalmente, cabría hipotetizar que otros sistemas motores podrían, como el oculomotor, verse afectados negativamente por la privación de fase REM y experimentar una compensación homeostática posterior relacionada con la intensificación de las mioclonias.

6 CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un índice que permite la identificación de los estados del ciclo vigilia-sueño en la rata mediante el uso exclusivo de la actividad electroencefalográfica.

2. Se ha determinado que la privación de fase REM induce un incremento generalizado de la frecuencia del EEG.

3. Se ha demostrado que un incremento en el número de episodios de fase REM por unidad de tiempo y un aumento de la frecuencia de la actividad theta son buenos indicadores de la presión de fase REM.

4. Se ha demostrado que la privación de fase REM provoca una reducción de la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular y de la amplitud y velocidad pico de sus fases rápidas. Por tanto, la privación de fase REM podría tener un efecto perjudicial sobre los sistemas motores durante la vigilia.

5. Se ha determinado que la privación de fase REM provoca un incremento de la densidad, la amplitud, la velocidad pico y la duración de los movimientos oculares rápidos durante la fase REM, así como una disminución de la latencia de aparición del primer movimiento ocular rápido. Estos cambios podrían estar relacionados con una compensación homeostática de los efectos inducidos por la privación de fase REM.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amici, R., Cerri, M., Ocampo-Garcés, A., Baracchi, F., Dentico, D., Jones, C.A., Luppi, M., Perez, E., Parmeggiani, P.L. y Zamboni, G. (2008). Cold exposure and sleep in the rat: REM sleep homeostasis and body size. *Sleep*. 31(5): 708-715.

Anaclet, C., Ferrari, L., Arrigoni, E., Bass, C.E., Saper, C.B., Lu, J. y Fuller, P.M. (2014). The GABAergic parafacial zone is a medullary slow wave sleep-promoting center. *Nat Neurosci*. 17(9): 1217-1224.

Anafi, R.C., Kayser, M.S. y Raizen, D.M. (2019). Exploring phylogeny to find the function of sleep. *Nat Rev Neurosci*. 20(2): 109-116.

Argenti, D. y D'Mello, A.P. (1994). The pharmacodynamics of desipramine and desmethyl-desipramine in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 270(2): 512-519.

Arrigoni, E., Chen, M.C. y Fuller, P.M. (2016). The anatomical, cellular and synaptic basis of motor atonia during rapid eye movement sleep. *J Physiol*. 594(19): 5391-5414.

Arshad, Q., Nigmatullina, Y. y Bronstein, A.M. (2013). Handedness-related cortical modulation of the vestibular-ocular reflex. *J Neurosci*. 33(7): 3221-3227.

Aserinsky, E. (1973). Relationship of rapid eye movement density to the prior accumulation of sleep and wakefulness. *Psychophysiology*. 10(6): 545-558.

Aserinsky, E. y Kleitman, N. (1953). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 118(3062): 273-274.

Aserinsky, E. y Kleitman, N. (1955). Two types of ocular motility occurring in sleep. *J Appl Physiol*. 8(1): 1-10.

Atallah, B.V. y Scanziani, M. (2009). Instantaneous modulation of gamma oscillation frequency by balancing excitation with inhibition. *Neuron*. 62(4): 566-577.

Badawy, R.A., Curatolo, J.M., Newton, M., Berkovic, S.F. y Macdonell, R.A. (2006). Sleep deprivation increases cortical excitability in epilepsy: syndrome-specific effects. *Neurology*. 67(6): 1018-1022.

Bahill, A.T., Clark, M.R. y Stark, L. (1975). The main sequence, a tool for studying human eye movements. *Math Biosci*. 24(3-4): 191-204.

Basheer, R., Magner, M., McCarley, R.W. y Shiromani, P.J. (1998). REM sleep deprivation increases the levels of tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter mRNA in the locus coeruleus. *Mol Brain Res*. 57(2): 235-240.

Bastianini, S., Alvente, S., Berteotti, C., Lo Martire, V., Silvani, A., Swoap, S.J., Valli, A., Zoccoli, G. y Cohen, G. (2017). Accurate discrimination of the wake-sleep states of mice using non-invasive whole-body plethysmography. *Sci Rep*. 7: 41698.

Baumann, P., Gaillard, J.M., Perey, M., Justafré, J.C. y Le, P. (1983). Relationships between brain concentrations of desipramine and paradoxical sleep inhibition in the rat. *J Neural Transm.* 56(2-3): 105-116.

Beersma, D.G., Dijk, D.J., Blok, C.G. y Everhardus, I. (1990). REM sleep deprivation during 5 hours leads to an immediate REM sleep rebound and to suppression of non-REM sleep intensity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 76(2): 114-122.

Benington, J.H., Kodali, S.K. y Heller, H.C. (1994a). Scoring transitions to REM sleep in rats based on the EEG phenomena of pre-REM sleep: an improved analysis of sleep structure. *Sleep.* 17(1): 28-36.

Benington, J.H., Woudenberg, M.C. y Heller, H.C. (1994b). REM-sleep propensity accumulates during 2-h REM-sleep deprivation in the rest period in rats. *Neurosci Lett.* 180(1): 76-80.

Berger, R.J. (1969). Oculomotor control: a possible function of REM sleep. *Psychol Rev.* 76(2): 144-164.

Berger, R.J. y Phillips, N.H. (1995). Energy conservation and sleep. *Behav Brain Res.* 69(1-2): 65-73.

Bjorvatn, B., Fagerland, S. y Ursin, R. (1998). EEG power densities (0.5-20 Hz) in different sleep-wake stages in rats. *Physiol Behav.* 63(3): 413-417.

Blanco-Centurion, C.A. y Salin-Pascual, R.J. (2001). Extracellular serotonin levels in the medullary reticular formation during normal sleep and after REM sleep deprivation. *Brain Res.* 923(1-2): 128-136.

Blanks, R.H. y Torigoe, Y. (1989). Orientation of the semicircular canals in rat. *Brain Res.* 487(2): 278-287.

Blumberg, M.S. (2010). Beyond dreams: do sleep-related movements contribute to brain development? *Front Neurol.* 1: 140.

Blumberg, M.S., Coleman, C.M., Gerth, A.I. y McMurray, B. (2013). Spatiotemporal structure of REM sleep twitching reveals developmental origins of motor synergies. *Curr Biol.* 23(21): 2100-2109.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M.H., Barbagli, B., Fort, P. y Luppi, P.H. (2002). The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci.* 16(10): 1959-1973.

Bon, L., Corazza, R. y Inchingolo, P. (1980). Eye movements during the waking-sleep cycle of the encéphale isolé semichronic cat preparation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 48(3): 327-340.

Borbély, A.A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol.* 1(3): 195-204.

Borbély, A.A., Baumann, F., Brandeis, D., Strauch, I. y Lehmann, D. (1981). Sleep deprivation: effect on sleep stages and EEG power density in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 51(5): 483-493.

Borbély, A.A. y Neuhaus, H.U. (1979). Sleep-deprivation: effects on sleep and EEG in the rat. *J Comp Physiol.* 133(1): 71-87.

Borbély, A.A., Tobler, I. y Hanagasioglu, M. (1984). Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behav Brain Res.* 14(3): 171-182.

Born, J. y Feld, G.B. (2012). Sleep to upscale, sleep to downscale: balancing homeostasis and plasticity. *Neuron.* 75(6): 933-935.

Boyce, R., Glasgow, S.D., Williams, S. y Adamantidis, A. (2016). Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science.* 352(6287): 812-816.

Bragin, A., Jandó, G., Nádasdy, Z., Hetke, J., Wise, K. y Buzsáki, G. (1995). Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci.* 15(1 Pt 1): 47-60.

Brooks, P.L. y Peever, J. (2016). A temporally controlled inhibitory drive coordinates twitch movements during REM sleep. *Curr Biol.* 26(9): 1177-1182.

Brown, R.E., Basheer, R., McKenna, J.T., Strecker, R.E. y McCarley, R.W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev.* 92(3): 1087-1187.

Brunner, D.P., Dijk, D.J., Tobler, I. y Borbély, A.A. (1990). Effect of partial sleep deprivation on sleep stages and EEG power spectra: evidence for non-REM and REM sleep homeostasis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 75(6): 492-499.

Büttner-Ennever, J.A. y Horn, A.K. (2002). The neuroanatomical basis of oculomotor disorders: the dual motor control of extraocular muscles and its possible role in proprioception. *Curr Opin Neurol.* 15(1): 35-43.

Buzsáki, G., Logothetis, N. y Singer, W. (2013). Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron.* 80(3): 751-764.

Buzsáki, G. y Wang, X.J. (2012). Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci.* 35: 203-225.

Cajochen, C., Brunner, D.P., Kräuchi, K., Graw, P. y Wirz-Justice, A. (1995). Power density in theta/alpha frequencies of the waking EEG progressively increases during sustained wakefulness. *Sleep.* 18(10): 890-894.

Campbell, S.S. y Tobler, I. (1984). Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci Biobehav Rev.* 8(3): 269-300.

Canolty, R.T., Edwards, E., Dalal, S.S., Soltani, M., Nagarajan, S.S., Kirsch, H.E., Berger, M.S., Barbaro, N.M. y Knight, R.T. (2006). High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science.* 313(5793): 1626-1628.

Cao, R., Huang, F., Wang, P., Chen, C., Zhu, G., Chen, L. y Wu, G. (2015). Chronic sleep deprivation alters the myosin heavy chain isoforms in the masseter muscle in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 53(5): 430-435.

Chase, M.H. (1983). Synaptic mechanisms and circuitry involved in motoneuron control during sleep. *Int Rev Neurobiol.* 24: 213-258.

Chase, M.H. (2013). Motor control during sleep and wakefulness: clarifying controversies and resolving paradoxes. *Sleep Med Rev.* 17(4): 299-312.

Chase, M.H. y Morales, F.R. (1982). Phasic changes in motoneuron membrane potential during REM periods of active sleep. *Neurosci Lett.* 34(2): 177-182.

Chase, M.H. y Morales, F.R. (1983). Subthreshold excitatory activity and motoneuron discharge during REM periods of active sleep. *Science.* 221(4616): 1195-1198.

Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J.A., Clay Williams, S., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T.E., Nakazato, M., Hammer, R.E., Saper, C.B. y Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell.* 98(4): 437-451.

Chen, K.S., Xu, M., Zhang, Z., Chang, W.C., Gaj, T., Schaffer, D.V. y Dan, Y. (2018). A hypothalamic switch for REM and non-REM sleep. *Neuron.* 97(5): 1168-1176.

Cirelli, C. (2017). Sleep, synaptic homeostasis and neuronal firing rates. *Curr Opin Neurobiol.* 44: 72-79.

Clark, F.M. y Radulovacki, M. (1988). An inexpensive sleep-wake state analyzer for the rat. *Physiol Behav.* 43(5): 681-683.

Cohen, H.B. y Dement, W.C. (1965). Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science.* 150(3701): 1318-1319.

Cohen, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 20(1): 37-46.

Colgin, L.L. (2013). Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annu Rev Neurosci.* 36: 295-312.

Colgin, L.L., Denninger, T., Fyhn, M., Hafting, T., Bonnevie, T., Jensen, O., Moser, M.B. y Moser, E.I. (2009). Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature.* 462(7271): 353-357.

Collins, W.E. (1962). Effects of mental set upon vestibular nystagmus. *J Exp Psychol.* 63(2): 191-197.

Collins, W.E. (1974). Arousal and vestibular habituation. En H.H. Kornhuber, edt. *Vestibular System Part 2: Psychophysics, Applied Aspects and General Interpretations.* pp. 361-368. Springer, Berlin, Heidelberg.

Collins, W.E. (1988). Some effects of sleep loss on vestibular responses. *Aviat Space Environ Med.* 59(6): 523-529.

Collins, W.E., Crampton, G.H. y Posner, J.B. (1961). Effects of mental activity on vestibular nystagmus and the electroencephalogram. *Nature.* 190: 194-195.

Colom, L.V., García-Hernández, A., Castañeda, M.T., Perez-Cordova, M.G. y Garrido-Sanabria, E.R. (2006). Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: potential antiepileptic effects of theta rhythm generation. *J Neurophysiol.* 95(6): 3645-3653.

Corsi-Cabrera, M., Ponce-De-Leon, M., Juarez, J. y Ramos, J. (1994). Effects of paradoxical sleep deprivation and stress on the waking EEG of the rat. *Physiol Behav.* 55(6): 1021-1027.

Curthoys, I.S. (2002). Generation of the quick phase of horizontal vestibular nystagmus. *Exp Brain Res.* 143(4): 397-405.

Dailey, J.W. y Jobe, P.C. (1985). Anticonvulsant drugs and the genetically epilepsy-prone rat. *Fed Proc.* 44(10): 2640-2644.

Datta, S. (2000). Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat: a mechanism for sleep-dependent plasticity. *J Neurosci.* 20(22): 8607-8613.

Datta, S. (2006). Activation of phasic pontine-wave generator: a mechanism for sleep-dependent memory processing. *Sleep Biol Rhythms.* 4(1): 16-26.

Dattilo, M., Antunes, H.K., Medeiros, A., Mônico-Neto, M., Souza, H.S., Lee, K.S., Tufik, S. y de Mello, M.T. (2012). Paradoxical sleep deprivation induces muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 45(3): 431-433.

De Gennaro, L. y Ferrara, M. (2000). Sleep deprivation and phasic activity of REM sleep: independence of middle-ear muscle activity from rapid eye movements. *Sleep.* 23(1): 81-85.

De Gennaro, L., Ferrara, M. y Bertini, M. (2000a). The relationship between frequency of rapid eye movements in REM sleep and SWS rebound. *J Sleep Res.* 9(2): 155-159.

De Gennaro, L., Ferrara, M. y Bertini, M. (2000b). Muscle twitch activity during REM sleep: effect of sleep deprivation and relation with rapid eye movement activity. *Psychobiology.* 28(3): 432-436.

De Gennaro, L., Ferrara, M., Urbani, L. y Bertini, M. (2000c). Oculomotor impairment after 1 night of total sleep deprivation: a dissociation between measures of speed and accuracy. *Clin Neurophysiol.* 111(10): 1771-1778.

De Lisi, L. (1932). Su di un fenomeno motorio costante del sonno normale: le mioclonie ipniche fisiologiche. *Riv Pat Nerv Ment.* 39: 481-496.

Deboer, T. (1998). Brain temperature dependent changes in the electroencephalogram power spectrum of humans and animals. *J Sleep Res.* 7(4): 254-262.

Deboer, T. (2002). Electroencephalogram theta frequency changes in parallel with euthermic brain temperature. *Brain Res.* 930(1-2): 212-215.

Deboer, T. y Tobler, I. (1995). Temperature dependence of EEG frequencies during natural hypothermia. *Brain Res.* 670(1): 153-156.

Delgado-García, J.M. (2000). Why move the eyes if we can move the head? *Brain Res Bull.* 52(6): 475-482.

Dement, W. (1958). The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 10(2): 291-296.

Dement, W., Greenberg, S. y Klein, R. (1966). The effect of partial REM sleep deprivation and delayed recovery. *J Psychiatr Res.* 4(3): 141-152.

Dement, W. y Kleitman, N. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 9(4): 673-690.

DeVane, C.L., Simpkins, J.W. y Stout, S.A. (1984). Cerebral and blood pharmacokinetics of imipramine and its active metabolites in the pregnant rat. *Psychopharmacology (Berl).* 84(2): 225-230.

Diekelmann, S. y Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci.* 11(2): 114-126.

Dijk, D.J., Beersma, D.G. y Daan, S. (1987). EEG power density during nap sleep: reflection of an hourglass measuring the duration of prior wakefulness. *J Biol Rhythms.* 2(3): 207-219.

Dijk, D.J. y Czeisler, C.A. (1993). Body temperature is elevated during the rebound of slow-wave sleep following 40-h of sleep deprivation on a constant routine. *J Sleep Res.* 2(3): 117-120.

Dingell, J.V., Sulser, F. y Gillette, J.R. (1964). Species differences in the metabolism of imipramine and desmethyylimipramine (DMI). *J Pharmacol Exp Ther.* 143(1): 14-22.

Donaldson, I.M. (2000). The functions of the proprioceptors of the eye muscles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355(1404): 1685-1754.

Dowd, P.J., Moore, E.W. y Cramer, R.L. (1975). Relationships of fatigue and motion sickness to vestibulo-ocular responses to coriolis stimulation. *Hum Factors.* 17(1): 98-105.

Eder, H.G., Jones, D.B. y Fisher, R.S. (1997). Local perfusion of diazepam attenuates interictal and ictal events in the bicuculline model of epilepsy in rats. *Epilepsia.* 38(5): 516-521.

Endo, T., Schwierin, B., Borbély, A.A. y Tobler, I. (1997). Selective and total sleep deprivation: effect on the sleep EEG in the rat. *Psychiatry Res.* 66(2-3): 97-110.

Engels, M.M., Hillebrand, A., van der Flier, W.M., Stam, C.J., Scheltens, P. y van Straaten, E.C. (2016). Slowing of hippocampal activity correlates with cognitive decline in early onset Alzheimer's disease. An MEG study with virtual electrodes. *Front Hum Neurosci.* 10: 238.

Escudero, M. y Márquez-Ruiz, J. (2008). Tonic inhibition and ponto-geniculo-occipital-related activities shape abducens motoneuron discharge during REM sleep. *J Physiol.* 586(14): 3479-3491.

Escudero, M. y Vidal, P.P. (1996). A quantitative study of electroencephalography, eye movements and neck electromyography characterizing the sleep-wake cycle of the guinea-pig. *Eur J Neurosci.* 8(3): 572-580.

Everson, C.A. (1995). Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav Brain Res.* 69(1-2): 43-54.

Everson, C.A., Gilliland, M.A., Kushida, C.A., Pilcher, J.J., Fang, V.S., Refetoff, S., Bergmann, B.M. y Rechtschaffen, A. (1989). Sleep deprivation in the rat: IX. Recovery. *Sleep.* 12(1): 60-67.

Everson, C.A., Smith, C.B. y Sokoloff, L. (1994). Effects of prolonged sleep deprivation on local rates of cerebral energy metabolism in freely moving rats. *J Neurosci.* 14(11 Pt 2): 6769-6778.

Farooqui, S.M., Brock, J.W. y Zhou, J. (1996). Changes in monoamines and their metabolite concentrations in REM sleep-deprived rat forebrain nuclei. *Pharmacol Biochem Behav.* 54(2): 385-391.

Feinberg, I., Baker, T., Leder, R. y March, J.D. (1988). Response of delta (0-3 Hz) EEG and eye movement density to a night with 100 minutes of sleep. *Sleep.* 11(5): 473-487.

Feinberg, I., Floyd, T.C. y March, J.D. (1987). Effects of sleep loss on delta (0.3-3 Hz) EEG and eye movement density: new observations and hypotheses. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 67(3): 217-221.

Feinstein, A.R. y Cicchetti, D.V. (1990). High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes. *J Clin Epidemiol.* 43(6): 543-549.

Feng, P.F., Shaw, P., Bergmann, B.M., Obermeyer, W., Tsai, L.L., Zenko, C.E. y Rechtschaffen, A. (1995). Sleep deprivation in the rat: XX. Differences in wake and sleep temperatures during recovery. *Sleep.* 18(9): 797-804.

Ferguson, J. y Dement, W. (1967). The effect of variations in total sleep time on the occurrence of rapid eye movement sleep in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 22(1): 2-10.

Ferguson, J. y Dement, W. (1968). Changes in the intensity of REM sleep with deprivation. *Psychophysiology.* 4(3): 380-381.

Fernandez, C. y Goldberg, J.M. (1971). Physiology of peripheral neurons innervating semicircular canals of the squirrel monkey. II. Response to sinusoidal stimulation and dynamics of peripheral vestibular system. *J Neurophysiol.* 34(4): 661-675.

Fimm, B. y Blankenheim, A. (2016). Effect of sleep deprivation and low arousal on eye movements and spatial attention. *Neuropsychologia.* 92: 115-128.

Fleiss, J.L., Levin, B. y Paik, M.C. (2013). Statistical methods for rates and proportions. John Wiley & Sons, New Jersey.

Francesconi, R. y Mager, M. (1976). Thermoregulatory effects of monoamine potentiators and inhibitors in the rat. *Am J Physiol.* 231(1): 148-152.

Franken, P. (2002). Long-term vs. short-term processes regulating REM sleep. *J Sleep Res.* 11(1): 17-28.

Franken, P., Dijk, D.J., Tobler, I. y Borbély, A.A. (1991). Sleep deprivation in the rat: effects of electroencephalogram power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am J Physiol.* 261(1 Pt 2): 198-208.

Freeman, W.J., Rogers, L.J., Holmes, M.D. y Silbergeld, D.L. (2000). Spatial spectral analysis of human electrocorticograms including the alpha and gamma bands. *J Neurosci Methods.* 95(2): 111-121.

Fries, P., Nikolić, D. y Singer, W. (2007). The gamma cycle. *Trends Neurosci.* 30(7): 309-316.

Fuchs, A.F. y Robinson, D.A. (1966). A method for measuring horizontal and vertical eye movement chronically in the monkey. *J Appl Physiol.* 21(3): 1068-1070.

Fuller, P.M., Gooley, J.J. y Saper, C.B. (2006). Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. *J Biol Rhythms.* 21(6): 482-493.

Fuller, P.M., Sherman, D., Pedersen, N.P., Saper, C.B. y Lu, J. (2011). Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *J Comp Neurol.* 519(5): 933-956.

Gandolfo, G., Glin, L., Lacoste, G., Rodi, M. y Gottesmann, C. (1988). Automatic sleep-wake scoring in the rat on microcomputer APPLE II. *Int J Biomed Comput.* 23(1-2): 83-95.

Garcés, P., Vicente, R., Wibrál, M., Pineda-Pardo, J.Á., López, M.E., Aurtenetxe, S., Marcos, A., de Andrés, M.E., Yus, M., Sancho, M., Maestú, F. y Fernández, A. (2013). Brain-wide slowing of spontaneous alpha rhythms in mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci.* 5: 100.

Garzón, M., de Andrés, I. y Reinoso-Suárez, F. (1997). Neocortical and hippocampal electrical activities are similar in spontaneous and cholinergic-induced REM sleep. *Brain Res.* 766(1-2): 266-270.

Gillespie, A.K., Jones, E.A., Lin, Y.H., Karlsson, M.P., Kay, K., Yoon, S.Y., Tong, L.M., Nova, P., Carr, J.S., Frank, L.M. y Huang, Y. (2016). Apolipoprotein E4 causes age-dependent disruption of slow gamma oscillations during hippocampal sharp-wave ripples. *Neuron.* 90(4): 740-751.

Glenn, L.L., Foutz, A.S. y Dement, W.C. (1978). Membrane potential of spinal motoneurons during natural sleep in cats. *Sleep.* 1(2): 199-204.

Goldberg, J.M. y Fernandez, C. (1971). Physiology of peripheral neurons innervating semicircular canals of the squirrel monkey. I. Resting discharge and response to constant angular accelerations. *J Neurophysiol.* 34(4): 635-660.

Goldich, Y., Barkana, Y., Pras, E., Zadok, D., Hartstein, M. y Morad, Y. (2010). The effects of sleep deprivation on oculomotor responses. *Curr Eye Res.* 35(12): 1135-1141.

Gottesmann, C., Kirkham, P.A., LaCoste, G., Rodrigues, L. y Arnaud, C. (1977). Automatic analysis of the sleep-waking cycle in the rat recorded by miniature telemetry. *Brain Res.* 132(3): 562-568.

Grahnstedt, S. (1986). Sleep deprivation and kindled seizures. *Exp Neurol.* 92(1): 248-260.

Grahnstedt, S. y Ursin, R. (1985). Platform sleep deprivation affects deep slow wave sleep in addition to REM sleep. *Behav Brain Res.* 18(3): 233-239.

Grosmark, A.D., Mizuseki, K., Pastalkova, E., Diba, K. y Buzsáki, G. (2012). REM sleep reorganizes hippocampal excitability. *Neuron.* 75(6): 1001-1007.

Haas, H. y Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 4(2): 121-130.

Hajnik, T., Lai, Y.Y. y Siegel, J.M. (2000). Atonia-related regions in the rodent pons and medulla. *J Neurophysiol.* 84(4): 1942-1948.

Herrmann, C.S. y Demiralp, T. (2005). Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders. *Clin Neurophysiol.* 116(12): 2719-2733.

Highstein, S.M. y McCrea, R.A. (1988). The anatomy of the vestibular nuclei. En J.A. Büttner-Ennever, ed. *Reviews of Oculomotor Research.* pp. 177-202. Elsevier, Amsterdam.

Huber, R., Mäki, H., Rosanova, M., Casarotto, S., Canali, P., Casali, A.G., Tononi, G. y Massimini, M. (2013). Human cortical excitability increases with time awake. *Cereb Cortex.* 23(2): 332-338.

Inchingolo, P. y Spanio, M. (1985). On the identification and analysis of saccadic eye movements - a quantitative study of the processing procedures. *IEEE Trans Biomed Eng.* 32(9): 683-695.

Inoué, S., Honda, K. y Komoda, Y. (1995). Sleep as neuronal detoxification and restitution. *Behav Brain Res.* 69(1-2): 91-96.

Isaacson, J.S. y Scanziani, M. (2011). How inhibition shapes cortical activity. *Neuron.* 72(2): 231-243.

Ito, J., Markham, C.H. y Curthoys, I.S. (1987). Modification of vestibular-induced pause neuron firing during anesthesia and light sleep. *Exp Neurol.* 95(3): 571-586.

Jing, W., Wang, Y., Fang, G., Chen, M., Xue, M., Guo, D., Yao, D. y Xia, Y. (2016). EEG bands of wakeful rest, slow-wave and rapid-eye-movement sleep at different brain areas in rats. *Front Comput Neurosci.* 10: 79.

Jobe, P.C. y Browning, R.A. (2005). The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. *Epilepsy Behav.* 7(4): 602-619.

Joiner, W.J. (2016). Unraveling the evolutionary determinants of sleep. *Curr Biol.* 26(20): R1073-R1087.

Jones, B.E. (1991). Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience.* 40(3): 637-656.

Jones, B.E. (2005). From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci.* 26(11): 578-586.

Jouvet, D., Vimont, P., Delorme, F. y Jouvet, M. (1964). Étude de la privation sélective de la phase paradoxale du sommeil chez le chat. *C R Seances Soc Biol Fil.* 158: 756-759.

Jouvet, M. (1962). Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch Ital Biol.* 100(2): 125-206.

Jouvet, M. (1967). The states of sleep. *Sci Am.* 216(2): 62-72.

Jouvet, M. (2004). How sleep was dissociated into two states: telencephalic and rhombencephalic sleep? *Arch Ital Biol.* 142(4): 317-326.

Jouvet, M. y Michel, F. (1959). Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique. *C R Seances Soc Biol Fil.* 153(3): 422-425.

Jouvet, M., Michel, F. y Courjon, J. (1959). Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique. *C R Seances Soc Biol Fil.* 153(6): 1024-1028.

Jung, J.H., Kim, M., Lee, S.J., Lee, E., Lee, S.A., Lee, J.D., Choi, J.H. y Kim, B.G. (2018). Effect of sleep deprivation on hearing levels in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 112: 169-175.

Kant, G.J., Eggleston, T., Landman-Roberts, L., Kenion, C.C., Driver, G.C. y Meyerhoff, J.L. (1985). Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol Biochem Behav.* 22(4): 631-634.

Karashima, A., Nakamura, K., Sato, N., Nakao, M., Katayama, N. y Yamamoto, M. (2002). Phase-locking of spontaneous and elicited ponto-geniculo-occipital waves is associated with acceleration of hippocampal theta waves during rapid eye movement sleep in cats. *Brain Res.* 958(2): 347-358.

Karashima, A., Nakao, M., Honda, K., Iwasaki, N., Katayama, N. y Yamamoto, M. (2004). Theta wave amplitude and frequency are differentially correlated with pontine waves and rapid eye movements during REM sleep in rats. *Neurosci Res.* 50(3): 283-289.

Karashima, A., Nakao, M., Katayama, N. y Honda, K. (2005). Instantaneous acceleration and amplification of hippocampal theta wave coincident with phasic pontine activities during REM sleep. *Brain Res.* 1051(1-2): 50-56.

Karasinski, P., Stinus, L., Robert, C. y Limoge, A. (1994). Real-time sleep-wake scoring in the rat using a single EEG channel. *Sleep.* 17(2): 113-119.

- Keller, E.L. (1974). Participation of medial pontine reticular formation in eye movement generation in monkey. *J Neurophysiol.* 37(2): 316-332.
- Kelley, M.W. (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci.* 7(11): 837-849.
- Khazan, N. y Brown, P. (1970). Differential effects of three tricyclic antidepressants on sleep and REM sleep in the rat. *Life Sci.* 9(5): 279-284.
- Kitama, T., Ohki, Y., Shimazu, H., Tanaka, M. y Yoshida, K. (1995). Site of interaction between saccade signals and vestibular signals induced by head rotation in the alert cat: functional properties and afferent organization of burster-driving neurons. *J Neurophysiol.* 74(1): 273-287.
- Kitka, T., Katai, Z., Pap, D., Molnar, E., Adori, C. y Bagdy, G. (2009). Small platform sleep deprivation selectively increases the average duration of rapid eye movement sleep episodes during sleep rebound. *Behav Brain Res.* 205(2): 482-487.
- Kleitman, N. (1987). Sleep and wakefulness. University of Chicago Press, Chicago.
- Koella, W.P. y Ballin, H.M. (1954). The influence of environmental and body temperature on the electroencephalogram in the anesthetized cat. *Arch Int Physiol Biochim.* 62(3): 369-380.
- Kozisek, M.E., Deupree, J.D., Burke, W.J. y Bylund, D.B. (2007). Appropriate dosing regimens for treating juvenile rats with desipramine for neuropharmacological and behavioral studies. *J Neurosci Methods.* 163(1): 83-91.
- Krenzer, M., Anaclet, C., Vetrivelan, R., Wang, N., Vong, L., Lowell, B.B., Fuller, P.M. y Lu, J. (2011). Brainstem and spinal cord circuitry regulating REM sleep and muscle atonia. *PLoS One.* 6(10): e24998.
- Kroeger, D., Absi, G., Gagliardi, C., Bandaru, S.S., Madara, J.C., Ferrari, L.L., Arrigoni, E., Münzberg, H., Scammell, T.E., Saper, C.B. y Vetrivelan, R. (2018). Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nat Commun.* 9(1): 4129.
- Kropotov, J.D. (2009). Quantitative EEG, event-related potentials and neurotherapy. Academic Press, Amsterdam.
- Kumar, P. y Raju, T.R. (2001). Seizure susceptibility decreases with enhancement of rapid eye movement sleep. *Brain Res.* 922(2): 299-304.
- Kupfer, D.J., Perel, J.M., Pollock, B.G., Nathan, R.S., Grochocinski, V.J., Wilson, M.J. y McEachran, A.B. (1991). Fluvoxamine versus desipramine: comparative polysomnographic effects. *Biol Psychiatry.* 29(1): 23-40.
- Lai, Y.Y. y Siegel, J.M. (1990). Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation. *J Neurosci.* 10(8): 2727-2734.

Lancel, M., Crönlein, T.A. y Faulhaber, J. (1996). Role of GABAA receptors in sleep regulation. Differential effects of muscimol and midazolam on sleep in rats. *Neuropsychopharmacology*. 15(1): 63-74.

Landis, J.R. y Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33(1): 159-174.

Landolt, H.P. y de Boer, L.P. (2001). Effect of chronic phenelzine treatment on REM sleep: report of three patients. *Neuropsychopharmacology*. 25(5 Suppl): S63-S67.

Leigh, R.J. y Zee, D.S. (1983). The neurology of eye movements. F. A. Davis Company, Philadelphia.

Lengyel, M., Huhn, Z. y Érdi, P. (2005). Computational theories on the function of theta oscillations. *Biol Cybern*. 92(6): 393-408.

Leung, L.S. (1984). Theta rhythm during REM sleep and waking: correlations between power, phase and frequency. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 58(6): 553-564.

Libourel, P.A., Corneyllie, A., Luppi, P.H., Chauvet, G. y Gervasoni, D. (2015). Unsupervised online classifier in sleep scoring for sleep deprivation studies. *Sleep*. 38(5): 815-828.

Long, L.L., Hinman, J.R., Chen, C.M., Escabi, M.A. y Chrobak, J.J. (2014). Theta dynamics in rat: speed and acceleration across the septotemporal axis. *PLoS One*. 9(5): e97987.

Lopez-Rodriguez, F., Wilson, C.L., Maidment, N.T., Poland, R.E. y Engel, J. (2003). Total sleep deprivation increases extracellular serotonin in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 121(2): 523-530.

Lorente de Nó, R. (1933). Vestibulo-ocular reflex arc. *Arch Neurol Psychiatry*. 30(2): 245-291.

Louis, R.P., Lee, J. y Stephenson, R. (2004). Design and validation of a computer-based sleep-scoring algorithm. *J Neurosci Methods*. 133(1-2): 71-80.

Lu, J., Greco, M.A., Shiromani, P. y Saper, C.B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci*. 20(10): 3830-3842.

Lu, J., Sherman, D., Devor, M. y Saper, C.B. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*. 441(7093): 589-594.

Lucidi, F., Devoto, A., Violani, C., De Gennaro, L., Mastracci, P. y Bertini, M. (1996). Rapid eye movements density as a measure of sleep need: REM density decreases linearly with the reduction of prior sleep duration. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 99(6): 556-561.

Luppi, P.H., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Leger, L. y Fort, P. (2006). Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol Paris*. 100(5-6): 271-283.

- Ly, S., Pishdari, B., Lok, L.L., Hajos, M. y Kocsis, B. (2013). Activation of 5-HT₆ receptors modulates sleep-wake activity and hippocampal theta oscillation. *ACS Chem Neurosci.* 4(1): 191-199.
- Mably, A.J. y Colgin, L.L. (2018). Gamma oscillations in cognitive disorders. *Curr Opin Neurobiol.* 52: 182-187.
- Machado, R.B., Hipólido, D.C., Benedito-Silva, A.A. y Tufik, S. (2004). Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res.* 1004(1-2): 45-51.
- Mallick, B.N. y Singh, A. (2011). REM sleep loss increases brain excitability: role of noradrenalin and its mechanism of action. *Sleep Med Rev.* 15(3): 165-178.
- Mang, G.M., Nicod, J., Emmenegger, Y., Donohue, K.D., O'Hara, B.F. y Franken, P. (2014). Evaluation of a piezoelectric system as an alternative to electroencephalogram/electromyogram recordings in mouse sleep studies. *Sleep.* 37(8): 1383-1392.
- Marinesco, S., Bonnet, C. y Cespuglio, R. (1999). Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: a possible role for corticosterone. *Neuroscience.* 92(3): 921-933.
- Marks, G.A. y Roffwarg, H.P. (1993). Spontaneous activity in the thalamic reticular nucleus during the sleep/wake cycle of the freely-moving rat. *Brain Res.* 623(2): 241-248.
- Márquez-Ruiz, J. y Escudero, M. (2008). Tonic and phasic phenomena underlying eye movements during sleep in the cat. *J Physiol.* 586(14): 3461-3477.
- Márquez-Ruiz, J. y Escudero, M. (2009). Eye movements and abducens motoneuron behavior during cholinergically induced REM sleep. *Sleep.* 32(4): 471-481.
- Márquez-Ruiz, J. y Escudero, M. (2010). Eye movements and abducens motoneuron behavior after cholinergic activation of the nucleus reticularis pontis caudalis. *Sleep.* 33(11): 1517-1527.
- Mayers, A.G. y Baldwin, D.S. (2005). Antidepressants and their effect on sleep. *Hum Psychopharmacol.* 20(8): 533-559.
- McCarley, R.W. (2007). Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med.* 8(4): 302-330.
- McCarthy, A., Wafford, K., Shanks, E., Ligocki, M., Edgar, D.M. y Dijk, D.J. (2016). REM sleep homeostasis in the absence of REM sleep: effects of antidepressants. *Neuropharmacology.* 108: 415-425.
- McDermott, C.M., LaHoste, G.J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N.G. y Magee, J.C. (2003). Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 23(29): 9687-9695.

McNaughton, N., Kocsis, B. y Hajós, M. (2007). Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function? *Behav Pharmacol.* 18(5-6): 329-346.

McNaughton, N., Ruan, M. y Woodnorth, M.A. (2006). Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. *Hippocampus.* 16(12): 1102-1110.

Mendelson, W.B., Guthrie, R.D., Frederick, G. y Wyatt, R.J. (1974). The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacol Biochem Behav.* 2(4): 553-556.

Merica, H. y Fortune, R.D. (2004). State transitions between wake and sleep, and within the ultradian cycle, with focus on the link to neuronal activity. *Sleep Med Rev.* 8(6): 473-485.

Michel, F., Jeannerod, M., Mouret, J., Rechtschaffen, A. y Jouvet, M. (1964). Sur les mécanismes de l'activité de pointes au niveau du système visuel au cours de la phase paradoxale du sommeil. *C R Seances Soc Biol Fil.* 158: 103-106.

Mileva-Seitz, V.R., Louis, R.P. y Stephenson, R. (2005). A visual aid for computer-based analysis of sleep-wake state in rats. *J Neurosci Methods.* 148(1): 43-48.

Miyawaki, H. y Diba, K. (2016). Regulation of hippocampal firing by network oscillations during sleep. *Curr Biol.* 26(7): 893-902.

Mohns, E.J. y Blumberg, M.S. (2010). Neocortical activation of the hippocampus during sleep in infant rats. *J Neurosci.* 30(9): 3438-3449.

Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P. y Lugaresi, E. (2003). Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol.* 2(3): 167-176.

Montgomery, S.M., Sirota, A. y Buzsáki, G. (2008). Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J Neurosci.* 28(26): 6731-6741.

Morales, F.R., Boxer, P. y Chase, M.H. (1987). Behavioral state-specific inhibitory postsynaptic potentials impinge on cat lumbar motoneurons during active sleep. *Exp Neurol.* 98(2): 418-435.

Morden, B., Mitchell, G. y Dement, W. (1967). Selective REM sleep deprivation and compensation phenomena in the rat. *Brain Res.* 5(3): 339-349.

Mula, M. (2016). Using anxiolytics in epilepsy: neurobiological, neuropharmacological and clinical aspects. *Epileptic Disord.* 18(3): 217-227.

Muthukumaraswamy, S.D. (2013). High-frequency brain activity and muscle artifacts in MEG/EEG: a review and recommendations. *Front Hum Neurosci.* 7: 138.

Nakazawa, Y., Kotorii, M., Ohshima, M., Kotorii, T. y Hasuzawa, H. (1978). Changes in sleep pattern after sleep deprivation. *Psychiatry Clin Neurosci.* 32(1): 85-93.

- Nauta, W.J. (1946). Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J Neurophysiol.* 9(4): 285-316.
- Neckelmann, D., Olsen, O.E., Fagerland, S. y Ursin, R. (1994). The reliability and functional validity of visual and semiautomatic sleep/wake scoring in the Møll-Wistar rat. *Sleep.* 17(2): 120-131.
- Nelson, J.P., McCarley, R.W. y Hobson, J.A. (1983). REM sleep burst neurons, PGO waves, and eye movement information. *J Neurophysiol.* 50(4): 784-797.
- Neuhaus, H.U. y Borbély, A.A. (1978). Sleep telemetry in the rat. II. Automatic identification and recording of vigilance states. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 44(1): 115-119.
- Niethard, N. y Born, J. (2019). Back to baseline: sleep recalibrates synapses. *Nat Neurosci.* 22(2): 149-151.
- Nimmrich, V., Draguhn, A. y Axmacher, N. (2015). Neuronal network oscillations in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med.* 17(3): 270-284.
- Obermeyer, W., Bergmann, B.M. y Rechtschaffen, A. (1991). Sleep deprivation in the rat: XIV. Comparison of waking hypothalamic and peritoneal temperatures. *Sleep.* 14(4): 285-293.
- Ogilvie, R.D. (2001). The process of falling asleep. *Sleep Med Rev.* 5(3): 247-270.
- Ohki, Y., Shimazu, H. y Suzuki, I. (1988). Excitatory input to burst neurons from the labyrinth and its mediating pathway in the cat: location and functional characteristics of burster-driving neurons. *Exp Brain Res.* 72(3): 457-472.
- Palagini, L., Baglioni, C., Ciapparelli, A., Gemignani, A. y Riemann, D. (2013). REM sleep dysregulation in depression: state of the art. *Sleep Med Rev.* 17(5): 377-390.
- Pan, W.X. y McNaughton, N. (2004). The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Prog Neurobiol.* 74(3): 127-166.
- Peever, J. y Fuller, P.M. (2017). The biology of REM sleep. *Curr Biol.* 27(22): R1237-R1248.
- Petersson, P., Waldenström, A., Fåhræus, C. y Schouenborg, J. (2003). Spontaneous muscle twitches during sleep guide spinal self-organization. *Nature.* 424(6944): 72-75.
- Porkka-Heiskanen, T., Smith, S.E., Taira, T., Urban, J.H., Levine, J.E., Turek, F.W. y Stenberg, D. (1995). Noradrenergic activity in rat brain during rapid eye movement sleep deprivation and rebound sleep. *Am J Physiol.* 268(6 Pt 2): R1456-R1463.
- Pujol, J.F., Mouret, J., Jouvet, M. y Glowinski, J. (1968). Increased turnover of cerebral norepinephrine during rebound of paradoxical sleep in the rat. *Science.* 159(3810): 112-114.
- Quarck, G., Ventre, J., Etard, O. y Denise, P. (2006). Total sleep deprivation can increase vestibulo-ocular responses. *J Sleep Res.* 15(4): 369-375.

Quinn, K.J., Rude, S.A., Brettler, S.C. y Baker, J.F. (1998). Chronic recording of the vestibulo-ocular reflex in the restrained rat using a permanently implanted scleral search coil. *J Neurosci Methods*. 80(2): 201-208.

Rampin, C., Cespuglio, R., Chastrette, N. y Jouvet, M. (1991). Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. *Neurosci Lett*. 126(2): 113-118.

Rechtschaffen, A. y Bergmann, B.M. (1995). Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behav Brain Res*. 69(1-2): 55-63.

Rechtschaffen, A. y Bergmann, B.M. (2002). Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*. 25(1): 18-24.

Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Gilliland, M.A. y Bauer, K. (1999). Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep*. 22(1): 11-31.

Rechtschaffen, A., Gilliland, M.A., Bergmann, B.M. y Winter, J.B. (1983). Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science*. 221(4606): 182-184.

Rempe, M.J., Clegern, W.C. y Wisor, J.P. (2015). An automated sleep-state classification algorithm for quantifying sleep timing and sleep-dependent dynamics of electroencephalographic and cerebral metabolic parameters. *Nat Sci Sleep*. 7: 85-99.

Robert, C., Guilpin, C. y Limoge, A. (1999). Automated sleep staging systems in rats. *J Neurosci Methods*. 88(2): 111-122.

Robinson, D.A. (1963). A method of measuring eye movement using a scleral search coil in a magnetic field. *IEEE Trans Biomed Eng*. 10: 137-145.

Robinson, D.A. (1976). Adaptive gain control of vestibuloocular reflex by the cerebellum. *J Neurophysiol*. 39(5): 954-969.

Rowland, L.M., Thomas, M.L., Thorne, D.R., Sing, H.C., Krichmar, J.L., Davis, H.Q., Balwinski, S.M., Peters, R.D., Kloeppel-Wagner, E., Redmond, D.P., Alicandri, E. y Belenky, G. (2005). Oculomotor responses during partial and total sleep deprivation. *Aviat Space Environ Med*. 76(7 Suppl): C104-C113.

Ruigt, G.S., Van Proosdij, J.N. y Van Delft, A.M. (1989). A large scale, high resolution, automated system for rat sleep staging. I. Methodology and technical aspects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 73(1): 52-63.

Russ, W., Kling, D., Sauerwein, G. y Hempelmann, G. (1987). Spectral analysis of the EEG during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Acta Anaesthesiol Scand*. 31(2): 111-116.

Russo, M., Thomas, M., Thorne, D., Sing, H., Redmond, D., Rowland, L., Johnson, D., Hall, S., Krichmar, J. y Balkin, T. (2003). Oculomotor impairment during chronic partial sleep deprivation. *Clin Neurophysiol*. 114(4): 723-736.

Sánchez-López, A. y Escudero, M. (2011). Tonic and phasic components of eye movements during REM sleep in the rat. *Eur J Neurosci.* 33(11): 2129-2138.

Sánchez-López, A., Silva-Pérez, M. y Escudero, M. (2018). Temporal dynamics of the transition period between nonrapid eye movement and rapid eye movement sleep in the rat. *Sleep.* 41(9): zsy121.

Saper, C.B., Chou, T.C. y Scammell, T.E. (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* 24(12): 726-731.

Saper, C.B. y Fuller, P.M. (2017). Wake-sleep circuitry: an overview. *Curr Opin Neurobiol.* 44: 186-192.

Saper, C.B., Fuller, P.M., Pedersen, N.P., Lu, J. y Scammell, T.E. (2010). Sleep state switching. *Neuron.* 68(6): 1023-1042.

Saper, C.B., Scammell, T.E. y Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature.* 437(7063): 1257-1263.

Savage, V.M. y West, G.B. (2007). A quantitative, theoretical framework for understanding mammalian sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(3): 1051-1056.

Scheffer-Teixeira, R., Belchior, H., Caixeta, F.V., Souza, B.C., Ribeiro, S. y Tort, A.B. (2012). Theta phase modulates multiple layer-specific oscillations in the CA1 region. *Cereb Cortex.* 22(10): 2404-2414.

Scheffer-Teixeira, R. y Tort, A.B.L. (2017). Unveiling fast field oscillations through comodulation. *eNeuro.* 4(4): ENEURO.0079-17.2017.

Scheffzük, C., Kukushka, V.I., Vyssotski, A.L., Draguhn, A., Tort, A.B. y Brankač, J. (2011). Selective coupling between theta phase and neocortical fast gamma oscillations during REM-sleep in mice. *PLoS One.* 6(12): e28489.

Scheffzük, C., Kukushka, V.I., Vyssotski, A.L., Draguhn, A., Tort, A.B.L. y Brankač, J. (2013). Global slowing of network oscillations in mouse neocortex by diazepam. *Neuropharmacology.* 65: 123-133.

Schiaffino, S. y Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev.* 76(2): 371-423.

Schmidt, M.H. (2014). The energy allocation function of sleep: a unifying theory of sleep, torpor, and continuous wakefulness. *Neurosci Biobehav Rev.* 47: 122-153.

Shaw, P.J., Bergmann, B.M. y Rechtschaffen, A. (1998). Effects of paradoxical sleep deprivation on thermoregulation in the rat. *Sleep.* 21(1): 7-17.

Sherin, J.E., Elmquist, J.K., Torrealba, F. y Saper, C.B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci.* 18(12): 4705-4721.

Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, R.W. y Saper, C.B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*. 271(5246): 216-219.

Siegel, J.M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*. 437(7063): 1264-1271.

Siegel, J.M. (2009). Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nat Rev Neurosci*. 10(10): 747-753.

Siok, C.J., Taylor, C.P. y Hajós, M. (2009). Anxiolytic profile of pregabalin on elicited hippocampal theta oscillation. *Neuropharmacology*. 56(2): 379-385.

Sirota, A., Montgomery, S., Fujisawa, S., Isomura, Y., Zugaro, M. y Buzsáki, G. (2008). Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron*. 60(4): 683-697.

Sokoloff, G., Plumeau, A.M., Mukherjee, D. y Blumberg, M.S. (2015). Twitch-related and rhythmic activation of the developing cerebellar cortex. *J Neurophysiol*. 114(3): 1746-1756.

Spencer, R.F. y Porter, J.D. (1988). Structural organization of the extraocular muscles. En J.A Büttner-Ennever, ed. *Reviews of Oculomotor Research*. pp. 33-79. Elsevier, Amsterdam.

Stephenson, R., Caron, A.M., Cassel, D.B. y Kostela, J.C. (2009). Automated analysis of sleep-wake state in rats. *J Neurosci Methods*. 184(2): 263-274.

Steriade, M., McCormick, D.A. y Sejnowski, T.J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*. 262(5134): 679-685.

Stern, W.C., Forbes, W.B. y Morgane, P.J. (1974). Absence of ponto-geniculo-occipital (PGO) spikes in rats. *Physiol Behav*. 12(2): 293-295.

Stern, W.C., Miller, F.P., Cox, R.H. y Maickel, R.P. (1971). Brain norepinephrine and serotonin levels following REM sleep deprivation in the rat. *Psychopharmacologia*. 22(1): 50-55.

Strassman, A., Evinger, C., McCrea, R.A., Baker, R.G. y Highstein, S.M. (1987). Anatomy and physiology of intracellularly labelled omnipause neurons in the cat and squirrel monkey. *Exp Brain Res*. 67(2): 436-440.

SucHECKI, D., Lobo, L.L., Hipólido, D.C. y Tufik, S. (1998). Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res*. 7(4): 276-281.

Szentágothai, J. (1950). The elementary vestibulo-ocular reflex arc. *J Neurophysiol*. 13(6): 395-407.

Takakusaki, K., Matsuyama, K., Kobayashi, Y., Kohyama, J. y Mori, S. (1993). Pontine microinjection of carbachol and critical zone for inducing postural atonia in reflexively standing decerebrate cats. *Neurosci Lett*. 153(2): 185-188.

- Thakkar, M. y Mallick, B.N. (1993). Effect of rapid eye movement sleep deprivation on rat brain monoamine oxidases. *Neuroscience*. 55(3): 677-683.
- Tiriac, A., Sokoloff, G. y Blumberg, M.S. (2015). Myoclonic twitching and sleep-dependent plasticity in the developing sensorimotor system. *Curr Sleep Med Rep*. 1(1): 74-79.
- Tobler, I. (1995). Is sleep fundamentally different between mammalian species? *Behav Brain Res*. 69(1-2): 35-41.
- Tononi, G. y Cirelli, C. (2006). Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev*. 10(1): 49-62.
- Tort, A.B., Scheffer-Teixeira, R., Souza, B.C., Draguhn, A. y Brankač, J. (2013). Theta-associated high-frequency oscillations (110-160 Hz) in the hippocampus and neocortex. *Prog Neurobiol*. 100: 1-14.
- Trimble, M.R. (2002). On the use of tranquillisers in epilepsy. *Epilepsia*. 43(Suppl 2): 25-27.
- Tsunematsu, T., Ueno, T., Tabuchi, S., Inutsuka, A., Tanaka, K.F., Hasuwa, H., Kilduff, T.S., Terao, A. y Yamanaka, A. (2014). Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci*. 34(20): 6896-6909.
- Uhlhaas, P.J. y Singer, W. (2010). Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 11(2): 100-113.
- Van Gelder, R.N., Edgar, D.M. y Dement, W.C. (1991). Real-time automated sleep scoring: validation of a microcomputer-based system for mice. *Sleep*. 14(1): 48-55.
- van Luijckelaar, E.L. y Coenen, A.M. (1984). An EEG averaging technique for automated sleep-wake stage identification in the rat. *Physiol Behav*. 33(5): 837-841.
- Vanni-Mercier, G., Pelisson, D., Goffart, L., Sakai, K. y Jouvet, M. (1994). Eye saccade dynamics during paradoxical sleep in the cat. *Eur J Neurosci*. 6(8): 1298-1306.
- Ventre-Dominey, J., Nighoghossian, N. y Denise, P. (2003). Evidence for interacting cortical control of vestibular function and spatial representation in man. *Neuropsychologia*. 41(14): 1884-1898.
- Vertes, R.P. y Kocsis, B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*. 81(4): 893-926.
- Vyazovskiy, V.V. y Delogu, A. (2014). NREM and REM sleep: complementary roles in recovery after wakefulness. *Neuroscientist*. 20(3): 203-219.
- Vyazovskiy, V.V., Olcese, U., Cirelli, C. y Tononi, G. (2013). Prolonged wakefulness alters neuronal responsiveness to local electrical stimulation of the neocortex in awake rats. *J Sleep Res*. 22(3): 239-250.

Vyazovskiy, V.V., Olcese, U., Lazimy, Y.M., Faraguna, U., Esser, S.K., Williams, J.C., Cirelli, C. y Tononi, G. (2009). Cortical firing and sleep homeostasis. *Neuron*. 63(6): 865-878.

Vyazovskiy, V.V. y Tobler, I. (2005). Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat. *Brain Res*. 1050(1-2): 64-71.

Walker, M.P. y Stickgold, R. (2004). Sleep-dependent learning and memory consolidation. *Neuron*. 44(1): 121-133.

Wang, X.J. y Buzsáki, G. (1996). Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci*. 16(20): 6402-6413.

Watson, B.O. y Buzsáki, G. (2015). Sleep, memory & brain rhythms. *Daedalus*. 144(1): 67-82.

Watson, B.O., Levenstein, D., Greene, J.P., Gelineas, J.N. y Buzsáki, G. (2016). Network homeostasis and state dynamics of neocortical sleep. *Neuron*. 90(4): 839-852.

Whishaw, I.Q. y Vanderwolf, C.H. (1971). Hippocampal EEG and behavior: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movement, swimming and shivering. *Physiol Behav*. 6(4): 391-397.

Whishaw, I.Q. y Vanderwolf, C.H. (1973). Hippocampal EEG and behavior: change in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav Biol*. 8(4): 461-484.

Whittington, M.A., Traub, R.D. y Jefferys, J.G. (1995). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature*. 373(6515): 612-615.

Wilson, S. y Argyropoulos, S. (2005). Antidepressants and sleep: a qualitative review of the literature. *Drugs*. 65(7): 927-947.

Wolfe, J.W. y Brown, J.H. (1968). Effects of sleep deprivation on the vestibulo-ocular reflex. *Aerosp Med*. 39(9): 947-949.

Xu, M., Chung, S., Zhang, S., Zhong, P., Ma, C., Chang, W.C., Weissbourd, B., Sakai, N., Luo, L., Nishino, S. y Dan, Y. (2015). Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nat Neurosci*. 18(11): 1641-1647.

Yang, R.H., Hu, S.J., Wang, Y., Zhang, W.B., Luo, W.J. y Chen, J.Y. (2008). Paradoxical sleep deprivation impairs spatial learning and affects membrane excitability and mitochondrial protein in the hippocampus. *Brain Res*. 1230: 224-232.

Yeung, M., Treit, D. y Dickson, C.T. (2012). A critical test of the hippocampal theta model of anxiolytic drug action. *Neuropharmacology*. 62(1): 155-160.

Ylinen, A., Bragin, A., Nádasdy, Z., Jandó, G., Szabó, I., Sik, A. y Buzsáki, G. (1995). Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci*. 15(1 Pt 1): 30-46.

Young, C.K. y McNaughton, N. (2009). Coupling of theta oscillations between anterior and posterior midline cortex and with the hippocampus in freely behaving rats. *Cereb Cortex*. 19(1): 24-40.

Zager, A., Andersen, M.L., Ruiz, F.S., Antunes, I.B. y Tufik, S. (2007). Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 293(1): R504-R509.

Zeng, T., Mott, C., Mollicone, D. y Sanford, L.D. (2012). Automated determination of wakefulness and sleep in rats based on non-invasively acquired measures of movement and respiratory activity. *J Neurosci Methods*. 204(2): 276-287.

Zepelin, H., Siegel, J.M. y Tobler, I. (2005). Mammalian sleep. En M.H. Kryger, T. Roth y W.C. Dement, eds. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. pp. 91-100. W.B. Saunders, Philadelphia.

Zhu, X.O. y McNaughton, N. (1994). The interaction of serotonin depletion with anxiolytics and antidepressants on reticular-elicited hippocampal RSA. *Neuropharmacology*. 33(12): 1597-1605.

Zils, E., Sprenger, A., Heide, W., Born, J. y Gais, S. (2005). Differential effects of sleep deprivation on saccadic eye movements. *Sleep*. 28(9): 1109-1115.

