



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL SOBRE LA
ARQUITECTURA DEL SUEÑO EN LA RATA**

NATALIA DUQUE WILCKENS

Profesor Guía: Dr. Ennio Vivaldi Véjar

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
animales

Financiado por Proyecto Fondecyt 1060250 y por la Fundación Puelma, Universidad de Chile
SANTIAGO, CHILE

2010



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL SOBRE LA ARQUITECTURA DEL SUEÑO EN LA RATA

NATALIA DUQUE WILCKENS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
animales

NOTA FINAL:

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA : ENNIO VIVALDI

.....

PROFESOR CONSEJERO: RICARDO OLIVARES

.....

PROFESOR CONSEJERO: VICTOR HUGO PARRAGUEZ

.....

Financiado por Proyecto Fondecyt 1060250 y por la Fundación Puelma, Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2010

MEMORIA DE TÍTULO

“EFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL SOBRE LA ARQUITECTURA DEL SUEÑO EN LA RATA”.

Natalia Duque Wilckens*†

*Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

† Laboratorio de Sueño, Programa de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Autores en los 70's y 80's reportaron que el Enriquecimiento Ambiental (EA) aumentaba selectivamente el sueño REM. Ellos relacionaron estos resultados con los procesos de aprendizaje que serían mayores en ratas que tienen EA. Sin embargo, durante los últimos años se ha propuesto que la relación entre sueño y aprendizaje podría involucrar factores mucho más sutiles que aumentos o disminuciones de cantidad de estados de sueño, tales como la alternancia entre sueño NREM y sueño REM o componentes circadianos. Este estudio evaluó los efectos del EA sobre el sueño de la rata usando mediciones tradicionales, como cantidad de estado, y otras más sutiles, tales como análisis de la arquitectura del sueño, transiciones entre estados y mecanismos regulatorios circadianos y homeostáticos. Para ello se utilizaron dos grupos de 4 ratas Sprague Dawley cada uno bajo un esquema de luz:oscuridad 12h:12h, que fueron registrados de forma continua. El grupo control o ratas no enriquecidas (RNE) fue mantenido bajo condiciones estándares de laboratorio, mientras que el grupo experimental o ratas de ambiente enriquecido (RAE) fue mantenido en condiciones ambientales enriquecidas, que consistían en cajas de mayor tamaño con túneles, material para hacer nido, rueda para correr y comida novedosa. Estas condiciones se mantuvieron posteriores a la cirugía y durante todo el registro. El diagnóstico de estados de sueño fue realizado de forma automática por un programa computacional. Se observó que RAE presentó significativamente mayor cantidad de sueño REM durante la fase de luz y mayor fracción sueño REM /No REM. Además, en RAE el sueño REM se presentó en fase avanzada y los episodios de REM fueron más largos, hubo más alternancias entre los estados dentro de los bloques de sueño y la homeostasis de corto plazo de sueño REM fue más precisa.

Palabras clave: sueño, aprendizaje, memoria, enriquecimiento ambiental, rata.

Authors in the 70's and 80's reported that Environmental Enrichment (EE) selectively increased REM sleep, and related it with learning processes that might be augmented in rats living in EE. However, during the last years it has been proposed that the relationship between sleep and learning may involve factors much subtler than increments or decrements of sleep states, such as the alternation between NREM and REM sleep or circadian components. The present study assessed the effects of introducing EE on the sleep wake cycle in the rat by using traditional measures, such as amount of behavioural states, and more subtler ones, such as sleep architecture analysis, transitions between states and circadian and homeostatic regulatory mechanisms. Two groups consisting of 4 adult male Sprague-Dawley rats each under a 12:12 light: dark schedule were continuously recorded. The control group or non enriched rats (RNE) was kept in standard laboratory housing conditions. The experimental group or environmental enriched rats (RAE) was kept in enriched housing conditions consisting in larger cages with tunnels, nesting material, running wheel and novel food items. These conditions were kept after surgery and during recordings. Sleep-wake states were scored automatically by an off-line system based on clustering techniques. Results: RAE presented significantly more REM sleep during the light phase and the fraction REM sleep / Total sleep was also significantly greater in this group. Moreover, REM sleep in RAE was significantly phase advanced and the REM sleep episodes were longer than in RNE group. RAE presented also more alternancies between the two sleep states within a sleep episode and showed a more precise short term homeostasis of REM sleep.

Keywords: Sleep, memory, learning, environmental enrichment.

1. INTRODUCCIÓN.

El sueño se define como inactividad sostenida en una postura especie específica acompañada de una disminución en la respuesta a estímulos externos y rápidamente reversible, lo que lo diferencia de coma e hibernación (Zepelin, 1989). En mamíferos, existen dos estados del dormir que alternan entre sí durante un episodio de sueño: el sueño de movimientos oculares rápidos o sueño REM (R) y el sueño quieto o No REM (N) (Rechtschaffen et al., 1963). El concepto de estado implica que hay un número discreto y limitado de posibles configuraciones que involucran a múltiples variables tanto del sistema nervioso central como del conjunto del organismo (Pace-Schott y Hobson, 2002). Las transiciones de un estado a otro deben ocurrir en un tiempo relativamente corto y deben ser orquestadas, probablemente por áreas restringidas del cerebro (Pace-Schott y Hobson, 2002). Si bien hay múltiples variables fisiológicas que cambian según el estado, la definición de R, N y vigilia (W) se hace considerando el electroencefalograma (EEG), el electromiograma (EMG) y, en algunas especies, los movimientos oculares rápidos (Rechtschaffen y Kales, 1968). W se caracteriza por tener un patrón EEG de baja amplitud y alta frecuencia, junto con una marcada actividad de EMG. R se caracteriza por tener un EEG de baja amplitud y alta frecuencia, muy semejante al que está presente en la vigilia alerta, asociado a movimientos oculares rápidos y atonía muscular. En roedores, R está dominado por

oscilaciones theta de 5-10 Hz de origen hipocampal. N se caracteriza por tener oscilaciones de alta amplitud y baja frecuencia, habiendo dos tipos de actividades electroencefalográficas principales: los “husos de sueño” así llamados por constituir trenes de ondas de 10-15 Hz (banda sigma) con envolvente fusiforme y las ondas delta que son ondas de gran voltaje y frecuencia inferior a 4.5 Hz. El N puede ser superficial o profundo, según predominen respectivamente los husos y las ondas delta. El tono muscular de N está disminuido respecto a la vigilia y los movimientos oculares son lentos o están ausentes (Vassalli y Dijk, 2009).

La arquitectura del sueño se refiere a la estructura y distribución temporal de los estados del dormir. En primer lugar, típicamente el sueño se concentra en una de las dos fases del ciclo luz-oscuridad. La arquitectura del sueño del humano adulto se caracteriza por lo siguiente: siempre la transición es de W a N, N y R van alternando con un período de aproximadamente noventa minutos, en los primeros ciclos hay un fuerte predominio del sueño N profundo o rico en ondas delta, el sueño N superficial predomina en la segunda mitad y los episodios de R se van haciendo más prolongados a lo largo de la noche. Esta distribución también es característica de la rata. En la rata, si bien su sueño es polifásico, el dormir predomina netamente en la fase de luz y se observa una distribución semejante a la arriba descrita: las transiciones son siempre de W a N, el N rico en delta predomina al comienzo del bloque

de sueño y R en la segunda mitad de la fase de luz (Borbely, 1982; Vivaldi et al., 1994b).

Hay dos procesos básicos que regulan la arquitectura del sueño: un proceso homeostático y un proceso circadiano (Borbely y Achermann, 1992). El proceso homeostático se refiere al aumento en la propensión al sueño en función del tiempo que se ha permanecido en vigilia y a la disipación de esta propensión a lo largo del tiempo que se permanece durmiendo. Este proceso se evidencia gracias a dos manifestaciones claves: durante la privación de sueño aumenta la somnolencia y luego de una privación hay un rebote compensatorio de sueño. La variable homeostática originalmente se postuló a partir de la actividad delta del EEG. La privación de sueño aumenta la actividad delta y este aumento depende de la duración de la vigilia previa. Además, la actividad delta se ve reducida en la noche siguiente cuando hay siestas durante el período destinado normalmente a vigilia. Por esto N, rico en ondas delta, se considera un índice de intensidad de sueño (Borbely, 1982; Daan et al., 1984). Sin embargo, también existe una homeostasis del sueño R, tanto en el largo plazo (rebote tras privación específica prolongada), como en el corto plazo (relación entre duración de un episodio e intervalo siguiente) (Vivaldi et al., 1994a, 2005). El proceso circadiano se refiere a la propensión al sueño que varía como función del momento del día o fase del reloj biológico, independiente de la cantidad de sueño y vigilia experimentada por el individuo

(Borbely, 1982; Daan et al., 1984; Czeisler y Dijk 2001). La propensión al sueño debido al proceso circadiano es un ejemplo de una amplia variedad de ritmos circadianos fisiológicos, cuyo principal reloj son los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo anterior (NSQ). Las células de los NSQ contienen relojes moleculares que mantienen una periodicidad muy cercana a las 24 horas, a través de la interacción de controles de retroalimentación positiva y negativa de transcripción y traslación de genes circadianos. La principal clave ambiental que permite al NSQ sincronizarse es el ciclo luz oscuridad (Klein et al., 1991). El sistema circadiano genera un ritmo de propensión a sueño que está en fase opuesta a los cambios homeostáticos en el manejo del sueño (Dijk y Czeisler, 1994, 1995). Esto permite que nos podamos mantener despiertos y alerta a lo largo del día, aunque haya una necesidad en aumento por dormir (Dijk y Von Schantz, 2005).

Estudios sobre sueño y privación de sueño han sugerido que las funciones de éste incluyen conservación de energía, restauración de componentes claves de biosíntesis macromolecular y facilitación de aprendizaje y memoria a través de cambios en plasticidad cerebral y sinaptogénesis (Ficca y Salzarulo, 2004; Mignot, 2008; Siegel, 2005; Stickgold, 2005; Zepelin, 1989). Entre las múltiples funciones del sueño, su rol en la consolidación de memoria pareciera ser de particular relevancia. El término memoria cubre un amplio rango de tipos de memoria, que difieren entre sí en el tipo de

información almacenada, las estructuras cerebrales involucradas en este almacenamiento y, en humanos, si la información es o no asequible a la conciencia. El término consolidación de memoria se refiere a un conjunto de procesos que toman una representación inicial e inestable de la memoria y la convierten en una forma más estable y efectiva. Es aceptado que muchos de los pasos de la cascada de consolidación de memoria ocurren preferencialmente o incluso exclusivamente durante periodos de sueño (Stickgold y Walker, 2007).

En el campo de investigación que relaciona sueño y memoria, al inicio la mayoría de los estudios se enfocaron en los efectos de R en memoria, ya sea evaluando si había una mayor cantidad de tiempo destinada a R posterior a sesiones de aprendizaje (Hennevin et al., 1995; Smith, 1995) o privando de R en el sueño subsecuente al aprendizaje, para luego evaluar posibles déficits de memoria (Pearlman, 1981; Smith, 1995). Estos estudios cayeron en descrédito por cuanto no controlaban el estrés inherente al proceso de privación de sueño. Además, diversos estudios posteriores, tanto en humanos como en animales, entregaron resultados inconsistentes entre sí respecto al rol de R en consolidación de memoria (Allen et al., 1972; Castaldo et al., 1974; De Koninck et al., 1989; Mandai et al., 1989; Zimmerman et al., 1978). Entonces el enfoque cambió al N de ondas delta, a la luz de su rol crucial en la regulación del sueño en humanos (Borbely,

1982; Feinberg, 1974). Así emergieron comparaciones específicas de R versus N. Mientras que ciertas investigaciones apuntaban a que el R tenía un efecto beneficioso mayor que el N sobre la memoria (Empson y Clarke, 1970; Tilley y Empson, 1978), otros estudios no encontraron diferencia entre los dos estados (Cipolli y Salzarulo, 1975;1979), o demostraron un mejor recuerdo de material verbal asociado a N predominante comparado con R (Barrett y Ekstrand, 1972; Fowler et al., 1973; Yaroush et al., 1971).

Con el objetivo de encontrar modelos alternativos que pudieran explicar los resultados tan distintos provistos por la literatura, se desarrollaron nuevas formas de abordar el problema de la relación entre sueño y memoria. Así, surgieron 2 hipótesis para explicar esta relación. La primera es la "hipótesis de dos procesos". Esta plantea que el efecto de los estados del sueño sobre el procesamiento de la memoria sería dependiente del tipo de tarea. Esto es, la memoria procedural (inconsciente y expresada por cambios en la conducta) se beneficiaría por R, mientras que la memoria declarativa (incluye nociones, ideas o eventos que son recordados de forma consciente) estaría ligada a N (Fogel et al., 2007). La segunda es la "hipótesis de dos pasos", que sugiere que la consolidación de la memoria durante el sueño estaría íntimamente ligada a la arquitectura del sueño, más que a la cantidad de tiempo destinado a uno u otro estado. Así, la alternancia regular entre N y R permitiría una

cooperación entre ambos estados para la consolidación de memoria (Ficca y Salzarulo, 2004).

Uno de los paradigmas que se ha utilizado como modelo para evaluar interacción entre memoria y sueño es el enriquecimiento ambiental (EA). El EA es un modelo experimental en el cual los animales son alojados en condiciones que potencian las interacciones sociales y la estimulación sensorial y motora (Mora et al., 2007; Rosenzweig y Bennett, 1996; van Praag et al., 2000). Este incluye el alojamiento en cajas relativamente más grandes, en grupos y la introducción continua de nuevos objetos estimulantes como ruedas para correr, cuerdas, escaleras, túneles, material para hacer nidos y juguetes (van Praag et al., 2000). Diversos autores como Tagney (1973), Mirmiran et al. (1982), y Gutwein y Fishbein (1980), describieron que el EA producía un aumento en el tiempo destinado a sueño total debido a un aumento de R, así como una aparición más temprana del primer episodio de R dentro de un ciclo de sueño. En ese momento, estos cambios en el sueño se asociaron al aprendizaje que conllevaría vivir en un ambiente con mayor estimulación.

A pesar de que hoy se postula que la relación entre sueño y aprendizaje podría no sólo relacionarse con la cantidad de tiempo destinado a un estado de sueño u otro, no se han hecho estudios más amplios y sofisticados que permitan detectar cambios más sutiles que podría producir el EA sobre

sueño, sobre todo relacionados a la arquitectura del sueño.

Por lo cual, el objetivo de esta memoria de título fue determinar si el EA tiene efectos sobre el sueño en la rata mediante el uso tanto de mediciones tradicionales, como cantidad de tiempo destinado a N y R, así como de aquéllas más sofisticadas, como distribución y localización de estados dentro de las 24 horas, transiciones entre episodios N y R, duración de episodios y mecanismos regulatorios del sueño circadiano y homeostático. Para ello se compararon estas mediciones entre animales con y sin enriquecimiento ambiental.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Se utilizaron 8 ratas Sprague Dawley macho, adultas, de 300-350 gr. de peso corporal. Los métodos de manejo y cuidado de animales utilizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolo CBA 0348 FMUCH). Estas fueron alojadas individualmente en cajas a temperatura ambiente (22-23°C), humedad relativa (55 ±10%) y ciclo luz: oscuridad (ciclo de 12 h luz/ 12 h oscuridad; luces encendidas a las 07:00) controlados, con comida y agua *ad libitum*. Los individuos fueron divididos en dos grupos experimentales de 4 individuos cada uno: grupo de ratas con ambiente enriquecido y grupo de ratas con ambiente no enriquecido.

2.2 No Enriquecimiento vs. Enriquecimiento ambiental

2.2.1 Grupo control o ratas no enriquecidas (RNE): Los animales se alojaron previo al registro en cajas de plástico de 16x19.6x33 cm (alto x ancho x largo), cerrada en su parte superior por una rejilla, por 10 días. Para realizar el registro polisomnográfico fue necesario cambiarlas a las jaulas de registro (Fig. 1a). Estas medían 25x30x30 cm, tenían piso grillado y estaban ubicadas dentro de cámaras de aislamiento de 60x60x70 cm, con iluminación controlada, temperatura ambiente de 21-24°C, aisladas acústicamente, ventiladas y provistas de espejo en la puerta de la caja para poder observar a los animales desde fuera y que estos a su vez no pudiesen ver el exterior.

2.2.2 Grupo de ratas de ambiente enriquecido (RAE): Previo al registro los individuos se alojaron por 10 días en cajas de plástico de 27x32x45cm. En su interior se dispusieron tubos de PVC, material para hacer nido, una rueda para correr y objetos novedosos que fueron cambiados cada tres días (fruta, nueces, juguetes, pedazos de madera). Para el registro polisomnográfico los animales se cambiaron a jaulas de registro (Fig. 1b) de tamaño 30x30x40cm, ubicadas dentro de cámaras de aislamiento de 60x60x70cm, con iluminación controlada, temperatura ambiente de 21-24°C, aisladas acústicamente, ventiladas y provistas de espejo unidireccional. A estas se les agregó material para hacer nido, una rueda para correr, repisas y objetos novedosos.

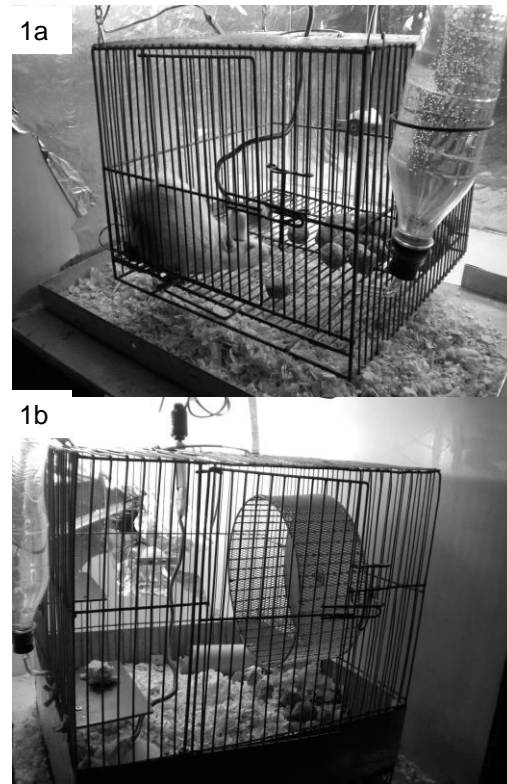


Fig. 1. a: Jaula de registro de grupo RNE. b: jaula de registro de grupo RAE. Se puede apreciar en esta última la presencia de rueda para correr, material para hacer nido, objetos novedosos y repisas que le sirven de refugio y amplían espacio. En ambas ilustraciones las ratas se encuentran dentro de las jaulas de registro respectivas, conectadas al sistema de adquisición de señal polisomnográfica.

2.3 Cirugía

Luego de vivir 3 días en sus ambientes respectivos para adaptación al nuevo ambiente, bajo anestesia profunda Ketamina (5 mg. / 100 g. de peso vivo i.p.; ImalgeneTM, Rhodia Merieux, Santiago, Chile) y Xilacina (0,4 mg./ 100 g. de peso vivo i.p.; RompunTM, Bayer, Santiago, Chile), se implantó epiduralmente un arreglo de 6 electrodos de acero inoxidable para registro crónico de EEG y cuatro electrodos para registro de actividad electromiográfica (EMG)

en músculos de la nuca. Dos electrodos epidurales fueron colocados a 2 mm desde la línea media cercana a bregma; dos fueron colocados a 2 mm de la línea media cercano a lambda y dos fueron colocados a 3 mm de la línea media y a 5 mm de bregma (Fig. 2). Todos los electrodos fueron conectados a una base de circuito integrado fijada mediante acrílico dental al cráneo. Se administró como tratamiento posquirúrgico Enrofloxacino (0,5 mg/100g. de peso vivo i.p., Baytril™ Bayer) y Ketoprofeno (0,02 mg./100 g. de peso i.p., Ketofen™, 0.2 mg/kg) una vez al día durante tres días.

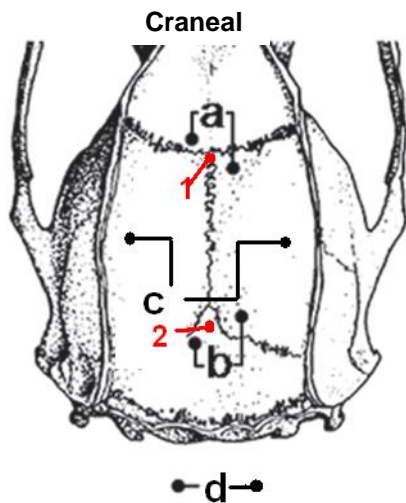


Fig. 2. Esquema de posicionamiento de electrodos. Visión dorsal del cráneo de la ratona. 1 y 2 muestran a bregma y lambda, respectivamente. a, b y c representan la ubicación de los electrodos epidurales para registro EEG. El punto d representa la ubicación de electrodos en músculos nucales para registro EMG.

2.4 Adquisición y almacenamiento de datos

Una vez conectados al sistema de adquisición de datos, se registró la actividad polisomnográfica continua (EEG + EMG). Para esto fueron configurados 3 canales de

EEG y un canal de EMG bipolares. La señal proveniente del animal fue amplificada diferencialmente para cada canal (GRASS® Technologies, 15LT54 Bipolar Amplifier System, West Warwick, U.S.A.), analógicamente filtrada (Pasa-banda 0,3-30 Hz para canales de EEG, pasa-banda 30-100 Hz y banda de eliminación 50 Hz para EMG), digitalizada mediante una tarjeta convertora análogo-digital (National Instruments® PCI-6220, Texas, U.S.A) a 250 Hz y 16 bits de precisión y almacenada en archivos de 10 minutos para su análisis posterior en un computador especialmente diseñado para la adquisición de datos (National Instruments® PXI 8176 Controller, Windows 2000 OS, Texas, U.S.A). Se utilizó un conmutador o conector eléctrico rotativo (Airflyte Electronics Co. New Jersey, U.S.A.) entre el animal y el sistema de amplificación que permitía el libre tránsito del animal dentro de su jaula, impidiendo torsión del cable de adquisición. El sistema de adquisición consta de una interfaz de visualización en línea de la señal polisomnográfica continua, lo que permite el ajuste y selección de parámetros óptimos para la adquisición (Fig. 3). El número de días de registro fue variable entre 3 y 7 días por ratona, esto debido principalmente a que muchas ratas perdieron el implante de electrodos antes de finalizar los 7 días de registro. De estos, los días que se utilizaron para el análisis fueron seleccionados por criterios primariamente de calidad de registro.

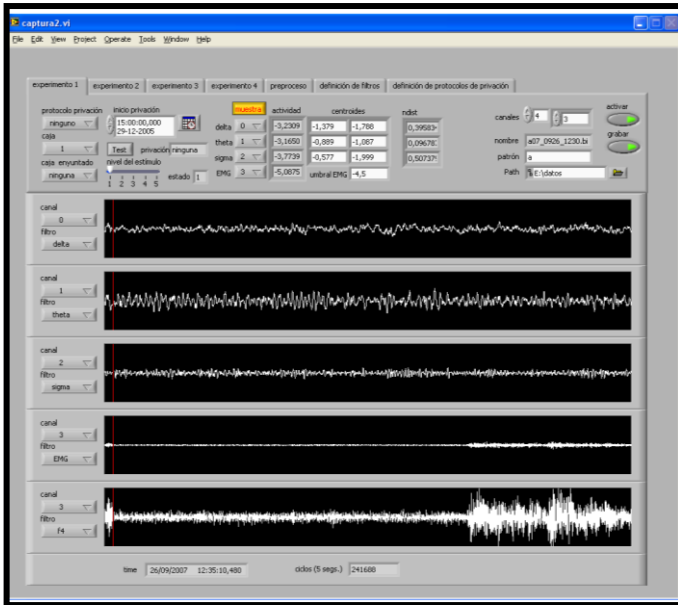


Fig. 3. Visualización a tiempo real de la señal al momento de adquisición: Los tres primeros canales corresponden al registro electroencefalográfico, el cuarto canal despliega la señal de EMG y el quinto canal muestra la señal EMG amplificada 5 veces. Esta interfase permite modificar filtros y amplificación para la visualización a tiempo real. Las características de almacenamiento de la señal son definidas desde otra interfase independiente de las modificaciones realizadas para la visualización.

2.5 Sistema de diagnóstico automático

El laboratorio de Sueño de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr. Ennio Vivaldi, realizó de forma pionera estudios automatizados de sueño mediante sistemas computacionales (Vivaldi, 1986). Este sistema automático para análisis del ciclo sueño vigilia (CSV) incluye la extracción de características del EEG y EMG, visualización de variables y diagnóstico de estados conductuales (Ocampo-Garces y Vivaldi, 2002; Vivaldi y Bassi, 2006; Vivaldi et al., 2008). Durante los últimos dos años, hubo grandes avances, tanto en la calidad de diagnóstico automático, como en

visualización de variables, gracias a la incorporación de visualización 3D en la plataforma Igor 6.1 (Wavemetrics® Lake Oswego, Oregon, U.S.A.) un ambiente de programación que a la vez funciona como una herramienta gráfica, de análisis de datos y procesamiento de imágenes. Esto permitió desarrollar un sistema más avanzado que finalmente entrega un diagnóstico de estados conductuales de CSV altamente confiable (Bassi et al., 2010). Los datos generados en el desarrollo de esta memoria de título conformaron la base sobre la que se construyó este nuevo programa.

A continuación se describe brevemente la metodología del sistema: Los poderes espectrales de las señales crudas de EEG y EMG de un día completo son procesados cada 5 seg. mediante la transformación de Fourier, operación matemática que descompone una señal eléctrica en las frecuencias que la constituyen (Bracewell, 1999; James, 2003). Los espectros del EEG son ecualizados para balancear la atenuación natural de las frecuencias más altas. Utilizando un análisis de componentes principales, método estadístico que reduce la multidimensionalidad de datos al realizar un análisis de covarianza entre factores (Joliffe, 2010), estos datos se reducen a dos variables que coinciden con la siguientes bandas espectrales: una representando la actividad de las bandas delta + sigma de 1-20 Hz y la otra representando la actividad de la banda theta de alrededor 7 Hz. Una tercera variable es extraída del EMG como

una actividad de banda ancha. Gracias a esto se genera un espacio 3D en el cual aparecen tres *clusters* (grupos de épocas) bien definidos representando W, N y R (Fig.4). Esta herramienta de visualización integra además la señal original (Fig.5), los percentiles de las actividades theta y delta+sigma del EEG y de la actividad muscular en épocas de 5 seg. (Fig. 6) y los espectrogramas en el dominio de las frecuencias (Fig. 7). Los *clusters* son concebidos como elipsoides con centroides localizados en sus regiones más densas. Las formas elípticas representan la covarianza dentro de cada *cluster*. Las épocas son asignadas a los *cluster* de estados, de acuerdo a umbrales definidos por los mínimos intermodales esperados en las distribuciones de distancias Euclidianas, o distancia ordinaria entre dos puntos dada por la fórmula de Pitágoras (Deza y Deza, 2009), a cada centroide. El diagnóstico de estado se realiza de una forma similar utilizando distancia de Mahalanobis, que se basa en la matriz de covarianza de cada estado (Deza y Deza, 2009). Esto último asume elipses concéntricas más que esferas concéntricas. Algunas épocas, generalmente de transición de un estado a otro, quedan no clasificadas y por lo tanto, en una segunda etapa, son asignadas contextualmente a estados ya diagnosticados en las épocas vecinas. Los resultados pueden ser fácilmente comparados en la interfaz visual con opinión experta. La consistencia de este método resulta del hecho de que los criterios de diagnóstico son generados por las propiedades internas de los mismos datos,

siendo de esta forma inmune a sesgos del diagnosticador, condiciones de registro cambiantes o variabilidad intra individuo. El resultado del proceso es un vector de 17280 épocas de 5 segundos para cada día completo de registro, en que cada época está en uno de los tres estados posibles (W, N ó R). De aquí en adelante, es con estos vectores diarios con los que se trabajó para el análisis.

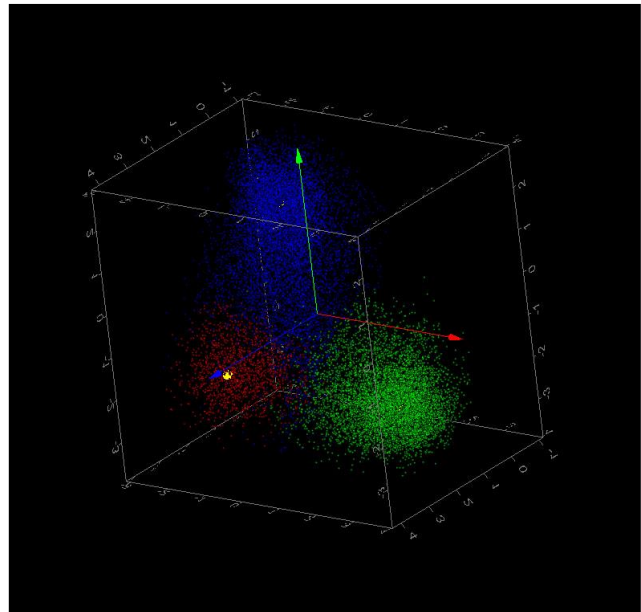


Fig. 4. Proyección 3D de las épocas de un día. La flecha roja indica la dirección del eje de la actividad muscular. La flecha azul indica la dirección del eje de la banda theta y la flecha verde indica la dirección del eje de la banda delta + sigma. Así se genera un espacio 3D en el que se proyecta cada una de las 17280 épocas de un día. Cada una de las épocas se acerca a uno de los tres ejes de acuerdo a la predominancia de una de las tres actividades mencionadas, con lo que finalmente se forman 3 *clusters* bien definidos representando W (verde), N (azul) y R (rojo).

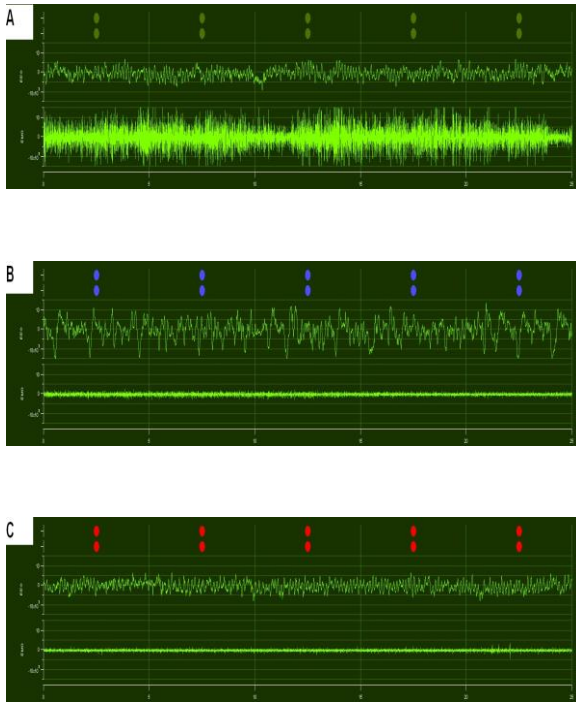


Fig. 5. Visualización de señal cruda en el dominio del tiempo. Las tres figuras representan un segmento de 25 segundos de señal cruda EEG (arriba) y EMG (abajo). **A**, **B** y **C** corresponden a episodios típicos de W, N y R, respectivamente. Las dos filas de círculos representan, en código de colores, el diagnóstico automático para cada época de 5 seg. (W: verde, N: azul, R: rojo). La fila inferior puede ser rediagnosticada por el usuario si no está de acuerdo con el diagnóstico automático.

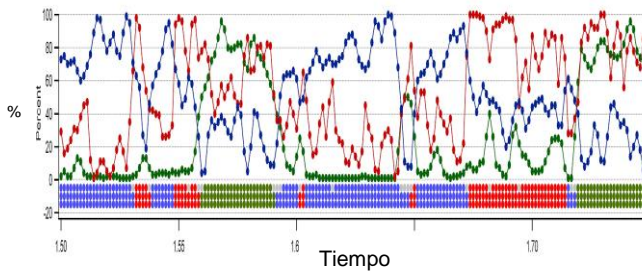


Fig. 6. Percentiles de actividades delta+sigma, theta del EEG y actividad del EMG. Esta figura muestra los percentiles de las actividades theta (rojo) y delta+sigma (azul) del EEG y de la actividad del EMG (verde) en el dominio del tiempo. El eje y muestra el percentil y el eje x muestra el tiempo en horas. Cada punto de las líneas

representa una época de 5 seg. Abajo, la primera fila de puntos representa el diagnóstico automático inicial. Así, azul representa N, rojo R, verde W y gris, indefinido. La segunda fila representa el diagnóstico luego de una reasignación de acuerdo al contexto de estados indefinidos a uno de los tres estados conductuales definidos. Finalmente, la tercera fila muestra lo mismo que la segunda, pero esta puede ser modificada por el usuario si no está de acuerdo con el diagnóstico automático.

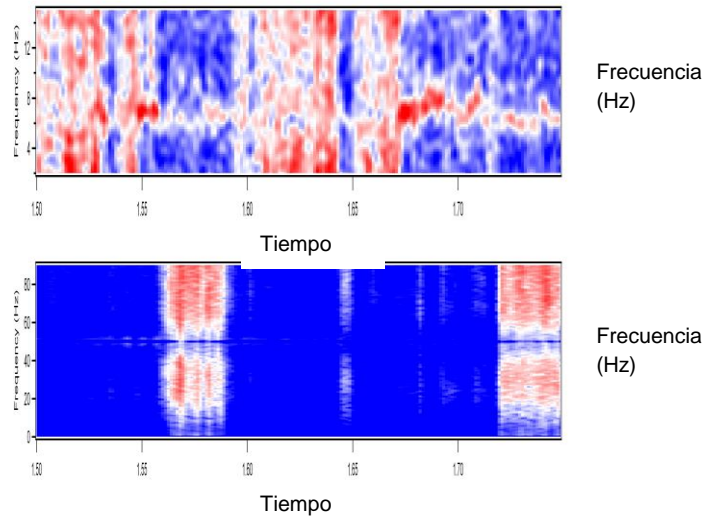


Fig. 7. Espectrogramas de registro EEG y EMG. Esta figura muestra la actividad del EEG (arriba) y del EMG (abajo) de 15 minutos de señal polisomnográfica. El eje y representa la frecuencia, el eje x representa el tiempo en horas. El espectro de colores representa la intensidad con que se presenta una frecuencia dada, donde los tonos azules son baja intensidad y los rojos son gran intensidad. En esa figura podemos apreciar el espectrograma de los tres estados conductuales: al inicio (desde hora 1.5 a 1.55 aprox.) hay actividad intensa del EEG en todo el rango de frecuencias (delta+sigma y theta) y no hay actividad muscular. Esto es típico de N. Luego viene un período muy corto de R (de hora 1.55 a 1.56 aprox.), en el que se ve un marcado aumento de la actividad theta (7 Hz) y se mantiene la ausencia de actividad muscular. Una vez que termina el episodio de R, viene un episodio de W (de hora 1.56 a 1.59 aprox.), en el que se ve actividad leve del EEG alrededor de 8 Hz y actividad muscular aumentada.

2.6 Metodología y análisis de datos

A continuación se sistematiza la metodología de cuantificación y análisis de datos utilizada con los objetivos de (1) realizar una descripción detallada del CSV en la rata y (2) detectar diferencias entre animales sometidos a la variable cuya relevancia se está evaluando. Para ello, se analizó la cantidad total de cada estado en la unidad natural que es un ciclo luz oscuridad completo, la distribución dentro de las 24 h y la arquitectura interna de la alternancia entre W y S y entre N y R.

Se realizará un comentario general sobre las pruebas estadísticas utilizadas. Hubo dos grupos constituido cada uno por cuatro ratas con una cantidad variable de días por rata. Las cuatro ratas del grupo RAE tuvieron 3, 4, 5 y 6 días de registro respectivamente (18 días totales por grupo); las del grupo RNE tuvieron 3, 3, 6 y 7 días respectivamente (19 días totales por grupo). En muchos casos la variable analizada dio como resultado un dato por día, como por ejemplo cantidad R en las 24 horas, fracción de N que ocurre en la fase de luz. En estos casos se hizo un ANDEVA anidado en donde el primer nivel era el día dentro de la rata y el siguiente nivel era la rata. Esta estrategia hizo mucho más exigente el proceso de encontrar diferencias significativas pues, en la práctica, en vez de 18 y 19 observaciones había 4 y 4 sujetos. Un proceso análogo se hizo en aquellos casos en que el análisis se refería a más de un dato al día. Por ejemplo, cómo se distribuye un estado en los

cuadrantes que corresponden a la primera y segunda mitad de la fase de luz y la fase de oscuridad. Por otra parte, algunos análisis se basaron en variables binarias, como la probabilidad de permanecer o no en un estado y probabilidad de transitar a alguno de los otros dos estados. Por ejemplo, permanecer o no en N después de un determinado tiempo y en caso de transitar fuera de N, hacerlo hacia W o hacia R. En estos casos las pruebas estadísticas se hicieron mediante chi cuadrado. Finalmente, en el análisis de la homeostasis de corto plazo de R, que se estableció analizando las duraciones de episodios de N posteriores a episodios de R, se hizo un análisis de regresión simple.

2.6.1 Fracción de tiempo del día completo destinado a cada estado: para cada día-rata se cuantificó la cantidad de épocas diagnosticadas para cada estado en un ciclo completo de luz oscuridad (24 h ó 17280 épocas de 5 seg.) y se expresó como porcentaje del total de épocas de un día. Además, para cada rata se estableció la proporción de épocas de R con respecto a N. Para comparar entre grupos se utilizó un ANDEVA con un nivel adicional de anidamiento que fue cantidad de épocas de cada estado en 24 horas.

2.6.2 Distribución y localización de cada estado dentro de las 24 h.

2.6.2.1 Distribución de los estados: en este paso se determinó la distribución de W, N y R en el día completo.: para esto se dividió cada día en dos intervalos de 12 horas cada uno

(fase luz: fase oscuridad), en seis intervalos de 4 horas (tres sextantes en la fase de luz y tres sextantes en fase de oscuridad) y por hora (24 horas), y se estableció para cada intervalo la cantidad de épocas diagnosticadas para cada estado dado. Así, se calculó qué porcentaje del total de épocas que ocupa cada estado en un día se destinó a cada intervalo de tiempo recién mencionado. Además, se determinó la proporción de épocas de R con respecto a N en la fase de luz. Para comparar entre grupos para las primeras dos variables (distribución luz:oscuridad y segmentos de 4 horas) se utilizó ANDEVA anidado con un nivel adicional de anidamiento que correspondió a cantidad de épocas diagnosticadas para cada estado en cada intervalo determinado. La distribución por hora sólo se utilizó como medida de evaluación de la calidad del diagnóstico automático (Fig. a de anexos).

2.6.2.2 Medidas de localización y dispersión de las distribuciones de cada estado: esto se realizó considerando cada día como un marco circular de un horario de 12:12 horas luz: oscuridad. Para ello se aplicaron estadísticas circulares (Batschelet, 1981; Mardia, 1972). La estadística circular o angular busca medidas de localización y dispersión equivalente al promedio y la desviación estándar de las distribuciones de los estados, considerando que el comienzo y el final de la escala coinciden (00 y 24 horas se encuentran en el mismo ángulo). El resultado básico de la estadística circular lo proporciona un vector con un ángulo y una

dimensión escalar. En este caso el ángulo del vector representó la hora en la que un estado tiende a presentarse en mayor proporción y la longitud del vector representó la concentración de las observaciones en torno a ese ángulo. Si se determinan esas variables para dos o más grupos se puede, en seguida, aplicar el test de Mardia-Watson-Wheeler (Batschelet, 1981) para determinar si las diferencias entre grupos son significativas.

2.6.3. Arquitectura del CSV: este análisis se basó en definir el comienzo y el término de cada episodio de W, N y R. Un episodio se define como un conjunto de épocas consecutivas diagnosticadas para cada estado dado (Fig. 8).

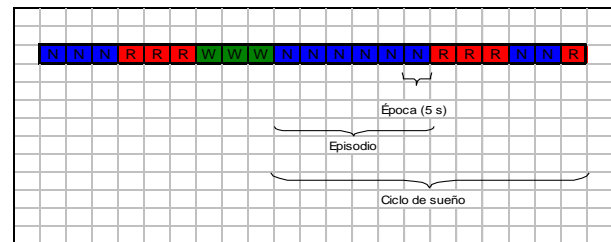


Fig.8. Época, episodio y ciclo de sueño. Esta figura esquematiza los conceptos de época, episodio y ciclo de sueño. Cada celda corresponde a una época de 5 segundos diagnosticada para un estado. Un episodio corresponde a un conjunto de épocas consecutivas de un mismo estado. Un ciclo de sueño se constituye de la alternancia entre episodios de N y R.

2.6.3.1 Estadísticas descriptivas de la duración de episodios: se determinó el promedio y el error estándar de la duración (en minutos) de los episodios de W, N y R. Para comparar entre grupos se utilizó ANDEVA anidado con un nivel adicional de

anidamiento que en este caso correspondió a duración de los episodios.

2.6.3.2 Alternancias R-N dentro de los ciclos de sueño: se cuantificó, para cada ciclo de sueño, el número de alternancias N-R dentro de cada secuencia de estados. Para comparar entre grupos se utilizó ANDEVA anidado con un nivel adicional de anidamiento que corresponde al número de alternancias N-R.

2.6.3.2 Interacciones entre las secuencias de estado.

2.6.3.2.1 Evaluación de la duración de los episodios de N como un análisis de supervivencia: en función del momento en que empezó un episodio de N, se determinó en cada época la probabilidad de que ahí terminara el episodio y la siguiente época correspondiera a W ó R o que el animal permaneciera en el episodio de N. Para comparar entre grupos se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrado.

2.6.3.2.2 Evaluación de la homeostasis de R: se estudió la homeostasis de corto plazo del R, que relaciona la longitud de un episodio de R con la longitud del episodio de N siguiente. Esto se realizó determinando la duración en minutos de los episodios de R y de los episodios N que los siguieron. Se esperaba que a más largo fuera un episodio de R, el episodio de N siguiente fuera de mayor duración. Esto se explicaría por lo siguiente: al estar una mayor cantidad de tiempo en un episodio de R, al momento de salir de ese episodio la necesidad de R ha

disminuido o ha sido satisfecha en mayor medida, por lo que no sería necesario volver a entrar a un episodio de R tan pronto (Vivaldi et al., 1994a). La relación entre las duraciones de ambos estados se analizó con una prueba de regresión lineal.

3. RESULTADOS

3.1. Fracción de tiempo del día completo destinado a cada estado: los promedios globales y sus errores estándar expresados en porcentajes (%) de las 24 horas destinados a cada estado para RAE y RNE fueron $45,9 \pm 1,7$ y $44,8 \pm 1,9$ para W; $46,3 \pm 1,7$ y $47,8 \pm 1,3$ para N; y $7,8 \pm 0,6$ y $7,4 \pm 0,6$ para R. En ninguno de los casos hubo diferencias significativas entre RAE y RNE. La proporción de R con respecto a N fue significativamente mayor para el grupo RAE ($p < 0,05$) (Figs. 9 y 10).

3.2. Distribución y localización de cada estado dentro de las 24 h

3.2.1 Cantidad de tiempo destinado a W, N y R por fase de luz/ oscuridad: los promedios globales expresados como % del total de estado que ocurrió en la fase de luz y los errores estándares para RAE y RNE fueron $27,3 \pm 2,0$ y $30,3 \pm 1,6$ para W; $68,5 \pm 1,7$ y $66,4 \pm 1,5$ para N; y $73,6 \pm 5,9$ y $63 \pm 6,7$ para R. No hubo diferencias significativas en la cantidad de W y N que ocurrió en la fase de luz entre ambos grupos, pero sí hubo diferencia significativa respecto a R, habiendo un mayor porcentaje de R en la fase de luz en las ratas del grupo RAE ($p < 0,05$). La proporción R:N durante la fase

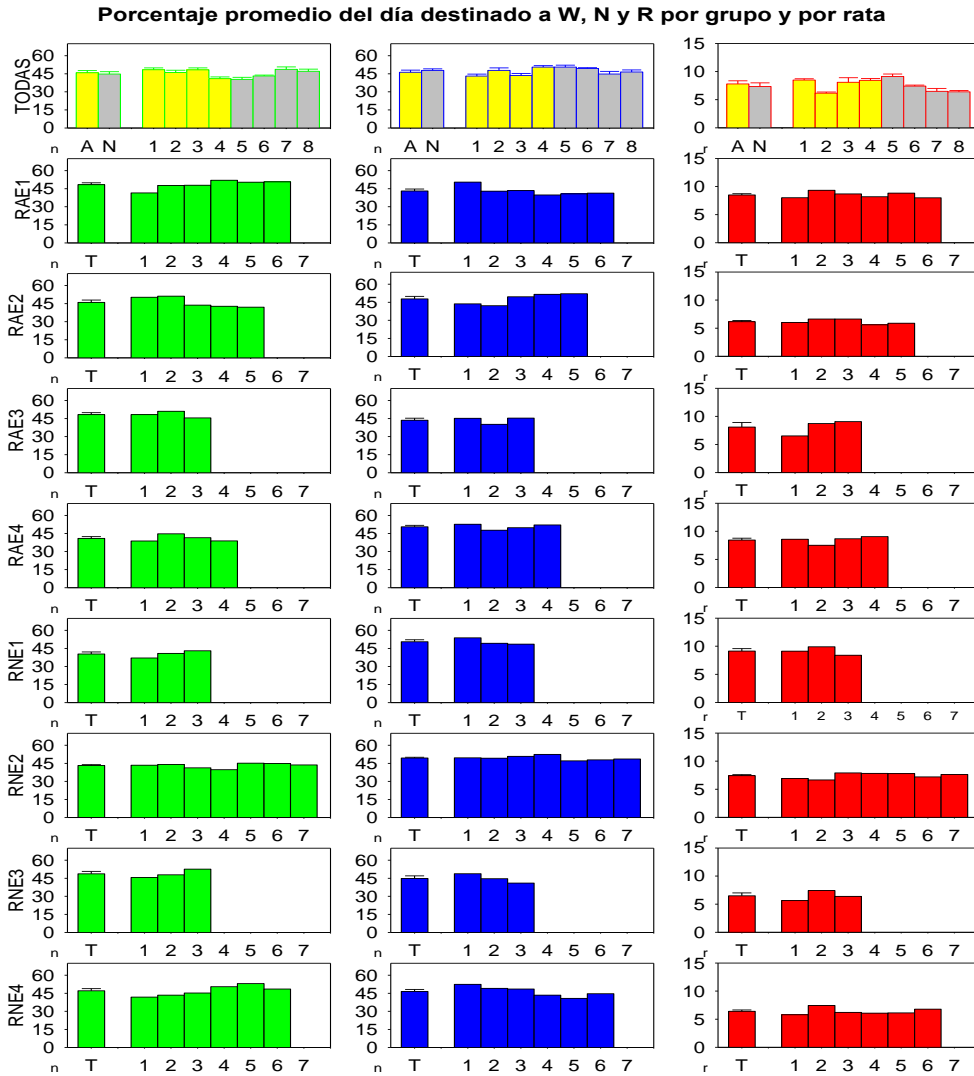


Fig. 9. Cantidad de tiempo del día completo destinado a cada estado. Los ejes y representan el porcentaje de un estado dado (W=verde, N=azul, R= rojo) y los ejes x corresponden en la primera fila al grupo (A= RAE, N=RNE) y rata (barras amarillas corresponden a ratas del grupo RAE y barras grises al grupo RNE) y a partir de la segunda fila los días de cada rata. Se muestran los promedios y errores estándares de la cantidad de tiempo destinado a cada estado expresados como porcentajes de día.

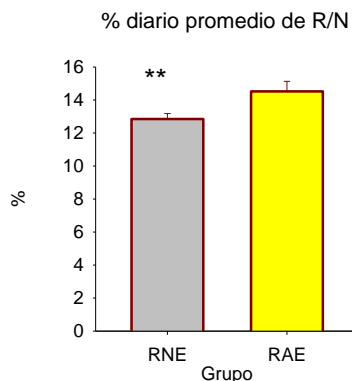


Fig. 10. Porcentaje de R con respecto a N. Cada barra representa el porcentaje que ocupa R con respecto a N en el grupo RNE (gris) y RAE (amarillo). Se muestra también el error estándar para cada caso. ** $P < 0,05$

de luz fue también significativamente mayor en las ratas del grupo RAE ($p < 0,05$) (Fig. 11 y fig. b de anexos).

3.2.2 Fracción del total de cada estado en intervalos de 4 horas: los promedios globales expresados como % del total de W y errores estándares que ocurren en el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto intervalo de 4 h de un día para RAE fueron $0,08 \pm 0,02$, $0,08 \pm 0,02$, $0,10 \pm 0,02$, $0,25 \pm 0,02$, $0,25 \pm 0,02$ y $0,23 \pm 0,02$ y para RNE fueron $0,10 \pm 0,03$, $0,08 \pm 0,02$, $0,11 \pm 0,01$, $0,23 \pm 0,02$, $0,24 \pm 0,02$ y $0,23 \pm 0,03$. Lo mismo para N; en RAE fueron $0,24 \pm 0,02$, $0,24 \pm 0,02$, $0,21 \pm 0,01$, $0,09 \pm 0,01$, $0,10 \pm 0,02$, y $0,11 \pm 0,02$ y para RNE fueron $0,22 \pm 0,02$, $0,23 \pm 0,01$, $0,20 \pm 0,01$, $0,11 \pm 0,01$, $0,11 \pm 0,03$ y $0,12 \pm 0,02$. Finalmente, para R los promedios y errores estándares en RAE fueron $0,20 \pm 0,05$, $0,26 \pm 0,04$, $0,25 \pm 0,04$, $0,10 \pm 0,04$, $0,07 \pm 0,05$ y $0,08 \pm 0,03$ y en RNE fueron $0,15 \pm 0,05$, $0,23 \pm 0,04$, $0,25 \pm 0,04$, $0,18 \pm 0,04$, $0,11 \pm 0,05$ y $0,09 \pm 0,03$. No hubo diferencias significativas en la cantidad de W y N que ocurría en cada intervalo de 4 horas en ambos grupos, pero sí hubo diferencia significativa respecto a R, habiendo un mayor porcentaje de R en los dos primeros intervalos de 4 horas de la fase de luz en RAE ($p < 0,05$) y una menor porcentaje de R en los dos primeros intervalos de la fase de oscuridad ($p < 0,05$) (Fig.12, fig. c anexos).

3.2.3 Distribución circular de los estados: el ángulo medio y la longitud del vector de W en las ratas del grupo RNE fue de 270,2 (que equivale a las 1:06 horas) y 0,98

respectivamente, y para las ratas del grupo RAE fue de 264,8 (que equivale a las 00:36 horas) y 0,992 respectivamente. Para N, en el grupo RNE fue de 82,4 (12:30 horas) y de 0,985 y para el grupo RAE 80,4 (12:22 horas) y 0,99. Para R 138,3 (16:13 horas) y 0,8 para el grupo RNE y 107,2 (14:08 horas) y 0,886 para el grupo RAE. No hubo diferencias significativas entre las distribuciones circulares de W ni N entre grupos, pero sí en la distribución de R entre grupos ($p < 0,05$) estando anticipada en las ratas del grupo RAE con respecto al grupo RNE (Fig.13).

3.3 Arquitectura del CSV

3.3.1 Estadísticas descriptivas de la duración de episodios de W, N y R: la duración promedio y error estándar de episodios N en el grupo RNE fue de $55,7 \pm 1,2$ épocas y en el grupo RAE de $48,3 \pm 1,2$ épocas ($p < 0,05$). La duración promedio y error estándar de episodios R en el grupo RNE fue de $11,8 \pm 0,2$ épocas y en el grupo RAE de $12,7 \pm 0,3$ épocas ($p < 0,05$). La duración promedio y error estándar de episodios N que transitan a W en el grupo RNE fue de $51,1 \pm 2$ épocas y en el grupo RAE de $42,4 \pm 1,9$ épocas ($p < 0,05$). La duración promedio y error estándar de episodios R que transitan a W en el grupo RNE fue de $14,9 \pm 0,8$ épocas y en el grupo RAE de $18,5 \pm 0,8$ épocas ($p < 0,05$). La duración promedio y error estándar de episodios N que transitan a R en el grupo RNE fue de $58,5 \pm 1,5$ épocas y en el grupo RAE de $51 \pm 1,5$ épocas ($p < 0,05$). La duración promedio y error estándar de episodios R que transitan a N en el grupo

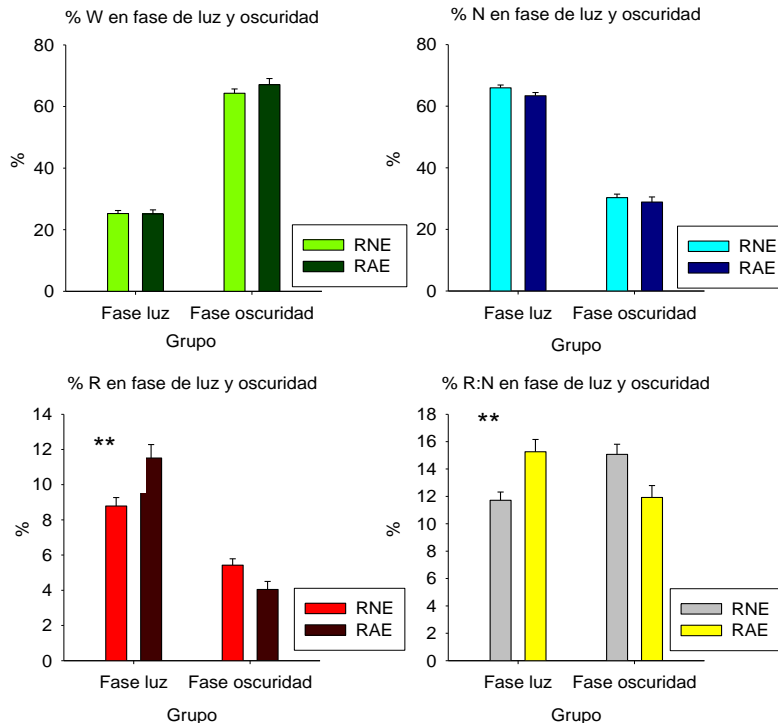


Fig. 11. Promedio de tiempo destinado a cada estado en fase de luz y oscuridad. Cada uno de los gráficos representa el porcentaje promedio y el error estándar del total de W (arriba, izquierda.), N (arriba, derecha) o R (abajo, izquierda) que ocurre en la fase de luz y en la fase de oscuridad para cada grupo. El gráfico de abajo a la derecha muestra la proporción promedio y el error estándar de R:N en fase de luz y oscuridad para cada grupo. ** P<0,05

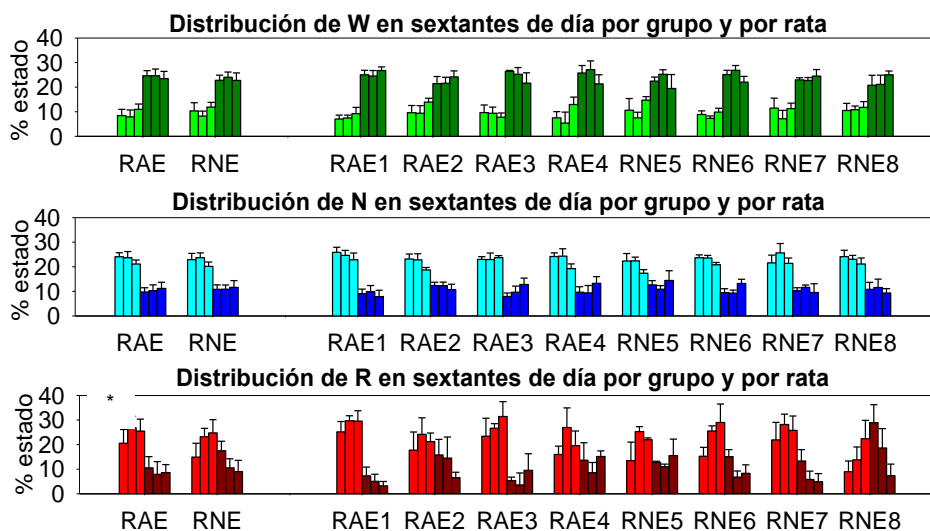


Fig. 12. Distribución de W, N y R en sextantes de día por grupo y por rata. Cada gráfico muestra los promedios globales y los errores estándares expresados como % del total que ocupa W (verde) N (azul) y R (rojo) en el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto intervalo de 4 h de un día por grupo y para cada rata. * P<0,05.

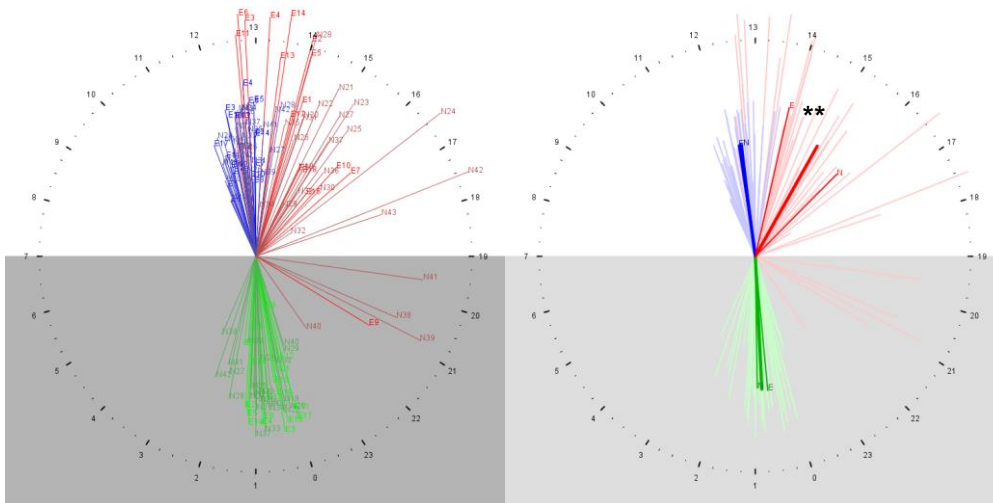


Fig. 13. Distribución circular de estados. Las figuras muestran los vectores que indican por su orientación el ángulo medio (hora de máxima concentración de estado) y por su longitud la concentración de datos en torno a ese ángulo. La figura de la izquierda muestra los vectores de la distribución circular de W (verde), N (azul) y R (rojo) para cada día rata. La figura de la derecha muestra además el promedio de distribución circular por grupo (líneas más delgadas) y el promedio de todas las ratas (líneas más gruesas). ** $p < 0,05$

RNE fue de $11,2 \pm 0,3$ épocas y en el grupo RAE de $11,4 \pm 0,4$ épocas ($p > 0,05$) (Fig.14).

3.3.2 Alternancias N-R dentro de un episodio de sueño: en primer lugar se determinó la cantidad de períodos de W y de dormir subsiguiente en la fase de luz. El promedio diario de episodios y el error estándar de W/ Sueño Total fue de $52,4 \pm 0,5$ para RAE y de $55,4 \pm 0,45$ para RNE ($p > 0,05$). En segundo lugar se determinó el número de alternancias N- R dentro de un bloque de sueño (Fig. 15). Hubo una gran cantidad de bloques de sueño que sólo alcanzaron a presentar un episodio de N. Estos representan el 44,4% de los bloques de sueño de las ratas RAE y el 50,4% de los bloques de sueño de las ratas de las ratas RNE ($p < 0,05$). En tercer lugar se

investigó la tendencia de ambos grupos a salir a W desde un episodio N o R. Los bloques de sueño de las ratas RAE transitaron a W desde N en un 71,5 % de los casos mientras que los bloques de sueño de las ratas RNE lo hicieron en un 77,5% de los casos ($p < 0,05$).

3.3.3 Interacciones entre las secuencias de estado.

3.3.3.1 Duración de episodios de cada estado como análisis de supervivencia: el chi cuadrado que comparó las salidas a W y R a distintos tiempos de transcurrido el episodio de N, indicó que hay más salidas a W al comienzo y más salidas a R al final ($p < 0,05$). Esto fue válido tanto para el grupo RAE como para el grupo RNE. Sin embargo, luego de

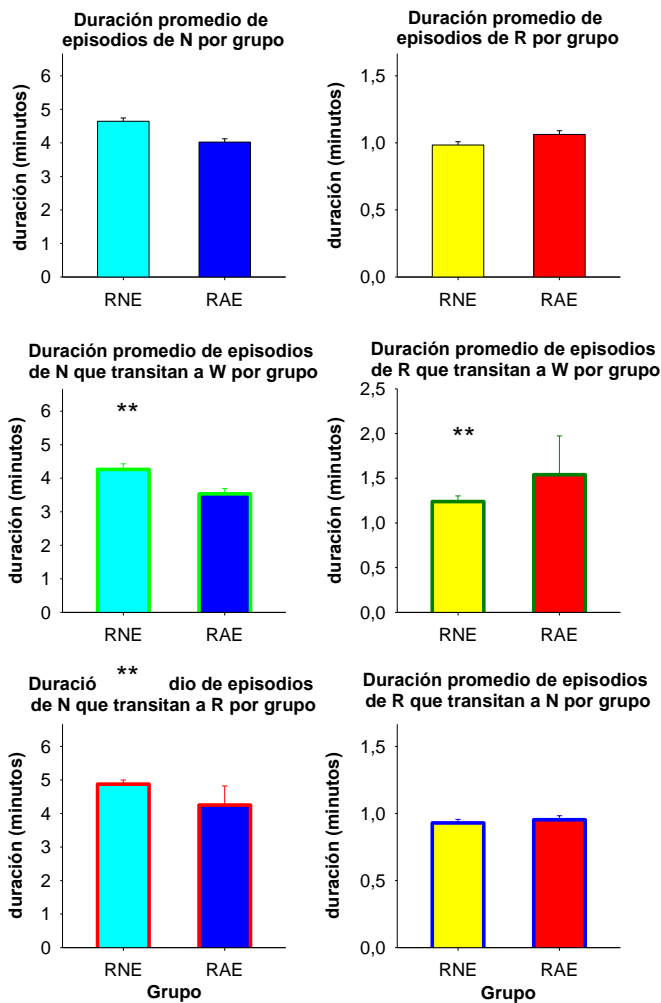
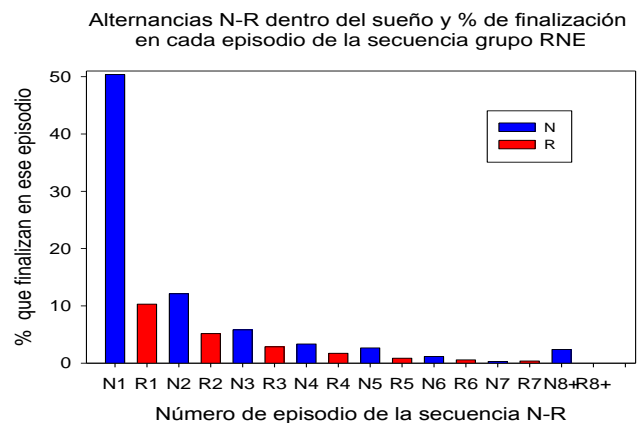
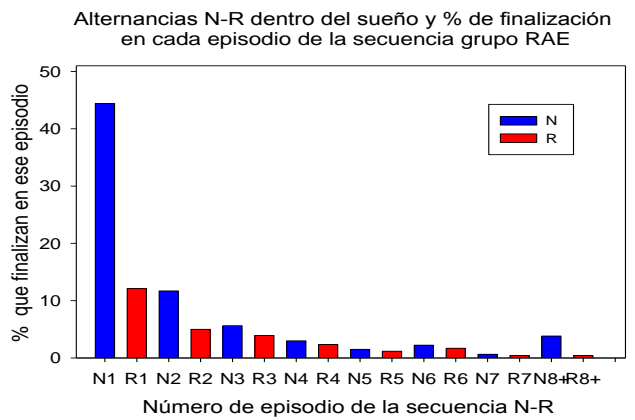


Fig.15 (der). Número de alternancias N-R dentro de un bloque de sueño. El eje x representa la secuencia de episodios N (azul)-R (rojo) que se presentaron en todos los bloques de sueño de cada grupo. Así, N1 es el primer episodio de N dentro del bloque de sueño, R1 es el primer episodio de R que se presentó siguiente al primer N, N2 es el episodio de N que sigue a R1, y así sucesivamente, hasta llegar al episodio de R número 8 dentro de la secuencia (los bloques de sueño con más de 15 alternancias N-R se consideraron dentro de los bloques con 15 alternancias). El eje y representa el porcentaje de los episodios de cada categoría de la secuencia que finalizaron en ese episodio. Así, el número de episodios de cada categoría que no cayeron dentro de este porcentaje pasaron al siguiente episodio de N ó R. Arriba se muestra el gráfico para RAE y abajo para RNE. **p<0,05.

Fig.14 (izq.) Duración de episodios. Este gráfico muestra la duración promedio y la desviación estándar de los episodios de N (columna izquierda) y R (columna derecha) por grupo. La primera fila muestra la duración promedio de todos los episodios de N y R, la segunda fila muestra la duración promedio de episodios de N y R que transitan a W y a tercera fila muestra la duración promedio de episodios de N y R que transitan a R y N, respectivamente **p<0,05



aplicar la prueba de chi cuadrado, se apreció que esta tendencia es más marcada en el grupo RNE (chi cuadrado= 21,6 para RAE y 33,1 para los RNE). Para el grupo RNE, el 28,4% de las salidas hacia W ocurrieron en el primer minuto del episodio de N, mientras que sólo ocurrieron ahí el 18,7% de las salidas a R. El porcentaje de las salidas a W que ocurrieron después de 4 minutos fue de 37,6%, mientras que a R fue de 46,3%. Para el grupo RAE, el 30,6% de las salidas hacia W ocurrieron en el primer minuto del episodio de N, mientras que sólo ocurrieron ahí el 21,3% de las salidas a R. El porcentaje de las salidas a W que ocurrieron después de 4 minutos fue de 34,5%, mientras que a R fue de 42,3%. Por otra parte, si utilizamos el chi cuadrado para comparar ambos grupos, la distribución de su salida a W no difirió (chi cuadrado 6,62 $p>0,05$). Sin embargo, el curso temporal de la incidencia de las salidas a R difirió significativamente entre grupos (chi cuadrado 20,83, $p<0.05$). Esta diferencia se explica porque las salidas a R ocurrieron más tempranamente en el curso temporal en las RAE que en las RNE. Por ejemplo, en el primer minuto, ocurrió el 23,2% de las salidas a R de las RAE, y el 18,7% en las RNE. Pasados los 4 minutos ocurrió el 46% de las

salidas a R de las RNE y el 42,4% de las RAE (Fig.16)

3.3.3.2 Homeostasis de corto plazo de R: al efectuar un análisis de regresión de la duración del segundo episodio de N sobre el primer episodio de R de un bloque de sueño, se estableció que hay una relación significativa entre las dos variables sólo en el grupo RAE con un coeficiente de 0,04 y un r cuadrado de 0,04 ($p<0.05$). La relación entre las duraciones del segundo episodio de R del bloque y el tercer episodio del N del bloque de sueño también fue sólo significativa en las RAE con un coeficiente de 0,04 y un r cuadrado de 0,03 ($p<0.05$). Por lo tanto, la homeostasis de corto plazo del R se expresó mejor en las RAE (Fig.17).

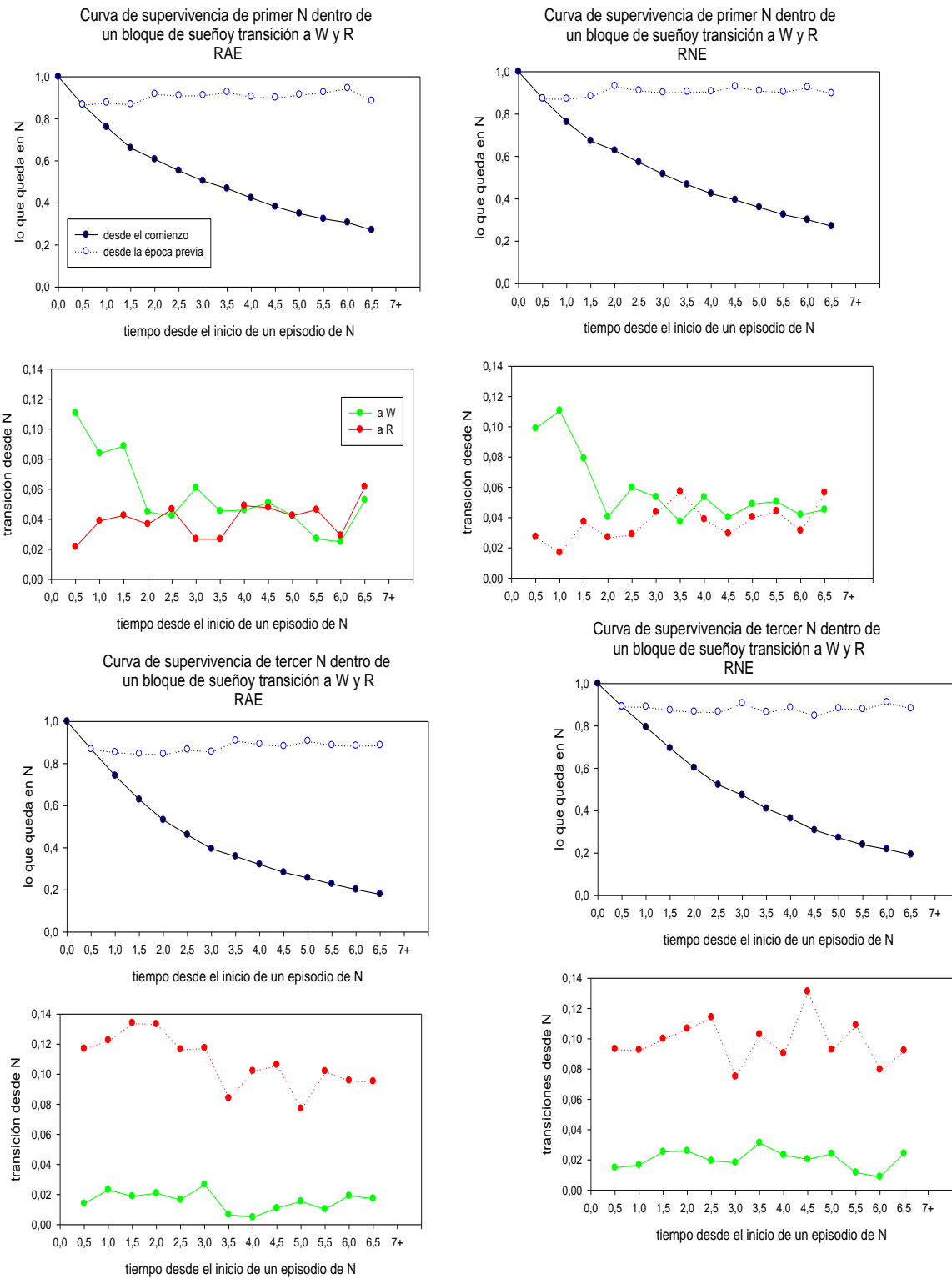


Fig. 16. Curva de supervivencia y transiciones desde un episodio de N por grupo. Los cuatro gráficos de la fila de la izquierda corresponden al grupo RAE y los de la fila derecha al grupo RNE. Las 2 filas superiores representan las curvas de supervivencia de N y las transiciones desde N por grupo si consideramos sólo los primeros episodios de N dentro de un ciclo de sueño, y las filas de abajo representan lo mismo pero si consideramos los terceros episodios de N dentro de un bloque de sueño.

Homeostasis corto plazo REM

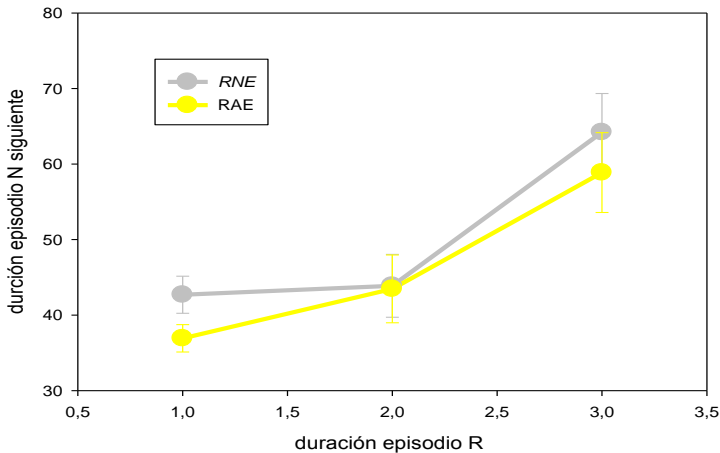


Fig. 17. Homeostasis de corto plazo R por grupo. El eje x representa la duración de un episodio de R en minutos, el eje y representa a duración del episodio de N siguiente. La línea amarilla muestra al grupo RAE y la línea gris a grupo RNE.

3. DISCUSIÓN

Estudios anteriores describieron efectos del EA en el sentido de producir un aumento tanto del número como de la duración de episodios de R (Gutwein y Fishbein, 1980; Mirmiran et al., 1982; Tagney, 1973). Como fue sugerido en la introducción, estos resultados se derivaron de registros polisomnográficos de corta duración y las conclusiones relacionaron estos efectos del EA con el propuesto rol de R memoria y aprendizaje. Sin embargo, debe establecerse que los estudios de sueño en general son sujetos a posible sesgo por cuanto existe un número de épocas de características ambiguas y existe la posibilidad de utilizar las llamadas reglas de continuidad o suavización que hace que se incorpore a un episodio de un determinado estado algunas pocas épocas que podrían no corresponder exactamente a éste. Es destacable entonces el valor de que este estudio sea el primero en evaluar los efectos del EA sobre el sueño basándose en registros polisomnográficos de larga duración y libre de toda posibilidad de sesgo, por

basarse en un diagnóstico automatizado de estados. Por otra parte, este estudio no se limitó a evaluar los efectos sobre el sueño indicando sólo las medidas más gruesas como cantidad de cada estado o duración promedio de los episodios, sino que abordó una evaluación mucho más refinada a nivel de arquitectura del sueño, ampliando entonces las dimensiones en que pueden evaluarse cambios. Esto resulta particularmente relevante si consideramos que los factores potencialmente importantes del sueño en la relación entre éste y aprendizaje, pueden ser mucho más sutiles que lo que originalmente se suponía (Ficca y Salzarulo, 2004; Stickgold y Walker, 2005a, b, y 2007). Así, la comparación que aquí se realizó entre sueño de ratas que viven en un ambiente estándar de laboratorio y el de aquellas que viven en un ambiente enriquecido, puede ser proyectada con nuevas perspectivas.

La cantidad total de estados por día se mantuvo dentro de rangos estrechos y concordantes con la literatura: 40-50% para

W, 45-50% para N y 7-10% para R (Rosenberg et al., 1979). A diferencias de estudios publicados que indicaban una mayor cantidad de R, no se encontraron diferencias significativas entre grupos para la cantidad total de ningún estado. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la distribución luz:oscuridad de W o N, pero sí de R donde, teniendo ambos grupos predominio diurno, el de RAE resulta ser significativamente mayor. Relacionado a este hecho, la razón R/N, está significativamente aumentada durante la fase de luz en el grupo RAE.

Un análisis más fino de las medidas de tendencia central y dispersión (hora promedio y distribución), mostró un avance de fase significativo de R, algo mayor que dos horas de la RAE respecto a las RNE. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en las distribuciones circulares de N o W.

En cuanto a la duración de episodios individuales de cada estado, no se encontraron diferencias significativas para W, pero sí para los estados de sueño, donde el grupo RAE tiene promedios de duración más cortos para N y más largos para aquellos episodios de R que transitaban a W.

Respecto a la arquitectura de los bloques de sueño se constató, en primer lugar, que hubo significativamente más alternancias N/R en el grupo RAE que en RNE. Más aún, el grupo RAE presentó una tendencia significativamente mayor que RNE a terminar los bloques de sueño con un

episodio de R. Además de pudo apreciar que el tránsito de N a R es significativamente más precoz en el grupo RAE que en el grupo RNE (la duración de los episodios de N previos a un episodio de R fueron más cortos).

Por último, se estudió la homeostasis de corto plazo de R, donde se cuantificó la relación entre un episodio de R y el episodio siguiente de N. En ambos grupos se cumplió lo esperado: a mayor longitud de un episodio de R mayor fue el episodio de N que lo siguió y esta relación fue significativa. Sin embargo, se observó que en el grupo RAE el grado de asociación entre ambas variables es significativamente mayor.

Tomando el conjunto de hallazgos significativos al comparar el sueño del grupo RAE y el grupo RNE, lo primero que sobresale es que las diferencias en gran medida, si no exclusivamente, se refieren al sueño R. Por una parte, las diferencias se relacionan con la distribución en las 24 horas del R que podría vincularse al reloj biológico. Al respecto, se ha postulado que el entrenamiento de la memoria podría funcionar como un sincronizador externo, capaz de inducir una respuesta inmediata alterando la fase o amplitud de ciclos de neuronas hipocampales (Eckel-Mahan y Storm, 2009). En este sentido, el mayor aprendizaje que tendrían las ratas RAE podría estar cambiando la fase del ciclo circadiano de las células del hipocampo y, con ello, la aparición del ritmo theta hipocampal, característico de R. Por otra

parte, lo que puede tener sentido es suponer que en un ambiente enriquecido el requerimiento de R se anticipe por su vínculo con procesamiento de información adquirida.

Otra diferencia encontrada tiene que ver con la secuencia de episodios al interior del bloque de sueño. Los hallazgos significativos destacados arriba indican no sólo una mayor duración de los episodios de R, sino una mayor propensión a transitar más precozmente desde el N al R (mayores transiciones entre estados dentro de un mismo bloque de sueño) y una mejor homeostasis de R. Esto nuevamente podría estar relacionado con procesos de aprendizaje, y podría apoyar la “hipótesis de dos pasos”, que sugiere que la consolidación de la memoria estaría relacionada a la cooperación entre N y R (Ficca y Salzarulo, 2004). Así, en las ratas RAE, al tener nuevas experiencias que aumentan su necesidad de consolidación de memoria, la mayor cooperación entre estados se vería reflejada en una mayor cantidad de transiciones entre ambos. Así también, podría sugerirse que el mejor ajuste de la homeostasis de corto plazo de R en las RAE es un reflejo de una mejor funcionalidad de la relación entre ambos estados.

Uno de los primeros aspectos que se quiere abordar es la posible relación funcional entre el EA y sueño, principalmente R, considerando por un lado que el EA conlleva respuestas positivas a nivel de desarrollo cognitivo y neurológico (Altman y Das, 1964; Bennett, 1976; Cummins et al.,

1973; Diamond et al., 1966, 1976; Greenough, 1976; Greenough y Volkmar, 1973; Greenough et al., 1978; Holloway, 1966; Kempermann et al., 1997; Walsh et al., 1969; Walsh y Cummins, 1979) y, por otro lado, que en los últimos años se ha propuesto que el sueño tendría un rol relevante en la regulación de la neurogénesis y aprendizaje (Meerlo et al., 2009).

Se ha establecido que hay al menos dos regiones en las que hay neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos: el giro dentado de la formación hipocampal y la zona subventricular alineada a la pared de los ventrículos cerebrales laterales (Gould, 2007). El término neurogénesis usualmente se refiere a los procesos combinados de proliferación, supervivencia, maduración y diferenciación celular hacia una neurona. Considerablemente, el índice de neurogénesis en el cerebro adulto no es constante. Cada aspecto del proceso de neurogénesis, desde proliferación hasta supervivencia y diferenciación, puede ser regulado y modulado. En el giro dentado de ratas adultas, un número estimado de 4000-9000 nuevas células son generadas diariamente (Cameron y McKay, 2001; Rao y Shetty, 2004). Bajo condiciones estándares de laboratorio, cerca del 60% de las nuevas células mueren dentro de pocas semanas posteriores a su generación. Sin embargo, tanto el EA como el ejercicio y el aprendizaje han demostrado afectar positivamente la proliferación o la tasa de supervivencia (Abrous et al., 2005).

La función de neuronas recién formadas en el cerebro adulto sigue siendo un tema de intensa investigación y discusión (Aimone et al., 2006; Doetsch y Hen, 2005; Kempermann, 2008; Kempermann et al., 2004; Lledo et al., 2006). La mayoría de los estudios se han enfocado en nuevas neuronas en el giro dentado y su posible rol en la función hipocampal. El hipocampo es una parte importante del sistema límbico cognitivo que juega un rol central en la regulación de funciones cognitivas y emociones (Bannerman et al., 2004; Bast, 2007; Moser y Moser, 1998; Phelps, 2004). Congruentemente con un rol de la neurogénesis en la función hipocampal, hay una serie de estudios que demuestran que el aprendizaje y la formación de memoria dependiente de hipocampo están asociados con una mayor proliferación celular y neurogénesis, mientras que problemas de aprendizaje están asociados con una neurogénesis reducida (Leuner et al., 2006).

En los últimos años se ha propuesto que el sueño tendría un rol relevante en la regulación de la neurogénesis en mamíferos adultos, apoyando la función del hipocampo. Para examinar el rol del sueño sobre la neurogénesis, varios estudios privaron o interrumpieron sueño de forma experimental. Los resultados de éstos han sugerido que el índice basal de proliferación celular en el giro dentado no se ve fuertemente afectado por privaciones de sueño menores a un día de duración (Guzman-Marin et al., 2007; Mirescu et al., 2006; Roman et al., 2005; van der Borght et al., 2006). Sin embargo, la

proliferación celular es suprimida significativamente cuando la privación o la interrupción de sueño es prolongada y dura dos días o más (Guzman-Marin et al., 2003, 2005, 2007, 2008; Mirescu et al., 2006; Tung et al., 2005). La privación o interrupción del sueño podría no sólo tener un impacto negativo sobre la proliferación celular si no que también sobre la supervivencia, maduración y diferenciación de estas células. Varios estudios en ratas muestran que la interrupción de sueño reduce la fracción de nuevas células que más tarde expresan un fenotipo neuronal (Guzman-Marin et al., 2005, 2007, 2008). Este efecto de la privación o interrupción de sueño sobre neurogénesis podría explicarse por la reducción específica de R (Guzman-Marin et al., 2008).

Muchos estudios sugieren que el sueño juega un rol importante en el aprendizaje y memoria (Graves et al., 2001; Stickgold, 2005; Stickgold y Walker, 2005a). El sueño podría estimular la formación de memoria al promover la supervivencia e integración funcional de nuevas neuronas hipocampales. Ciertamente, una posible relación entre sueño y neurogénesis en el contexto del aprendizaje se corresponde con interesantes descubrimientos. El primero es que el hipocampo es una estructura importante para la formación de la memoria y una de las pocas áreas cerebrales que manifiesta una cantidad de neurogénesis sustancial en el mamífero adulto. Segundo, tanto la neurogénesis como los procesos de memoria hipocampal son sensibles a la

pérdida de sueño. Es más, la privación de sueño altera propiedades moleculares y electrofisiológicas de neuronas hipocampales, como reducción de la excitabilidad neuronal e inhibición de potenciación a largo plazo de potencia sináptica (McDermott et al., 2003) y tiene un efecto disruptivo particular sobre formación de memoria cuando esta es dependiente de hipocampo (Graves et al., 2003; Ruskin et al., 2004).

Así, los efectos del EA sobre el sueño podrían tener relación con procesos de aprendizaje y neurogénesis. El EA es un modelo experimental en el cual los animales son alojados en condiciones que potencian las interacciones sociales y la estimulación sensorial y motora (Mora et al., 2007; Rosenzweig y Bennett, 1996; van Praag et al., 2000). Ratas enriquecidas exhiben habilidades aumentadas de aprendizaje y memoria en relación a sus compañeros de camada alojados en ambientes no enriquecidos (Brown, 1968; Greenough et al., 1972; Tees, 1999; Woodcock y Richardson, 2000) y este efecto positivo del EA puede presentarse incluso en la adultez (Green et al., 1983; Rosenzweig y Bennett, 1996; Soffie et al., 1999). Más aún, el EA puede aumentar la proliferación de nuevas neuronas hipocampales en roedores durante la mediana edad y senectud (Kempermann et al., 1997, 1998). El vivir en un ambiente que potencia las funciones cognitivas y la neurogénesis podría requerir un sueño distinto a aquél que se presenta en condiciones estándares de laboratorio, por lo

que los sutiles cambios a nivel de arquitectura y circadianeidad encontrados en el grupo de las ratas enriquecidas podrían ser un reflejo de diferente funcionalidad cerebral.

Un segundo tema a discutir es la posibilidad de que procesos relacionados a estrés sean los que producen estos cambios en el sueño de las ratas del grupo RAE. Esto, porque el ambiente de registro polisomnográfico presenta condiciones que podrían causar estrés sobre los animales, tales como dolor inflamatorio pos quirúrgico, conexión constante al sistema de registro y aislamiento social.

La rata es una especie gregaria que en la naturaleza vive en grupos sociales (Barnett, 2005). Ha sido ampliamente observado que el aislamiento social es deletéreo para ratas, y que el estrés por aislamiento altera características tanto fisiológicas como conductuales (Wiberg y Grice, 1963). Por ejemplo, el alojamiento individual impacta sobre la presión sanguínea y frecuencia cardiaca (Woodworth y Johnson, 1988), ritmos circadianos (Greco et al., 1989), maduración sexual (Swanson y Van de Poll, 1983), peso corporal y duración de vida (Menich y Baron, 1984; Moon et al., 2006), respuesta a drogas (Juraska et al., 1983) y actividad del sistema inmune (Jessop y Bayer, 1989). También afecta medidas de conducta sexual (Spevak et al., 1973; Swanson y Van de Poll, 1983), autoadministración de morfina (Alexander et

al., 1978) y actividad de campo abierto (Menich y Baron, 1984; Thorsell et al., 2006).

En el grupo RNE, se suman incluso otros factores que son potencialmente estresantes para ratas, como la ausencia de material para hacer nidos y piso grillado (Baenninger, 1967; Kaliste-Korhonen et al., 1995; Krohn et al., 2003) y la ausencia de refugios (Townsend, 1997).

Los efectos del EA sobre la respuesta a estrés no están completamente comprendidos (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Roy et al., 2001). Sin embargo, pruebas indican que el EA puede proteger frente a, e incluso revertir, los efectos de factores negativos como la exposición intensa a un estrés. Es así como estudios han revelado que el EA sirve para atenuar la reactividad emocional a estresores (Chamove, 1989; Chapillon et al., 1999; Manosevitz, 1970). Los animales que viven en un ambiente enriquecido han demostrado en repetidas ocasiones expresar relativamente menores niveles de conductas relacionadas a emociones negativas tales como defecación y congelamiento (Escorihuela et al., 1994; Fernandez-Teruel et al., 1992, 1997; Klein et al., 1994; Larsson et al., 2002), estar más relajados y ser más fáciles de manipular por los experimentadores (Van de Weerd et al., 2002), expresar menos conductas anormales o no deseadas (Boinski et al., 1999) y ser más juguetones (Marashi et al., 2003). Se ha demostrado reiteradamente que el EA aumenta el número de entradas a los brazos

abiertos y el tiempo destinado en ellos en el laberinto elevado en cruz, indicando menor ansiedad (Chapillon et al., 1999; Fernandez-Teruel et al., 1997; Friske y Gammie, 2005). Este efecto ansiolítico del EA es duradero y resistente a estimulación experimental extensa incluso cuando los animales son expuestos al enriquecimiento sólo durante la adultez (Larsson et al., 2002). Por lo tanto, los animales del grupo RAE podrían presentar menores niveles de estrés que el grupo RNE.

Se ha descubierto recientemente que el estrés tiene un efecto prominente sobre los patrones de sueño, sin embargo, los estudios del efecto del estrés sobre sueño han tenido resultados dispares. Por ejemplo, Meerlo y Turek (2001) describieron que la cantidad de N de ondas lentas aumenta luego de estrés de conflicto social en las seis horas subsecuentes de sueño. Otros estudios indican que R disminuye en ratas luego de estrés por miedo contextual (Jha et al., 2005; Tang et al., 2005) y Gronli et al (2004) describieron que la exposición a estrés suave impredecible por 4 semanas produjo en ratas un aumento en la fragmentación del sueño, así como en la cantidad de R. Estas diferencias en los resultados podrían deberse a que se usaron diferentes protocolos de experimentación, lo que indicaría que los efectos del estrés sobre sueño dependen del tipo de estrés.

De cualquier forma, no considerar el estrés como un factor importante en estudios de sueño que usan modelos animales podría

alterar la interpretación de los resultados. En este sentido, una próxima aproximación al tema de los efectos de EA sobre sueño podría incluir evaluación del estrés, ya sea usando variables endocrinas (ACTH, corticosterona, etc.) o pruebas conductuales (laberinto en cruz elevado, campo abierto, etc.).

Este estudio permitió detectar diferencias entre el sueño de ratas que viven en un ambiente enriquecido vs. ratas que viven en un ambiente no enriquecido. Los cambios encontrados se relacionan principalmente a R. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el EA genera cambios en el sueño son aún desconocidos. En los últimos años se han generado una serie de avances que relacionan procesos de aprendizaje y neurogénesis con sueño. Nosotros creemos que estas relaciones son las que podrían explicar los cambios encontrados en este estudio, considerando que el EA sería un protocolo experimental que potencia tanto el desarrollo y fisiología normal del cerebro, como procesos cognitivos. Sería muy interesante profundizar en esta línea de investigación y evaluar otras variables que permitieran entender mejor los mecanismos por los cuales el EA podría influir sobre sueño, tales como neurogénesis, aprendizaje y estrés.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrous, D., Koehl, M., Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85, 523-69.

Aimone, J. B., Wiles, J., Gage, F. H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9, 723-7.

Alexander, B. K., Coombs, R. B., Hadaway, P. F. (1978). The effect of housing and gender on morphine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 58, 175-9.

Altman, J., Das, G. D. (1964). Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature* 204, 1161-1163.

Allen, S. R., Oswald, I., Lewis, S., Tagney, J. (1972). The effects of distorted visual input on sleep. *Psychophysiology* 9 498-504.

Baenninger, L. P. (1967). Comparison of behavioural development in socially isolated and grouped rats. *Anim Behav* 15, 312-23.

Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, S. B., Deacon, R. M., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H., Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 273-83.

Barnett, S. A. (2005). Ecology. **In** "The Behavior of the Laboratory Rat" Whishaw, Kolb, B. 2005/Ed. Oxford.15-24. Oxford University Press., Oxford.

- Barrett, T. R., Ekstrand, B. R. (1972). Effect of sleep on memory. III. Controlling for time-of-day effects. *J Exp Psychol Bull* 96, 321-7.
- Bassi, A., Diaz, J., Duque, N., Vivaldi, E. (2010). The dynamics of transition preference coming out of NREM and REM sleep. *In* "32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society", Buenos Aires.
- Bast, T. (2007). Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. *Rev Neurosci* 18, 253-81.
- Batschelet, E. (1981). "Circular statistics in biology." Academic Press., London.
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., Pick, C. G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 20, 1341-7.
- Bennett, E. L. (1976). "Neural Mechanisms of Learning and Memory," In Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L. (Eds), *Neural Mechanisms of Learning and Memory*, MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 279-287.
- Boinski, S., Swing, S. P., Gross, T. S., Davis, J. K. (1999). Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. *Am J Primatol* 48, 49-68.
- Borbely, A. A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol* 1, 195-204.
- Borbely, A. A., Achermann, P. (1992). Concepts and models of sleep regulation: an overview. *J Sleep Res* 1, 63-69.
- Bracewell, R. (1999). "The Fourier Transform & Its Applications," 3, June 8, 1999/Ed. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, Stanford.
- Brown, R. T. (1968). Early experience and problem-solving ability. *J Comp Physiol Psychol* 65, 433-40.
- Cameron, H. A., McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435, 406-17.
- Castaldo, V., Krynicki, V., Goldstein, J. (1974). Sleep stages and verbal memory. *Percept Mot Skills* 39, 1023-30.
- Chamove, A. S. (1989). Cage design reduces emotionality in mice. *Lab Anim* 23, 215-9.
- Chapillon, P., Manneche, C., Belzung, C., Caston, J. (1999). Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* 29, 41-6.
- Cipolli, C., Salzarulo, P. (1975). Effect of memory retrieval task on recall of verbal material obtained after awakening from sleep. *Biol Psychol* 3, 321-6.
- Cipolli, C., Salzarulo, P. (1979). Sentence memory and sleep. *Sleep* 2, 193-8.
- Cummins, R. A., Walsh, R. N., Budtz-Olsen, O. E., Konstantinos, T., Horsfall, C. R.

(1973). Environmentally-induced changes in the brains of elderly rats. *Nature* 243, 516-8.

Czeisler, C. A., Dijk, D.J (2001). Human circadian physiology and sleep– wake regulation. **In** Takahashi, J.S., Turek, F. & Moore, R.Y. (Eds), *Handbook of Behavioral Neurobiology: Circadian Clocks*. Kluwer Academic/Plenum Publishing Co, New York, 531–561.

Daan, S., Beersma, D. G., Borbely, A. A. (1984). Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol* 246, R161-83.

De Koninck, J., Lorrain, D., Christ, G. (1989). Intensive language learning and increases in rapid eye movement sleep: evidence of a performance factor. *Int J Psychophysiol* 8, 43-7.

Deza, M., Deza, E. (2009). "Encyclopedia of Distances," 1, August 11 2009/Ed. Springer.

Diamond, M. C., Ingham, C. A., Johnson, R. E., Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R. (1976). Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol* 7, 75-85.

Diamond, M. C., Law, F., Rhodes, H., Lindner, B., Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L. (1966). Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J Comp Neurol* 128, 117-26.

Dijk, D. J., Czeisler, C. A. (1994). Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and

wakefulness in humans. *Neurosci Lett* 166, 63-8.

Dijk, D. J., Czeisler, C. A. (1995). Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *J Neurosci* 15, 3526-38.

Dijk, D. J., Von Schantz, M. (2005). Timing and consolidation of human sleep, wakefulness, and performance by a symphony of oscillators. *J Biol Rhythms* 20, 279-90.

Doetsch, F., Hen, R. (2005). Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 15, 121-8.

Eckel - Mahan, K. L., Storm, D. R. (2009). Circadian rhythms and memory: not so simple as cogs and gears. *EMBO Rep* 10, 584-91.

Empson, J. A., Clarke, P. R. (1970). Rapid eye movements and remembering. *Nature* 227, 287-8.

Escorihuela, R. M., Tobena, A., Fernandez-Teruel, A. (1994). Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav Brain Res* 61, 169-73.

Feinberg, I. (1974). Changes in sleep cycle pattern with age. *J Psychiatr Res* 10, 283-306.

- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Castellano, B., Gonzalez, B., Tobena, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet* 27, 513-26.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Nunez, J. F., Goma, M., Driscoll, P., Tobena, A. (1992). Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett* 137, 185-8.
- Ficca, G., and Salzarulo, P. (2004). What in sleep is for memory. *Sleep Med* 5, 225-230.
- Fogel, S. M., Smith, C. T., Cote, K. A. (2007). Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems. *Behav Brain Res* 180, 48-61.
- Fowler, M. J., Sullivan, M. J., Ekstrand, B. R. (1973). Sleep and memory. *Science* 179, 302-4.
- Friske, J. E., Gammie, S. C. (2005). Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiol Behav* 85, 187-94.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8, 481-8.
- Graves, L., Pack, A., Abel, T. (2001). Sleep and memory: a molecular perspective. *Trends Neurosci* 24, 237-43.
- Graves, L. A., Heller, E. A., Pack, A. I., Abel, T. (2003). Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem* 10, 168-76.
- Greco, A. M., Gambardella, P., Sticchi, R., D'Aponte, D., Di Renzo, G., De Franciscis, P. (1989). Effects of individual housing on circadian rhythms of adult rats. *Physiol Behav* 45, 363-6.
- Green, E. J., Greenough, W. T., Schlumpf, B. E. (1983). Effects of complex or isolated environments on cortical dendrites of middle-aged rats. *Brain Res* 264, 233-40.
- Greenough, W. T. (1976). "Neural Mechanisms of Learning and Memory " MIT Press, Cambridge, Massachusetts. Rosenzweig, M.R.; Bennett, E.L. (Eds), 255-278
- Greenough, W. T., Volkmar, F. R. (1973). Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol* 40, 491-504.
- Greenough, W. T., West, R. W., DeVogd, T. J. (1978). Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat. *Science* 202, 1096-8.
- Greenough, W. T., Wood, W. E., Madden, T. C. (1972). Possible memory storage differences among mice reared in environments varying in complexity. *Behav Biol* 7, 717-22.

- Gronli, J., Murison, R., Bjorvatn, B., Sorensen, E., Portas, C. M., Ursin, R. (2004). Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats. *Behav Brain Res* 150, 139-47.
- Gutwein, B. M., Fishbein, W. (1980). Paradoxical sleep and memory (I): Selective alterations following enriched and impoverished environmental rearing. *Brain Res Bull* 5, 9-12.
- Guzman-Marin, R., Bashir, T., Suntsova, N., Szymusiak, R., McGinty, D. (2007). Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. *Neuroscience* 148, 325-33.
- Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Bashir, T., Nienhuis, R., Szymusiak, R., McGinty, D. (2008). Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep* 31, 167-75.
- Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Methippara, M., Greiffenstein, R., Szymusiak, R., McGinty, D. (2005). Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 22, 2111-6.
- Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Stewart, D. R., Gong, H., Szymusiak, R., McGinty, D. (2003). Sleep deprivation reduces proliferation of cells in the dentate gyrus of the hippocampus in rats. *J Physiol* 549, 563-71.
- Hennevin, H., Hars, B., Maho, C. (1995). Memory processing in paradoxical sleep. *SRS Bull* 1, 44-9.
- Holloway, R. L. (1966). Dendritic branching: some preliminary results of training and complexity in rat visual cortex. *Brain Res* 2, 393-396.
- James, J. F. (2003). "A Student's Guide to Fourier Transforms: With Applications in Physics and Engineering," 2, February 10, 2010/Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jessop, J. J., Bayer, B. M. (1989). Time-dependent effects of isolation on lymphocyte and adrenocortical activity. *J Neuroimmunol* 23, 143-7.
- Jha, S. K., Brennan, F. X., Pawlyk, A. C., Ross, R. J., Morrison, A. R. (2005). REM sleep: a sensitive index of fear conditioning in rats. *Eur J Neurosci* 21, 1077-80.
- Joliffe, I. T. (2010). "Principal Component Analysis," 2, November 2, 2010/Ed. Springer.
- Juraska, J. M., Greenough, W. T., Conlee, J. W. (1983). Differential rearing affects responsiveness of rats to depressant and convulsant drugs. *Physiol Behav* 31, 711-5.
- Kaliste-Korhonen, E., Eskola, S., Rekila, T., Nevalainen, T. (1995). Effects of gnawing material, group size and cage level in rack on Wistar rats Scan *J Lab Anim Sci* 22, 291-299.
- Kempermann, G. (2008). The neurogenic reserve hypothesis: what is adult

- hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci* 31, 163-9.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-5.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18, 3206-12.
- Kempermann, G., Wiskott, L., Gage, F. H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14, 186-91.
- Klein, D. C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Oxford University Press, New York 125-177.
- Klein, S. L., Lambert, K. G., Durr, D., Schaefer, T., Waring, R. E. (1994). Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol Behav* 56, 291-7.
- Krohn, T. C., Hansen, A. K., Dragsted, N. (2003). Telemetry as a method for measuring the impact of housing conditions on rat's welfare. *Anim Welf* 12, 53-62.
- Larsson, F., Winblad, B., Mohammed, A. H. (2002). Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 193-207.
- Leuner, B., Gould, E., Shors, T. J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16, 216-24.
- Lledo, P. M., Alonso, M., Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7, 179-93.
- Mandai, O., Guerrieri, A., Sockeel, P. (1989). REM sleep modifications following a morse code learning session in humans. *Physiol Behav* 46, 639-42.
- Manosevitz, M. (1970). Early environmental enrichment and mouse behavior. *J Compar Physiol Psychol* 71, 459-466.
- Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorf, E., Sachser, N. (2003). Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav* 43, 281-92.
- Mardia, K. V. (1972). A multi-sample uniform scores test on a circle and its parametric competitor. *Royal Statistical Society*, 102-113.
- McDermott, C. M., LaHoste, G. J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N. G., Magee, J. C. (2003). Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23, 9687-95.
- Meerlo, P., Turek, F. W. (2001). Effects of social stimuli on sleep in mice: non-rapid-eye-movement (NREM) sleep is promoted by

aggressive interaction but not by sexual interaction. *Brain Res* 907, 84-92.

Meerlo, P., Mistlberger, R. E., Jacobs, B. L., Heller, H. C., McGinty, D. (2009). New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep Med Rev* 13, 187-94.

Menich, S. R., Baron, A. (1984). Social housing of rats: life-span effects on reaction time, exploration, weight, and longevity. *Exp Aging Res* 10, 95-100.

Mignot, E. (2008). Why we sleep: The Temporal Organization of Recovery. *PLoS Biol* 6, 661-9.

Mirescu, C., Peters, J. D., Noiman, L., Gould, E. (2006). Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103, 19170-5.

Mirmiran, M., Van den Dungen, H., Uylings, H. B. (1982). Sleep patterns during rearing under different environmental conditions in juvenile rats. *Brain Res* 233, 287-98.

Moon, L. D., Leasure, J. L., Gage, F. H., Bunge, M. B. (2006). Motor enrichment sustains hindlimb movement recovered after spinal cord injury and glial transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 24, 147-61.

Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev* 55, 78-88.

Moser, M. B., Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608-19.

Ocampo-Garces, A., Vivaldi, E. A. (2002). Short-term homeostasis of REM sleep assessed in an intermittent REM sleep deprivation protocol in the rat. *J Sleep Res* 11, 81-9.

Pace-Schott, E. F., Hobson, J. A. (2002). The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* 3, 591-605.

Pearlman, C. A. (1981). Rat models of the adaptive function of REM sleep. **In:** Fishbein W, editor. Sleep, dreams and memory. Lancaster: MTP Press, 37-46.

Phelps, E. A. (2004). Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 14, 198-202.

Rao, M. S., Shetty, A. K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19, 234-46.

Rechtschaffen, A., Kales, A. (1968). "A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects," National Institutes of Health, Neurological Information Network New York.

Rechtschaffen, A., Verdone, P., Wheaton, J. (1963). Reports of Mental Activity during Sleep. *Can Psychiatr Assoc J* 257, 409-14.

- Roman, V., Van der Borght, K., Leemburg, S. A., Van der Zee, E. A., Meerlo, P. (2005). Sleep restriction by forced activity reduces hippocampal cell proliferation. *Brain Res* 1065, 53-9.
- Rosenberg, R. S., Zepelin, H., Rechtschaffen, A. (1979). Sleep in young and old rats. *J Gerontol* 34, 525-32.
- Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 78, 57-65.
- Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., Chapillon, P. (2001). Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav* 74, 313-20.
- Ruskin, D. N., Liu, C., Dunn, K. E., Bazan, N. G., LaHoste, G. J. (2004). Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. *Eur J Neurosci* 19, 3121-4.
- Siegel, J. M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437, 1264-71.
- Smith, C. (1995). Sleep states and memory processes. *Behav Brain Res* 69, 137-45.
- Soffie, M., Hahn, K., Terao, E., Eclancher, F. (1999). Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res* 101, 37-49.
- Spevak, A. M., Quadagno, D. M., Knoepfel, D. (1973). The effects of isolation on sexual and social behavior in the rat. *Behav Biol* 8, 63-73.
- Stickgold, R. (2005). Sleep-dependent memory consolidation. *Nature* 437, 1272-8.
- Stickgold, R., Walker, M. P. (2005a). Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep? *Trends Neurosci* 28, 408-15.
- Stickgold, R., Walker, M. P. (2005b). Sleep and memory: the ongoing debate. *Sleep* 28, 1225-7.
- Stickgold, R., Walker, M. P. (2007). Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. *Sleep Med* 8, 331-43.
- Swanson, H. H., Van de Poll, N. E. (1983). Effects of an isolated or enriched environment after handling on sexual maturation and behaviour in male and female rats. *J Reprod Fertil* 69, 165-71.
- Tagney, J. (1973). Sleep patterns related to rearing rats in enriched and impoverished environments. *Brain Res* 53, 353-61.
- Tang, X., Liu, X., Yang, L., Sanford, L. D. (2005). Rat strain differences in sleep after acute mild stressors and short-term sleep loss. *Behav Brain Res* 160, 60-71.
- Tees, R. C. (1999). The influences of sex, rearing environment, and neonatal choline dietary supplementation on spatial and nonspatial learning and memory in adult rats. *Dev Psychobiol* 35, 328-42.
- Thorsell, A., Slawecki, C. J., El Khoury, A., Mathe, A. A., Ehlers, C. L. (2006). The

effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83, 28-34.

Tilley, A. J., Empson, J. A. (1978). REM sleep and memory consolidation. *Biol Psychol Bull* 6, 293-300.

Townsend, P. (1997). use of in cage shelters by laboratory rats. *Anim Welf* 6, 95-103.

Tung, A., Takase, L., Fornal, C., Jacobs, B. (2005). Effects of sleep deprivation and recovery sleep upon cell proliferation in adult rat dentate gyrus. *Neuroscience* 134, 721-3.

Van de Weerd, H. A., Aarsen, E. L., Mulder, A., Kruitwagen, C. L., Hendriksen, C. F., Baumans, V. (2002). Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *J Appl Anim Welf Sci* 5, 87-109.

Van der Borght, K., Ferrari, F., Klauke, K., Roman, V., Havekes, R., Sgoifo, A., van der Zee, E. A., Meerlo, P. (2006). Hippocampal cell proliferation across the day: increase by running wheel activity, but no effect of sleep and wakefulness. *Behav Brain Res* 167, 36-41.

Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1, 191-8.

Vassalli, A., Dijk, D. J. (2009). Sleep function: current questions and new approaches. *Eur J Neurosci* 29, 1830-41.

Vivaldi, E. A. (1986). Automation of data acquisition and of experiment control: application to the study of sleep-wake cycles and behavioral paradigms. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 19, 347-57.

Vivaldi, E. A., Bassi, A. (2006). Frequency domain analysis of sleep EEG for visualization and automated state detection. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 3740-3.

Vivaldi, E. A., Bassi, A., Estrada, J., Garrido, I., Diaz, J., Ocampo-Garces, A. (2008). On-line analysis of biosignals for the automation of total and specific sleep deprivation in the rat. *Biol Res* 41, 439-52.

Vivaldi, E. A., Ocampo-Garces, A., Villegas, R. (2005). Short-term homeostasis of REM sleep throughout a 12:12 light:dark schedule in the rat. *Sleep* 28, 931-43.

Vivaldi, E. A., Ocampo, A., Wyneken, U., Roncagliolo, M., Zapata, A. M. (1994a). Short-term homeostasis of active sleep and the architecture of sleep in the rat. *J Neurophysiol* 72, 1745-55.

Vivaldi, E. A., Wyneken, U., Roncagliolo, M., Ocampo, A., Zapata, A. M. (1994b). Measures of location and dispersion of sleep state distributions within the circular frame of a 12:12 light: dark schedule in the rat. *Sleep* 17, 208-19.

Walsh, R. N., Budtz-Olsen, O. E., Penny, J. E., Cummins, R. A. (1969). The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 137, 361-366.

Walsh, R. N., Cummins, R. A. (1979). Changes in hippocampal neuronal nuclei in response to environmental stimulation. *Int J Neurosci* 9, 209-212.

Wiberg, G. S., Grice, H. C. (1963). Long-Term Isolation Stress in Rats. *Science* 142, 507.

Woodcock, E. A., Richardson, R. (2000). Effects of environmental enrichment on rate of contextual processing and discriminative ability in adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 73, 1-10.

Woodworth, C. H., Johnson, A. K. (1988). Isolation, tactile startle and resting blood pressure in Long-Evans rats. *Physiol Behav* 43, 609-16.

Yaroush, R., Sullivan, M. J., Ekstrand, B. R. (1971). Effect of sleep on memory. II. Differential effect of the first and second half of the night. *J Exp Psychol Bull* 88, 361-6.

Zepelin, H. (1989). Mammalian sleep. **In:** Kryger MH, Roth T, Dement WC, editors. Principles and practice of sleep medicine. Philadelphia:Saunders, p. 30–49.

Zimmerman, J. T., Stoyva, J. M., Reite, M. L. (1978). Spatially rearranged vision and REM sleep: a lack of effect. *Biol Psychiatry* 13, 301–16.

