



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA

ARQUITECTURA DEL SUEÑO TRAS EL MOLDEAMIENTO DE UNA CONDUCTA OPERANTE EN RATAS SACIADAS

Memoria para optar al título de Psicólogo

RICARDO PALMA FUENTES

PROFESOR PATROCINANTE:

ADRIÁN OCAMPO GARCÉS

PROFESORA GUÍA:

MARGARITA BÓRQUEZ QUINTAS

SANTIAGO DE CHILE

2017

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia, ya que sin su soporte afectivo y material no hubiera tenido la posibilidad de llevar a cabo mis estudios, ni hubiese tenido la determinación necesaria para mantenerme dando lo mejor de mi a pesar de todos los obstáculos que tuvimos que superar en este largo proceso.

A mi pareja, Tamara Nuñez, por convertirse en mi refugio ante las adversidades inesperadas, por confiar siempre en mis capacidades, por alentarme cuando decaigo, por cuidarme y amarme. Por permitirme ser su compañero durante estos años.

A Christian López, María Paz Contreras, Rodrigo Campos, Carolina Salazar, Rodrigo Beltrán, María Teresa Ferrari, Claudia Pizarro, Carlos Monsalve y Kelly Valencia, que no solo apoyaron con el cuidado y la mantención de los sujetos experimentales, sino que también amenizaron con su compañía las tardes de trabajo en el laboratorio.

A Juan Amaro, por las reiteradas ocasiones en que ayudó con la construcción de electrodos, la administración de los datos, los análisis estadísticos y la generación de gráficos. Por orientarme en temas en que me declaro inexperto, y por la buena compañía.

Y a Margarita Bórquez, por sus innumerables consejos y correcciones, por su excepcional trabajo como docente e investigadora, por su apoyo académico y humano, y por motivarnos con su ejemplo a ser mejores científicos y profesionales.

Dedicatoria

A mis padres, Ricardo Palma y Susana Fuentes, por su enorme paciencia, y por su entereza para soportar las dificultades que se nos presentaron.

Y a mi hermano, Eduardo, cuyo recuerdo me acompaña siempre.

Tabla de contenidos

Resumen	1
I. Introducción.....	2
II. Antecedentes Teóricos	3
a. Definición del sueño.....	3
b. Caracterización fisiológica del sueño.....	3
c. Arquitectura del sueño.....	4
d. Funciones del sueño: aprendizaje y memoria.....	5
e. Sueño de ondas lentas.....	6
f. Condicionamiento operante y sueño.....	6
g. Protocolos de alimentación y sueño.....	7
III. Pregunta de investigación.....	10
IV. Hipótesis.....	10
V. Objetivos.....	10
VI. Marco metodológico	11
a. Sujetos.....	11
b. Procedimiento.....	11
c. Aparatos.....	14
d. Implante de electrodos y adquisición de registros	14
e. Análisis estadístico.....	16
VII. Resultados	17
a. Aprendizaje.....	17
i. Tasa de respuesta promedio.....	17
ii. Perfil temporal de respuesta.....	19
b. Sueño.....	20
i. Tiempo total de sueño.....	20
ii. Demora en el inicio del sueño.....	26
iii. Fragmentación del sueño.....	27
iv. Poder espectral del sueño No-REM.....	33
VIII. Discusión	36
IX. Conclusiones.....	40
X. Referencias.....	41
XI. Anexos.....	45

ARQUITECTURA DEL SUEÑO TRAS EL MOLDEAMIENTO DE UNA CONDUCTA OPERANTE EN RATAS SACIADAS

RESUMEN

En investigaciones en que se reportan variaciones en la arquitectura del sueño tras la adquisición de una conducta operante, usualmente se trabaja con sujetos sometidos a restricción alimenticia. Sin embargo, los protocolos de restricción alimenticia también alteran la distribución normal del sueño, por lo que los resultados obtenidos en dichas investigaciones podrían estar siendo enmascarados por los efectos de la restricción de alimento. En esta investigación se compararon dos grupos: en uno los sujetos fueron sometidos a restricción alimenticia hasta que alcanzaran y mantuvieran el 80% de su peso de alimentación libre, mientras que los sujetos del otro grupo tuvieron acceso libre a comida durante la mayor parte del experimento. Los roedores fueron expuestos a una situación de aprendizaje apetitivo (reforzamiento positivo). Los objetivos de esta investigación fueron comparar el desempeño de ratas saciadas y en restricción de alimento durante el moldeamiento y la adquisición de una conducta operante, y determinar qué ocurre con el sueño REM y No-REM en las horas posteriores al moldeamiento de una conducta operante en ratas saciadas. Los resultados indican, en primer lugar, que en ambos grupos de ratas se logra el aprendizaje de la tarea de forma exitosa, sin presentarse diferencias significativas. En segundo lugar, se observa que las ratas saciadas pasan más tiempo en sueño REM y No-REM en las horas posteriores al moldeamiento en comparación con las ratas sometidas a restricción alimenticia. Esta diferencia de tiempo de sueño se presenta acompañada de una mayor fragmentación del sueño en las ratas restringidas de alimento. Por último, parece que la disminución del tiempo de sueño -y la fragmentación del mismo- en las ratas restringidas de alimento se compensa parcialmente con un aumento del poder espectral de la onda lenta en el sueño No-REM. En las investigaciones futuras que impliquen sueño y aprendizaje se debieran tener en cuenta tanto las alteraciones que sufren los sujetos restringidos de alimento en el sueño durante las horas posteriores al aprendizaje, como la posibilidad de trabajar con sujetos *ad libitum*.

Palabras Clave: Sueño, reforzamiento positivo, restricción alimenticia, ratas saciadas.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha realizado una gran cantidad de investigaciones sobre condicionamiento operante en roedores, en que se restringe la alimentación de los sujetos experimentales como parte del protocolo para motivarlos a realizar las conductas esperadas a cambio de la obtención de pellets que son usados como reforzadores (e.g. Jellison, 2003; Leenars et al., 2013). Los protocolos de restricción alimenticia normalmente implican mantener a los sujetos a un 10%, 15% o 20% por debajo de su peso de alimentación libre (e.g. Guegan et al., 2013; Franklin & Hall, 2011; Bórquez, 2016).

En investigaciones de aprendizaje y sueño, se ha observado que la exposición de los sujetos a distintas tareas que requieren que estos aprendan, altera la duración y la intensidad de los episodios de sueño posteriores, principalmente en las primeras horas de sueño tras el aprendizaje (Smith, Lowe & Smith, 1977; Leenaars et al. 2013).

Por otra parte, las investigaciones sobre sueño en que se evalúa el efecto de la privación total o la restricción parcial de alimento en los sujetos experimentales han demostrado que los protocolos restrictivos de alimentación alteran la arquitectura del sueño, observándose una relación directa entre el tiempo que los sujetos están bajo privación o restricción alimenticia y el tiempo que estos pasan despiertos (e.g. Borbély, 1976; Alvarenga, Andersen, Papale, Antunes & Tufik, 2005).

A pesar de lo comunes que son los protocolos de restricción alimenticia en las investigaciones de aprendizaje y sueño, son escasas las investigaciones en que se hayan evaluado los efectos de dichos protocolos sobre el sueño de los sujetos (Alvarenga et al., 2005), y hasta donde se sabe, no se han realizado comparaciones en el sueño de ratas expuestas a una tarea de condicionamiento operante con y sin restricción alimenticia.

En la presente investigación se intenta cubrir ese vacío, evaluando las diferencias que se observen en ratas con libre acceso a comida y ratas mantenidas al 80% de su peso de alimentación libre, tanto en el desempeño en el moldeamiento y la adquisición de una tarea sencilla de condicionamiento apetitivo, como en distintos parámetros del sueño posterior al aprendizaje de dicha tarea. La evidencia disponible permite sospechar que ambos grupos aprenderán la tarea (aunque probablemente con diferencias en el desempeño) y que se podrán observar diferencias en la duración o intensidad de los episodios de sueño posteriores al aprendizaje.

II. ANTECEDENTES TEÓRICOS

a. Definición del sueño

El sueño es un fenómeno universal entre los vertebrados. Prácticamente todos los mamíferos, aves y reptiles duermen, mientras que los peces y los anfibios entran en períodos de inactividad que podrían ser equivalentes al sueño (Fernández-Mendoza & Puhl, 2014). Este ha sido definido de distintas maneras por diferentes autores. Por ejemplo, Diekelmann & Born (2010) señalan que se trata de un *proceso* a nivel de sistemas que afecta al organismo completo. También se ha definido como una *conducta compleja* (Fernández-Mendoza & Puhl, 2014) regulada de forma homeostática (Dijk, 2009; Deboer, 2013) y circadiana (Dijk, 2009; Yoon & Shapiro, 2013), aunque más comúnmente se entiende como un *estado* de inmovilidad con escasa capacidad de respuesta a los estímulos (Siegel, 2005), o bien, como un *continuo de estados conductuales mixtos* con diferencias fisiológicas, químicas, y fenomenológicas (Datta, 2010).

Mientras que la vigilia se caracteriza como un estado cerebral de ocurrencia diaria en que un organismo individual se involucra en respuestas cognitivas y conductuales coherentes con el mundo externo (Deboer, 2013), las características más distintivas del sueño son la pérdida de la consciencia y del control conductual (Diekelmann & Born, 2010), la escasa reacción a los estímulos externos y la rápida reversibilidad que permite distinguir al sueño de otros estados de inactividad motora, como la hibernación, el estado de anestesia general, el estado de coma, y la muerte (Siegel, 2005; Deboer, 2013). Sin embargo, la observación del comportamiento no logra reportar la intensidad o profundidad del sueño, puesto que solo se pueden establecer umbrales de excitación. Esta limitación puede superarse mediante registros electroencefalográficos.

b. Caracterización electrofisiológica del sueño

Mediante la utilización combinada de distintas técnicas fisiológicas (a saber, Electroencefalograma -EEG-, Electromiograma -EMG, y Electrooculograma -EOG-) denominadas de forma conjunta Polisomnografía (PSG), se ha podido observar que durante el sueño se producen cambios fisiológicos que definen estados conductuales muy distintos (Bastien, 2011; Deboer, 2013; Fernández-Mendoza & Puhl, 2014). Los registros obtenidos mediante EEG corresponden a fluctuaciones de la actividad eléctrica del

cerebro, que típicamente varían entre los 0.1 y los 50 ciclos por segundo (Hz), con amplitudes que oscilan entre los 20 y los 300 microvoltios (μV) (Deboer, 2013).

En ratas y otros mamíferos, convencionalmente los estados conductuales se dividen en tres categorías: Vigilia, Sueño Sin Movimientos Oculares Rápidos (sueño No-REM, por sus siglas en inglés), y Sueño Con Movimientos Oculares Rápidos (sueño REM, por sus siglas en inglés) (Fernández-Mendoza & Puhl, 2014; Lesku et al., 2008; Ocampo-Garcés, Castro & Espinoza, 2012; Stephenson, Caron, Cassel & Kostela, 2009).

Estos tres estados son definidos por criterios electrofisiológicos: La vigilia se caracteriza por una actividad electroencefalográfica de baja amplitud (desincronizada) y alta frecuencia, presencia de ondas Alfa (8-12 Hz) y Beta (13-30 Hz) y una actividad electromiográfica de amplitud alta y variable; el sueño No-REM se caracteriza por una actividad EEG de amplitud relativamente alta (sincronizada) y de baja frecuencia, presencia de ondas Delta (0.5-4 Hz) junto con actividad EMG de baja frecuencia y amplitud; finalmente, el sueño REM se caracteriza por actividad EEG de baja amplitud (similar a lo que se observa en vigilia), con un patrón regular de ondas de alta frecuencia, una muy baja actividad EMG (atonía muscular) interrumpida por breves intervalos de actividad fásica (similares a sacudidas) y salvas de movimientos oculares rápidos en el EOG (Deboer, 2013; Fernández-Mendoza & Puhl, 2014; Stephenson et al., 2009).

c. Arquitectura del sueño

El porcentaje de tiempo que los sujetos pasan en las diferentes etapas del sueño (vigilia, sueño No-REM, sueño REM), los cambios de estado, la cantidad y la duración de los ciclos -así como su distribución-, se conocen en conjunto como *arquitectura del sueño* (Bastien, 2011), concepto que también se ha usado para referirse a la organización estructural básica del sueño normal (Colten & Altevogt, 2006). En humanos, los estados de sueño No-REM y REM se alternan durante los cuatro a seis ciclos de sueño que ocurren cada noche (Datta, 2010), caracterizándose la primera mitad de la noche por una gran cantidad de sueño No-REM, mientras que el sueño REM prevalece más durante la segunda mitad de la noche (Diekelmann & Born, 2010).

Los modelos animales más comunes para la investigación en sueño incluyen ratones, ratas y gatos; en estos animales, los ciclos de sueño No-REM y REM son mucho más cortos que en humanos y otros primates (Datta, 2010). En roedores, los períodos de sueño No-REM y REM se alternan en ciclos de unos 90 minutos, que durante el sueño

temprano están dominados principalmente por el sueño No-REM, con poca presencia de sueño REM, observándose el patrón opuesto durante el sueño tardío (Inostroza & Born, 2013). Estas épocas cíclicas de sueño No-REM y REM en roedores, continúan durante el día y la noche, excepto cuando el animal está involucrado en actividades que requieran vigilia (Datta, 2010).

d. Funciones del sueño: aprendizaje y memoria

Se han propuesto distintas hipótesis acerca de las funciones que cumple el sueño en los organismos, como la conservación energética, la termorregulación cerebral, la desintoxicación del cerebro, o la restauración de los tejidos, entre otras. Pero además destaca la hipótesis que propone que los períodos de sueño favorecen el aprendizaje y la memoria (Maquet, 2001), hipótesis que se sustenta en una gran cantidad de evidencia (para revisiones detalladas sobre este tema, ver Smith, 1984; Guzmán, 1995; Maquet, 2001; Datta, 2010; Diekelmann & Born, 2010).

El aprendizaje y la memoria son procesos codependientes que forman parte de un mecanismo fundamental para la adaptación y la sobrevivencia de cualquier organismo en continua relación con su entorno (Bórquez, 2016), ya que respectivamente permiten extraer información potencialmente útil de la experiencia y mantener en el tiempo esta información de una forma accesible a la recuperación (Gallistel & Matzel, 2013).

Por lo general se ha estudiado la relación entre sueño y aprendizaje siguiendo dos estrategias: realizando registros PSG antes y después de entrenar a los sujetos en una tarea para ver qué etapas del sueño y qué parámetros muestran modificaciones post-aprendizaje, o entrenando a los sujetos en alguna tarea y luego privándolos de ciertas etapas del sueño, para evaluar el efecto de dicha privación sobre la memoria subsiguiente (Smith, 1984; Guzmán, 1995). La evidencia sugiere que las diferentes etapas del sueño influyen las distintas etapas del desarrollo de la memoria (Datta, 2010).

En particular, el sueño No-REM ha sido de gran interés, ya que además de ser considerado como la etapa más restaurativa y estar asociado con la calidad y la mantención del sueño (Dijk, 2009), sufre alteraciones por el tiempo que el organismo pasa en vigilia, así como cambios en su duración e intensidad relacionados principalmente con el aprendizaje y la memoria (Bórquez, 2016). Las variaciones en el Sueño No-REM se pueden cuantificar mediante métodos automatizados de análisis de señales, como el análisis espectral u otros (Dijk, 2009).

e. Sueño de ondas lentas

Las ondas cerebrales registradas mediante EEG tienen diferentes frecuencias y amplitudes. Usualmente, mientras más lenta es una onda cerebral, más alta es su amplitud. La amplitud de las ondas se usa para calcular el *poder del EEG*: poderes elevados en bandas de frecuencia rápida reflejan un aumento de la activación cortical, un aumento del poder en bandas más lentas supone una disminución de la activación cortical (Bastien, 2011). Las ondas lentas se muestran como un aumento de la actividad en la banda delta (< 4 Hz) (Deboer, 2013), principalmente durante el sueño No-REM.

Se ha observado que existe una correlación directa entre la prominencia de las ondas lentas en el EEG del sueño No-REM y la profundidad del sueño (medida por la duración y la intensidad de un sonido necesario para despertar a un sujeto). En todos los mamíferos con períodos identificables de sueño y vigilia (ya sea diurno o nocturno), las ondas lentas son prominentes al principio del período principal del sueño y la actividad de onda lenta (SWA) disminuye gradualmente a medida que el sueño progresa. Además, la SWA en el sueño No-REM aumenta luego de una privación de sueño. Los mamíferos parecen compensar la pérdida del sueño mediante dos estrategias diferentes: aumento del tiempo en sueño No-REM, o aumento de la SWA en el sueño No-REM (Deboer, 2013). Como ya se ha mencionado, el sueño No-REM también sufre alteraciones relacionadas con el aprendizaje, y una de las formas de aprendizaje que ha sido más ampliamente investigada corresponde al condicionamiento operante.

f. Condicionamiento operante y sueño

El condicionamiento operante es una forma de aprendizaje asociativo en que los organismos ajustan las conductas que emiten en función de sus consecuencias (Remmelink et al., 2015). Estas conductas, llamadas *operantes*, pueden asociarse con ciertos estímulos de manera que si la emisión de una conducta operante es seguida por la presentación de un estímulo reforzante (placentero), aumentará la frecuencia de emisión de esta conducta (Skinner, 1938).

Un paradigma clásico para estudiar el condicionamiento operante en ratas es exponerlas a una asociación simple entre una conducta y un resultado: la presión de una palanca será seguida por la entrega de comida altamente deseable (Leenaars et al., 2013). El procedimiento descrito corresponde a una forma de condicionamiento operante conocida como *condicionamiento apetitivo* (Remmelink et al., 2015).

Se ha reportado que la exposición a una situación en que se aprenda una conducta operante altera tanto el sueño No-REM como el sueño REM. En las primeras investigaciones sobre sueño y aprendizaje se le dio una gran importancia al sueño REM, debido al aumento del tiempo que los sujetos pasan en esta etapa del sueño tras una sesión de condicionamiento operante. Sin embargo, se descubrió que el tiempo en sueño No-REM sufre un aumento similar en relación a su línea base, por lo que se sugiere que también podría estar involucrado en el aprendizaje (Smith, Lowe & Smith, 1977).

Recientemente, en una investigación en que los sujetos eran expuestos a dos sesiones diarias de adquisición de una conducta operante, se descubrió que tras una sesión de condicionamiento operante efectivamente se producía un aumento del tiempo que los sujetos dormían, pero este aumento era específico a las dos horas posteriores a la primera sesión de adquisición, ya que tras la segunda sesión de adquisición el patrón de sueño de los sujetos era similar al observado en línea base (Leenaars et al., 2013).

En el contexto del condicionamiento operante, una rata no siempre responde de la misma manera ante la comida que se le presenta como reforzador, ya que la probabilidad de emisión de las conductas se ve afectada por diferentes factores, como la forma y la composición de la comida, o el acceso que el sujeto haya tenido previamente a la comida (Skinner, 1938), por lo que en condiciones experimentales se suele someter a los sujetos a protocolos de restricción parcial o privación total de alimento (Alvarenga et al., 2005; Borbély, 1976) para motivar a los roedores a trabajar.

g. Protocolos de alimentación y sueño

Para facilitar el condicionamiento apetitivo y motivar a los sujetos experimentales a trabajar por comida, estos comúnmente son sometidos a protocolos de restricción alimenticia. Estos procedimientos pueden afectar las respuestas conductuales de los sujetos, ya que son percibidos por estos como un factor estresante (por alteraciones hormonales), y podrían alterar los resultados de las tareas y los patrones de actividad circadiana en los roedores (Remmelink et al., 2015). Se ha reportado que los animales sometidos a restricción alimenticia sufren alteraciones del ciclo de sueño-vigilia, pero este es un tema que ha sido escasamente investigado (Alvarenga et al., 2005).

i. Privación total del alimento

Los principales hallazgos sobre las alteraciones que la privación total de alimento produce sobre el sueño son: aumento del tiempo en vigilia a medida que los sujetos pasan más tiempo sin comer -investigación realizada con registros de tres horas diarias- (Jacobs & McGinty, 1971), desaparición de los episodios nocturnos de sueño REM y normalización de la arquitectura del sueño tras la restitución del alimento (Borbély, 1976).

En otras investigaciones (Dewasmes, Duchamp & Minaires, 1989), usando registros de 24 horas, se reporta que la disminución del tiempo de sueño de las ratas solo es evidente tras dos semanas de privación total de alimento, sobre todo en la fase diurna. Danguir & Nicolaidis (1979) proponen que las alteraciones del sueño dependen del grado de disponibilidad de sustancias metabolizables a nivel celular, ya que la privación total de alimento altera de forma más marcada el sueño de las ratas delgadas (240-250g) que el de las ratas normales (300-380g) y obesas (450-470g).

Además, en los sujetos sometidos a privación total de alimento se observa un patrón fragmentado de actividad motora, con frecuentes apariciones de episodios de vigilia (Borbély, 1979), y un aumento de la conducta de correr espontáneamente, lo que podría interpretarse como una conducta de búsqueda de alimento (Dewasmes, Duchamp & Minaires, 1989). Se menciona que en ambientes naturales la disminución de las reservas energéticas tiende a favorecer la vigilia y la actividad en vez del sueño, lo que aumenta las probabilidades de explorar y encontrar fuentes de comida (Danguir & Nicolaidis, 1979), y los breves lapsos de actividad motora podrían servir para aumentar la probabilidad de encontrar comida con un gasto energético mínimo (Borbély, 1976).

Investigaciones más recientes (Corwin et al., 1998; Corwin, 2004) evidencian que la privación total y prolongada de alimento es innecesaria para aumentar la probabilidad de emisión de la conducta de ingesta, ya que basta con restringir el acceso a una comida diferente de la de mantención para que las ratas coman más durante un breve período.

ii. Restricción parcial del alimento

Se ha reportado que las ratas sometidas a restricción parcial de alimento (con acceso a comida solo durante algunas horas de la fase luminosa del día), muestran una mayor actividad motora que las ratas control (que se mantienen somnolientas) al ser alimentadas, se muestran más reactivas ante cualquier estímulo, y se vuelven más

diurnas. Incluso después de tres días de dar libre acceso a comida a las ratas previamente restringidas se podían observar estas variaciones (Alvarenga et al., 2005).

Roky et al. (1999) también reportan los efectos de la restricción de comida (y agua) en ratas. En su investigación, tras un período en que las ratas estuvieron ad libitum, uno de sus grupos tuvo acceso libre a comida y agua solo durante el día (de 9:00 a 21:00 horas, durante cuatro semanas), para luego volver a tener libre acceso a comida y agua durante todo el día (en un período de tres semanas). Reportan que, aunque el tiempo total de sueño no varió en todo el experimento, sí cambió su distribución, aumentando ambos tipos de sueño durante el período de oscuridad, y disminuyendo durante la fase de luz. Es decir, las ratas se volvieron más diurnas. Y nuevamente, los cambios en el sueño REM fueron más notorios que los del sueño No-REM.

iii. Aprendizaje sin restricción del alimento

Se han realizado algunas investigaciones excepcionales sobre aprendizaje asociativo sin privar de alimento a los sujetos experimentales (e.g. Corwin et al., 1998; Ghiglieri et al., 1997; Reppucci & Petrovich, 2012; Todd et al., 2012; Rummel et al., 2015). Para motivar a los sujetos saciados, se han usado comidas altas en grasas (e.g. Corwin et al., 1998; Todd et al., 2012) o pellets sabrosos -con sabor a tocino, uva o chocolate- como reforzadores (Guegan et al., 2013; Jellison, 2003). En investigaciones de este tipo, se ha reportado que las ratas aprendieron a presionar palanca por comida, aunque la tasa de respuesta era aproximadamente la mitad de la que típicamente alcanzan las ratas privadas de alimento (e.g. Todd et al., 2012).

Lo más frecuente, sin embargo, es que se restrinja la alimentación de los sujetos hasta que mantengan a un 80-90% de su peso de alimentación libre. A pesar de lo común que es la restricción del alimento en las investigaciones de este tipo, se ha investigado poco sobre sus efectos sobre el sueño, y se desconoce qué efecto tienen los protocolos de restricción alimenticia comúnmente usados en investigaciones de sueño y aprendizaje.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Considerando los antecedentes presentados, se sabe que la exposición a una tarea de condicionamiento operante altera el tiempo que los sujetos pasan en ambos tipos de sueño. Sin embargo, en las investigaciones en que se evalúa el efecto del aprendizaje sobre el sueño se ha trabajado con ratas sometidas a restricción alimenticia. Dado que los protocolos de restricción alimenticia alteran el sueño, los efectos de la restricción podrían estar enmascarando los efectos del aprendizaje sobre el sueño.

Hasta donde se sabe, no se han hecho experimentos en los que se evalúe el efecto del aprendizaje de una conducta operante sobre el sueño en sujetos con libre acceso a comida y agua, y se desconoce qué efecto tiene el aprendizaje sobre el sueño sin la interferencia de la restricción alimenticia.

Por las consecuencias metodológicas que implica, parece pertinente preguntarse: ¿Qué diferencias se observan entre las ratas con restricción alimenticia y las ratas saciadas, en el sueño REM y No-REM tras el moldeamiento de una conducta operante?

IV. HIPÓTESIS

La hipótesis de esta investigación es que en ambos grupos se podrá evidenciar aprendizaje al comparar el desempeño de las ratas durante el moldeamiento y la adquisición (independiente del protocolo de alimentación), y que tras el moldeamiento las ratas saciadas pasarán más tiempo que las ratas restringidas en sueño REM y No-REM.

V. OBJETIVOS

Los objetivos de esta investigación son tres:

1. Comparar el desempeño de las ratas en restricción alimenticia y las ratas saciadas durante el moldeamiento y la adquisición de una conducta operante.
2. Determinar qué ocurre con la duración y la fragmentación del sueño REM y No-REM posterior al moldeamiento de una conducta operante en ratas saciadas.
3. Comparar el poder espectral de la onda delta en el sueño No-REM tras el moldeamiento de una conducta operante, entre ratas restringidas y ratas saciadas.

VI. MARCO METODOLÓGICO

a. Sujetos

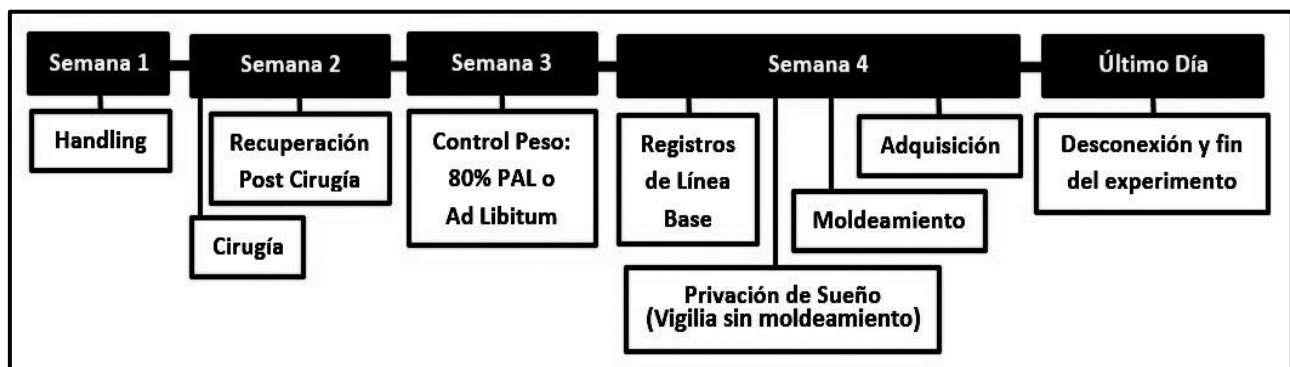
Se trabajó con 20 ratas Sprague-Dawley macho jóvenes, de al menos 300 gramos. Los sujetos fueron obtenidos de la colonia de crías del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Durante todo el experimento tuvieron libre acceso al agua. Las ratas fueron mantenidas individualmente en sus cajas hogar con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (el encendido de luces se producía a las 7 a.m.). Los procedimientos se llevaron a cabo durante la primera mitad de la fase descanso de las ratas (entre las 08:00 y las 14:00 horas). Todos los sujetos fueron mantenidos bajo condiciones estables de temperatura (21 ± 2 °C). Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos, diferenciados sólo por el acceso a comida que tuvieron durante el experimento:

1.- **Grupo Restringido** (n=10): Sometidos a un protocolo de restricción alimenticia desde el fin de la recuperación post quirúrgica hasta que alcanzaran y mantuvieran el 80% del peso de alimentación libre (*PAL*, equivalente al peso del último día antes de iniciar la restricción alimenticia), que mantendrían hasta el final del experimento.

2.- **Grupo Saciado** (n=10): Con libre acceso a comida (*Ad Libitum*) durante la mayor parte del experimento. Solo se les privó totalmente de comida durante el día previo al moldeamiento, para motivarlos a presionar palanca; y entre el día del moldeamiento y el de la adquisición sólo tuvieron acceso a los pellets reforzadores que obtuvieron en la caja experimental. Tres horas después de la adquisición vuelven a tener libre acceso a comida.

b. Procedimiento

El protocolo experimental general se resume en el siguiente esquema:



El procedimiento realizado durante el experimento se describe semana a semana:

Semana 1:

- Manipulación (*Handling*) durante 7 días, o hasta que los sujetos alcanzaran los 300 gramos de masa.

Semana 2:

- Cirugía de inserción crónica de electrodos para registros polisomnográficos.
- Recuperación post operatoria con acceso libre a comida y agua durante 7 días.

Semana 3:

- Asignación de los sujetos a los grupos, y control del peso: Los sujetos asignados al grupo Saciado tuvieron acceso libre a comida (*ad libitum*, equivalente a unos 35 gr. diarios de comida) durante 7 días, mientras que los sujetos asignados al grupo Restringido recibieron una porción de comida de cerca de un tercio de la que recibían habitualmente (esto es, unos 12 gr. diarios de comida), durante los días que fueran necesarios para alcanzar y mantener el 80% del peso de alimentación libre. En promedio, se necesitaron unos 19 días de restricción alimenticia ($prom=19,4$, $ds=9,0$) desde la asignación de los sujetos al grupo Restringido hasta la primera conexión al polisomnógrafo. La restricción alimenticia en este grupo se mantuvo hasta el final del experimento.

Semana 4:

- Conexión al polisomnógrafo (4 días): Ambientación a la caja de registros durante los 2 primeros días, y registros de línea base durante los 2 días siguientes.
- 1ª Desconexión y privación de sueño (vigilia sin moldeamiento): Se desconectó a los sujetos y se los mantuvo despiertos en su caja hogar durante 90 minutos mediante movimientos suaves, con el propósito de descartar que los cambios en el sueño de las ratas se debieran al simple hecho de permanecer despiertas durante las horas en que se trabajó con ellas. Al terminar la privación de sueño (vigilia sin moldeamiento) los sujetos son reconectados a la caja de registro. Durante las 3 horas posteriores a la reconexión no tienen acceso a comida, para evitar que se

mantengan despiertas solo por comer. Además, el grupo Saciado queda sin comida durante el resto del día, para facilitar el moldeamiento del día siguiente.

- 2ª Desconexión y moldeamiento de la conducta operante: La sesión de moldeamiento comienza exponiendo a las ratas a la caja experimental (sin palanca) y a los reforzadores a utilizar, hasta que encuentran y comen 3 pellets ubicados en el comedero. Se las retira de la caja experimental durante cinco minutos y se las vuelve a poner en ella, reforzando las aproximaciones sucesivas hacia el comedero. En un principio la palanca está ausente, y al comprobar que las ratas se acercan al comedero al escuchar el sonido del motor del alimentador (*feeder*), se incorpora la palanca en la caja y se empieza a reforzar las aproximaciones a la palanca y las presiones de la misma, entregándose un pellet por cada presión de palanca (programa de Reforzamiento Continuo) hasta que los sujetos la hayan presionado 60 veces, o hasta que pasen 5 minutos sin acercarse al comedero. Al terminar el moldeamiento los sujetos son reconectados a la caja de registros; el grupo Restringido queda sin comida durante las 3 horas posteriores a la reconexión, y el grupo Saciado queda sin comida durante el resto del día, para facilitar la adquisición del día siguiente. Sin embargo, los pellets de entrenamiento que las ratas del grupo Saciado obtuvieron durante el moldeamiento ($prom= 57,3$, $ds=15,07$) constituyen un aporte energético similar al que obtendrían de la comida de mantención diaria.
- 3ª Desconexión y adquisición de la conducta operante: Los sujetos son puestos en la caja experimental con la palanca incorporada desde el principio. Por cada presión de palanca los sujetos obtienen un pellet. Los sujetos son retirados al presionar la palanca 140 veces o al dejar de presionar la palanca por 5 minutos o más. Al terminar la adquisición los sujetos son reconectados a la caja de registros, y durante las 3 horas posteriores a la reconexión no tienen acceso a comida.

Último día:

- Un día después de la adquisición se desconecta definitivamente a los sujetos de la caja de registros y se da por terminado el experimento.

c. Aparatos

Las ratas fueron mantenidas en cajas hogar individuales de plástico translúcido durante las tres primeras semanas del experimento. Para realizar el condicionamiento se utilizó una caja experimental, cuyas dimensiones son idénticas a la utilizada por Bórquez (2016). La caja fue limpiada con una solución acuosa de alcohol (al 7%) después de trabajar con cada rata.

Como alimento de mantención se usaron pellets comunes *LabDiet 5P00*, *Prolab RMH3000*. Como reforzadores se usaron pellets palatables con sabor a chocolate *TestDiet 45mg Tablet – Chocolate*, que fueron entregados mediante un dispensador de comida que se encontraba fuera de la caja operante y conectado mediante un tubo flexible con el comedero descrito.

Para realizar los registros de sueño se utilizó una cámara de aislamiento lumínico y sonoro de 65 x 60 x 70 cms. para registros polisomnográficos, en cuyo interior había un cable flexible de unos 40 cm. que colgaba de un conmutador, sostenido mediante un sistema de contrabalanceo para facilitar el movimiento libre del animal (PlasticsOne ®. Medical Design and Manufacture). Dicho cable permitía conectar el implante de electrodos en la cabeza de las ratas a un computador que contaba con el software que permitía ver en directo, registrar y procesar las señales electrofisiológicas.

d. Implante de electrodos y adquisición de registros

La cirugía de implante de electrodos se realizó siguiendo procedimientos similares a los descritos en Oliveira & Dimitrov (2008). Bajo anestesia profunda y utilizando un instrumento estereotáxico se implantaron 8 electrodos de acero inoxidable recubiertos por teflón para registro cortical (3), ocular (2), y de musculatura nugal (3), y 2 electrodos de tungsteno para el registro de musculatura motora de vibrisas (PlasticsOne ®. *Medical Design and Manufacture*). El protocolo quirúrgico es idéntico al usado por Bórquez (2016). Para detalles sobre los protocolos anestésicos, antibióticos, y de manejo inflamatorio ver Anexo 1. Para detalles sobre el esquema de ubicación de los electrodos para registro polisomnográfico ver Anexo 2.

Luego de una semana de recuperación tras la cirugía, cada animal fue instalado en una cámara de aislamiento lumínico y sonoro, y conectado mediante un cable flexible de unos 40 cm. a un conmutador, que a su vez estaba conectado al sistema computacional que permitía registrar y almacenar las señales electrofisiológicas. Estas se

muestrearon a 250 Hz y fueron adquiridas por medio de un amplificador (Grass Modelo 15lt, Astromed, Inc., West Warwick, RI) después del filtrado analógico y acondicionamiento de señales (filtro de corte a 50 Hz).

Los sujetos estuvieron conectados al polisomnógrafo de forma continua durante toda la cuarta semana del experimento. Los registros solo fueron interrumpidos, en lapsos de hasta noventa minutos, por la desconexión de los sujetos para realizar la privación de sueño (vigilia sin moldeamiento), el moldeamiento y la adquisición. Luego de cada fase experimental los sujetos fueron devueltos a la caja de registros polisomnográficos, sin acceso a comida al menos durante las tres horas posteriores a la reconexión, con el fin de evitar que se mantuvieran despiertos por comer durante este período.

Para llevar a cabo los registros conductuales durante el condicionamiento de los sujetos se utilizó el software ABET II, que además permite controlar la caja operante. Los registros conductuales usados fueron: cantidad de presiones de palanca, y tiempo en que ocurrieron dichas presiones (expresado en minutos, a partir del momento en que la rata entra en la caja operante). Para comparar el desempeño de los grupos en el moldeamiento y la adquisición, se estableció un promedio de la tasa total de respuesta de los sujetos, y se organizaron las respuestas acumuladas en bloques de cinco minutos.

Para realizar los registros electrofisiológicos se utilizó el software IGOR PRO V6.3. Mediante este programa es posible registrar, supervisar on line y posteriormente procesar off line las señales producidas por la actividad cortical y muscular de las ratas. Los filtros de paso de banda analógicos utilizados son similares a los descritos por Castro-Faúndez, Díaz & Ocampo-Garcés (2016). El paso de banda para el canal de EEG (corteza cerebral) fue de 0.3-30 Hz, y se amplificó por un factor de 2000-5000. El paso de banda para los canales de EMG (nuca) y EMGW (vibrisas) fue de 30-100 Hz, y se amplificó por un factor de 5000-20000. El paso de banda para el canal de EOG (ojo) fue de 1-100 Hz, y se amplificó por un factor de 2000-20000. Cada día de registro polisomnográfico se resumió en una matriz de estado por época que contenía 5760 asignaciones, de las cuales se consideraron las 720 que corresponden a los intervalos de interés, es decir, las 3 horas de registro posteriores al moldeamiento, las tres horas posteriores a la privación de sueño (vigilia sin moldeamiento), y un período equivalente en el día de línea base.

Los registros electrofisiológicos fueron clasificados manualmente por estado. La clasificación utilizada fue similar a la descrita por Castro-Faúndez et al. (2016). Las épocas sucesivas de 15 segundos fueron asignadas visualmente a los estados de Vigilia

(Wake), Sueño Sin Movimientos Oculares Rápidos (sueño No-REM), o Sueño Con Movimientos Oculares Rápidos (sueño REM), mediante un análisis off-line manual. Cada época fue asignada al estado que ocupara más de la mitad del tiempo de dicha época (es decir, al menos 8 segundos). Brevemente, se identificó a la vigilia por la presencia de un EEG desincronizado y actividad fásica tanto en EMG como en EMGW y EOG. El sueño No-REM correspondía a las épocas con actividad de ondas lentas -delta- (1-4 Hz) de alta amplitud en el EEG acompañada por husos de sueño (10-15 Hz), y bajo tono muscular en EMG. Finalmente, el sueño REM fue identificado por la presencia de actividad theta (6-9 Hz) regular y sostenida, acompañada por atonía muscular en EMG, con actividad esporádica en EOG.

Tras la clasificación manual de los registros, estos fueron filtrados digitalmente mediante un Filtro de Butterworth de orden 4 en las bandas Delta (0.5-4 Hz), luego se calcularon la media cuadrática (RMS), el promedio y la desviación estándar de dichos valores para obtener el poder espectral de la banda Delta del sueño No-REM, y por último se estandarizó en referencia a línea base, con el fin de hacer comparable el poder espectral entre diferentes sujetos experimentales. Los datos fisiológicos que finalmente se analizaron fueron: Tiempo total en cada estado de sueño, cantidad y duración de los episodios de cada estado, y poder espectral de la banda Delta del sueño No-REM.

e. Análisis estadístico

Tanto para la administración y el procesamiento de los datos, como para el análisis estadístico y la generación de los gráficos necesarios, se utilizaron los softwares Microsoft Excel 2010 e IBM SPSS Statistics 20. En todos los procedimientos realizados se consideró como estadísticamente significativo a un p valor menor a 0,05. Todos los datos fueron expresados en función de su media \pm una Desviación Estándar (SD).

Para las comparaciones inter grupales (evaluación de las diferencias entre los grupos Saciado y Restringido en un mismo momento) se realizaron Pruebas T para muestras independientes, mientras que para las comparaciones intra grupales (el mismo grupo en los distintos momentos de registro) se realizaron Pruebas T para muestras relacionadas. Para comparaciones inter e intra grupales simultáneas se utilizó un ANOVA factorial de diseño mixto para el factor inter-sujetos *grupo* (Saciado-Restringido) y el factor intra-sujetos *momento* (Línea Base, Privación Sueño, Moldeamiento) en los distintos niveles o *estados* (Vigilia, NREM, REM).

VII. RESULTADOS

a. Aprendizaje

i. Tasa de respuesta promedio

El desempeño de los grupos Saciado y Restringido no difiere significativamente ni durante el moldeamiento ni durante la adquisición. Sin embargo, en ambos grupos se observaron diferencias significativas en la tasa de respuesta (palancas por minuto) promedio entre ambos momentos, lo que indica que ambos grupos aprendieron exitosamente la tarea de condicionamiento apetitivo (ver Figura 1).

La tasa de respuesta promedio durante el moldeamiento en el grupo Saciado fue de 1,133 palancas por minuto ($SD=0,748$), mientras que para el grupo Restringido fue de 0,992 palancas por minuto ($SD=0,637$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la tasa de respuesta promedio durante el moldeamiento, al aplicar una prueba T para muestras independientes ($p=0,656$).

La tasa de respuesta promedio durante la adquisición en el grupo Saciado fue de 3,587 palancas por minuto ($SD=2,503$), mientras que para el grupo Restringido fue de 5,726 palancas por minuto ($SD=2,996$). Al aplicar una prueba T para muestras independientes no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la tasa de respuesta promedio durante la adquisición ($p=0,100$).

En ambos grupos se produjo un aumento significativo de la tasa de respuesta entre el moldeamiento y la adquisición: Al aplicar una prueba T para muestras relacionadas se observa que la tasa de respuesta promedio en el grupo Saciado difiere significativamente entre el moldeamiento y la adquisición ($p=0,013$). Ocurre lo mismo en el grupo Restringido ($p=0,001$).

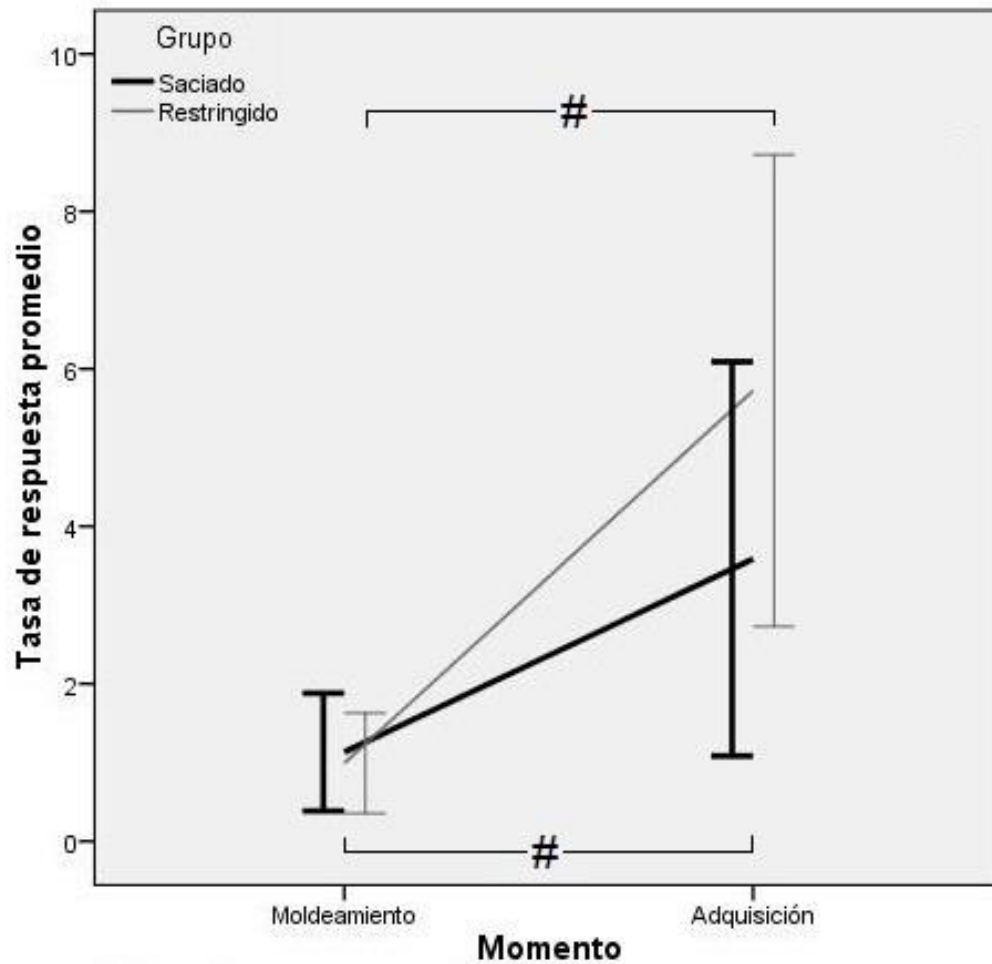


Figura 1. El gráfico muestra la tasa de respuesta promedio de los grupos Saciado y Restringido durante el moldeamiento y la adquisición de la conducta operante. No hay diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, se observan diferencias significativas al comparar la tasa de respuesta promedio entre los dos momentos ($\#p < 0,05$), tanto en el grupo Saciado como en el Restringido. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

ii. Perfil temporal de respuesta

Al comparar el perfil temporal de respuestas mediante pruebas T para muestras independientes, puede observarse que en general la cantidad de palancas acumuladas por bloques de cinco minutos no difiere significativamente entre los grupos ($p>0,05$), ni durante el moldeamiento ni durante la adquisición de la conducta operante. Las únicas excepciones ocurren durante la adquisición, en los bloques de 5-9,99 minutos ($p=0,039$) y 10-14,99 minutos ($p=0,034$), en que las respuestas acumuladas del grupo Restringido son significativamente mayores (ver Figura 2).

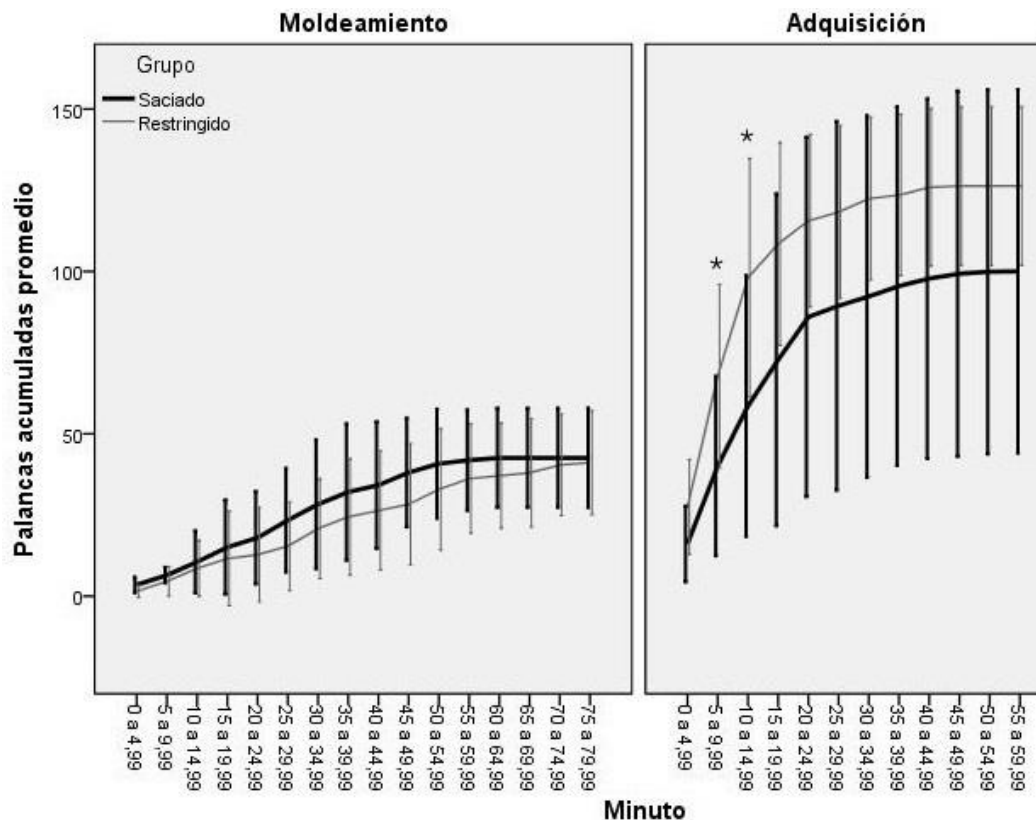


Figura 2. El gráfico muestra la cantidad de presiones de palancas acumuladas por bloques de cinco minutos, para los grupos Saciado y Restringido durante el moldeamiento y la adquisición de la conducta operante. En general no hay diferencias significativas ($p>0,05$) en el desempeño entre ambos grupos, salvo en un par de excepciones ($*p<0,05$). Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

b. Sueño

i. Tiempo total de sueño

- Vigilia

El tiempo que los sujetos de ambos grupos pasan en vigilia difiere de forma significativa en los tres momentos de registro, siendo en todos los casos el grupo Restringido el que pasa más tiempo despierto. Al comparar el tiempo en vigilia entre los distintos momentos, se observa que en ambos grupos hay diferencias significativas entre la línea base y el moldeamiento, solo en el grupo Restringido hay diferencias significativas entre la línea base y la privación de sueño, y en ninguno de los grupos se observan diferencias significativas entre la privación de sueño y el moldeamiento (ver Figura 3).

El promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron despiertos durante los registros de línea base fue de 48,587 minutos ($SD=16,755$), mientras que para el grupo Restringido fue 96,755 minutos ($SD=10,987$). El promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron despiertos tras la privación de sueño fue de 41,35 minutos ($SD=26,759$), mientras que para el grupo Restringido fue 120,9 minutos ($SD=50,808$). Y el promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron despiertos tras el moldeamiento fue de 64,4 minutos ($SD=20,577$), mientras que para el grupo Restringido fue 141,825 minutos ($SD=23,344$).

Al analizar el tiempo de vigilia en los distintos momentos de registro para ambos grupos, mediante ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor (ANOVA factorial mixto), se observa el efecto del factor intra-sujetos *momento* es significativo ($F=17,861$, $p=0,000$), el efecto del factor inter-sujetos *grupo* también es significativo ($F=69,586$, $p=0,000$), al igual que el efecto de interacción entre ambos factores ($F=6,555$, $p=0,010$). En los tres momentos de registro se observan diferencias significativas entre los grupos en el tiempo total de vigilia ($p=0,000$). Al comparar el tiempo que los sujetos pasan despiertos en los distintos momentos de registro mediante pruebas T para muestras relacionadas, el grupo Saciado solo muestra diferencias significativas entre la línea base y el moldeamiento ($p=0,021$), mientras que en el grupo Restringido se observan diferencias significativas tanto entre la línea base y la privación de sueño ($p=0,003$) como entre la línea base y el moldeamiento ($p=0,000$). El tiempo en vigilia no difiere de forma significativa ($p>0,05$) entre línea base y privación de sueño en el grupo saciado, ni entre privación de sueño y moldeamiento en ambos grupos.

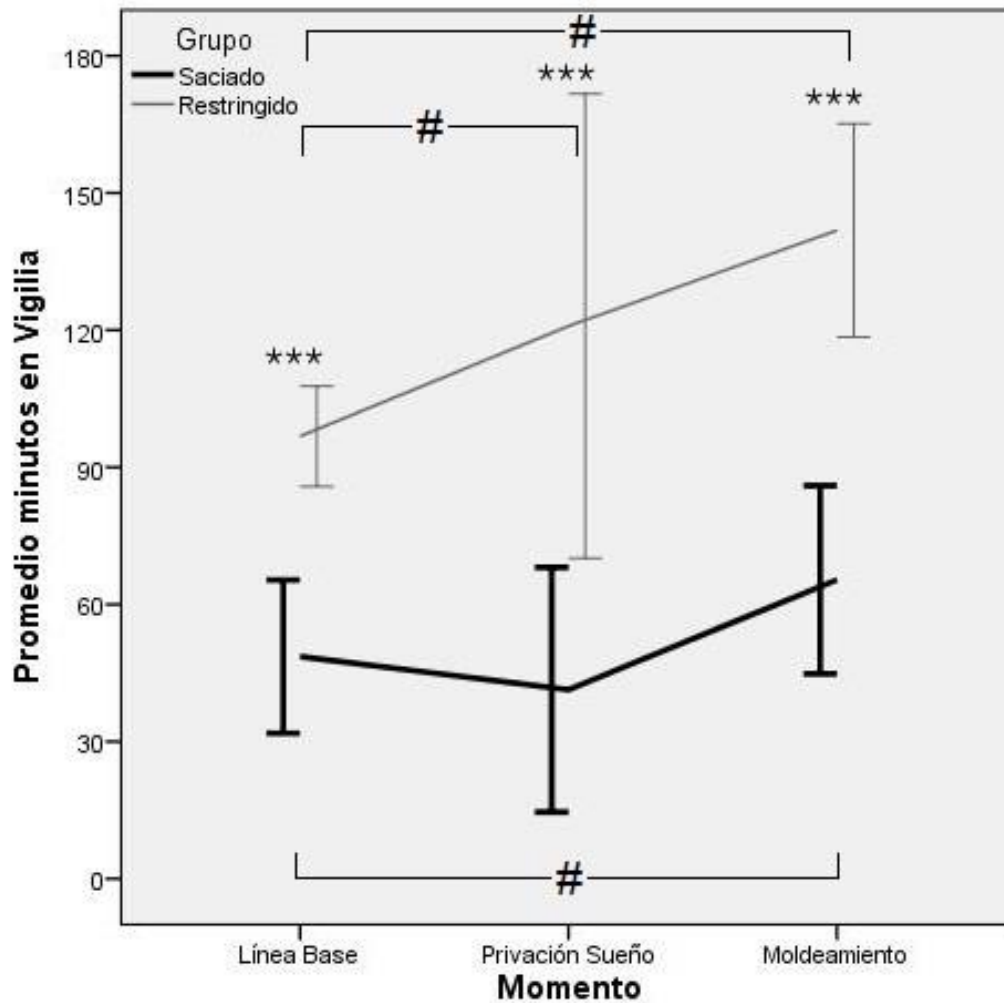


Figura 3. El gráfico muestra el promedio de tiempo (en minutos) que los sujetos de los grupos Satiado y Restringido pasaron despiertos en los distintos momentos de registro. Se observan diferencias significativas entre los grupos en los tres momentos ($***p < 0,001$). Las comparaciones intragrupalas muestran que en ambos grupos hay diferencias significativas ($\#p < 0,05$) entre la línea base y el moldeamiento, y que solo en el grupo Restringido se observan diferencias significativas entre la línea base y la privación de sueño. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

- **Sueño No-REM**

El tiempo que los sujetos de ambos grupos pasan en sueño No-REM difiere de forma significativa en los tres momentos de registro, siendo en todos los casos el grupo Saciado el que pasa más tiempo en sueño No-REM. Al comparar el tiempo en sueño No-REM entre los distintos momentos, se observa que en el grupo Saciado no hay diferencias significativas, solo en el grupo Restringido hay diferencias significativas tanto entre la línea base y la privación de sueño como entre la línea base y el moldeamiento, y que en ninguno de los grupos se observan diferencias significativas entre la privación de sueño y el moldeamiento (ver Figura 4).

El promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron en sueño No-REM durante los registros de línea base fue de 110,287 minutos ($SD=13,562$), mientras que para el grupo Restringido fue 66,987 minutos ($SD=8,960$). El promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron en sueño No-REM tras la privación de sueño fue de 88,55 minutos ($SD=48,130$), mientras que para el grupo Restringido fue 33,075 minutos ($SD=25,866$). Y el promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron en sueño No-REM tras el moldeamiento fue de 99,425 minutos ($SD=17,964$), mientras que para el grupo Restringido fue 32,3 minutos ($SD=18,454$).

Al analizar el tiempo de sueño No-REM en los distintos momentos de registro para ambos grupos, mediante ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor (ANOVA factorial mixto), se observa el efecto del factor intra-sujetos *momento* es significativo ($F= 11,785$, $p= 0,000$), el efecto del factor inter-sujetos *grupo* también es significativo ($F= 90,891$, $p= 0,000$), al igual que el efecto de interacción entre ambos factores ($F=6,090$, $p= 0,006$). En los tres momentos de registro se observan diferencias significativas entre los grupos en el tiempo total de sueño No-REM ($p= 0,000$).

Al comparar el tiempo que los sujetos pasan en sueño No-REM en los distintos momentos de registro mediante pruebas T para muestras relacionadas, el grupo Saciado no muestra diferencias significativas ($p>0,05$) entre los momentos, mientras que en el grupo Restringido se observan diferencias significativas tanto entre la línea base y la privación de sueño ($p=0,008$) como entre la línea base y el moldeamiento ($p=0,000$). El tiempo en sueño No-REM no difiere de forma significativa ($p>0,05$) entre privación de sueño y moldeamiento en ninguno de los grupos.

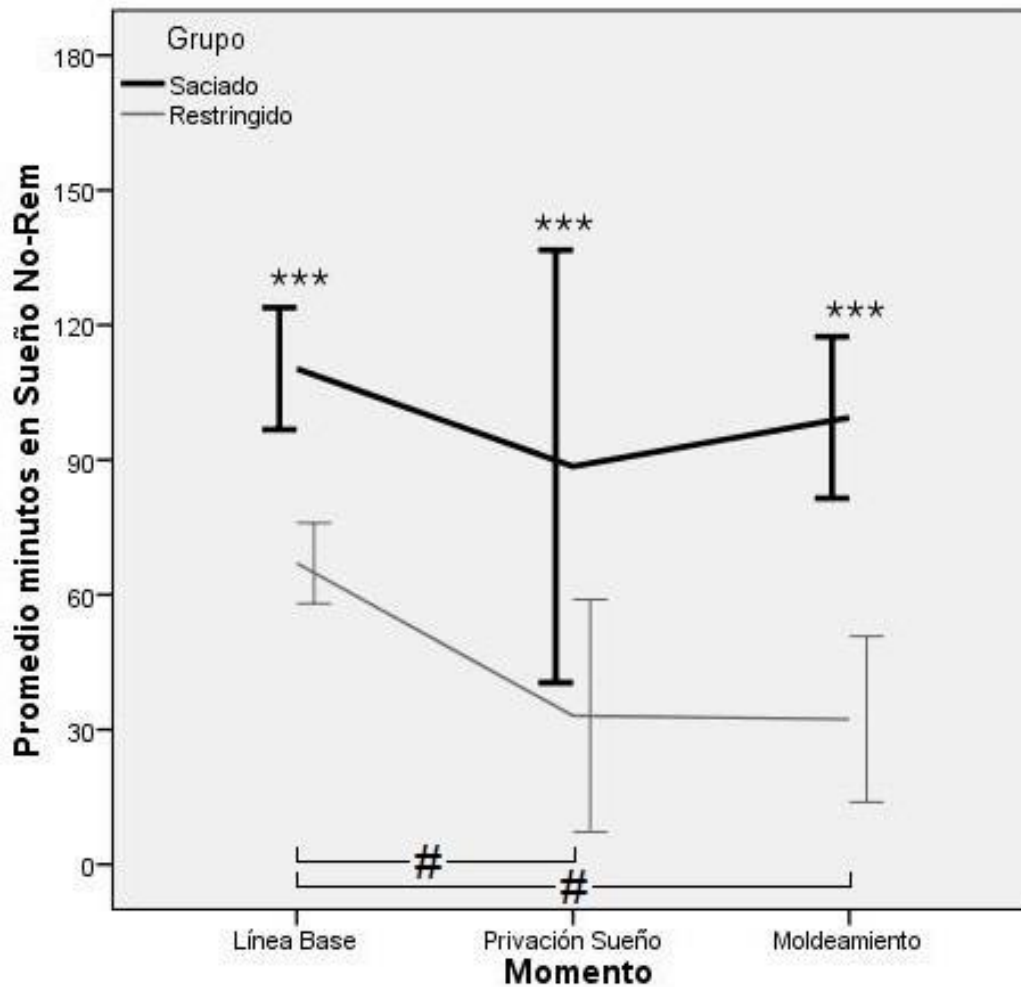


Figura 4. El gráfico muestra el promedio de tiempo (en minutos) que los sujetos de los grupos Saciado y Restringido pasaron en sueño No-REM en los distintos momentos de registro. Se observan diferencias significativas entre los grupos en los tres momentos ($***p < 0,001$). Las comparaciones intragrupalas muestran que solo en el grupo Restringido se observan diferencias significativas ($\#p < 0,05$) tanto entre la línea base y la privación de sueño como entre la línea base y el moldeamiento. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

- **Sueño REM**

El tiempo que los sujetos de ambos grupos pasan en sueño REM difiere de forma significativa solo tras la privación de sueño y el moldeamiento, siendo en todos los casos el grupo Saciado el que pasa más tiempo en sueño REM. Al comparar el tiempo en sueño REM entre los distintos momentos, se observa que en el grupo Saciado no hay diferencias significativas, solo en el grupo Restringido hay diferencias significativas tanto entre la línea base y la privación de sueño como entre la línea base y el moldeamiento, y que en ninguno de los grupos se observan diferencias significativas entre la privación de sueño y el moldeamiento (ver Figura 5).

El promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron en sueño REM durante los registros de línea base fue de 20,212 minutos ($SD=8,218$), mientras que para el grupo Restringido fue 15,575 minutos ($SD=5,403$). El promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron en sueño REM tras la privación de sueño fue de 14,3 minutos ($SD=9,258$), mientras que para el grupo Restringido fue 8,25 minutos ($SD=6,132$). Y el promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron en sueño REM tras el moldeamiento fue de 15,425 minutos ($SD=6,282$), mientras que para el grupo Restringido fue 6,05 minutos ($SD=5,211$).

Al analizar el tiempo de sueño REM en los distintos momentos de registro para ambos grupos, mediante ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor (ANOVA factorial mixto), se observa el efecto del factor intra-sujetos *momento* es significativo ($F= 8,205$, $p= 0,001$), al igual que el efecto del factor inter-sujetos *grupo* también es significativo ($F= 14,063$, $p= 0,002$), sin embargo el efecto de interacción entre ambos factores no es significativo en este caso ($F=0,674$, $p= 0,517$). Al comparar el tiempo de sueño REM entre los grupos en los distintos momentos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en línea base ($p= 0,204$), pero sí se observaron diferencias significativas entre los grupos tras la privación de sueño ($p= 0,008$) y tras el moldeamiento ($p= 0,010$).

Al comparar el tiempo que los sujetos pasan en sueño REM en los distintos momentos de registro mediante pruebas T para muestras relacionadas, el grupo Saciado no muestra ninguna diferencia significativa ($p>0,05$), mientras que en el grupo Restringido se observan diferencias significativas entre todos los momentos: entre línea base y privación de sueño ($p=0,015$), entre línea base y moldeamiento ($p=0,000$), y entre privación de sueño y moldeamiento ($p=0,017$).

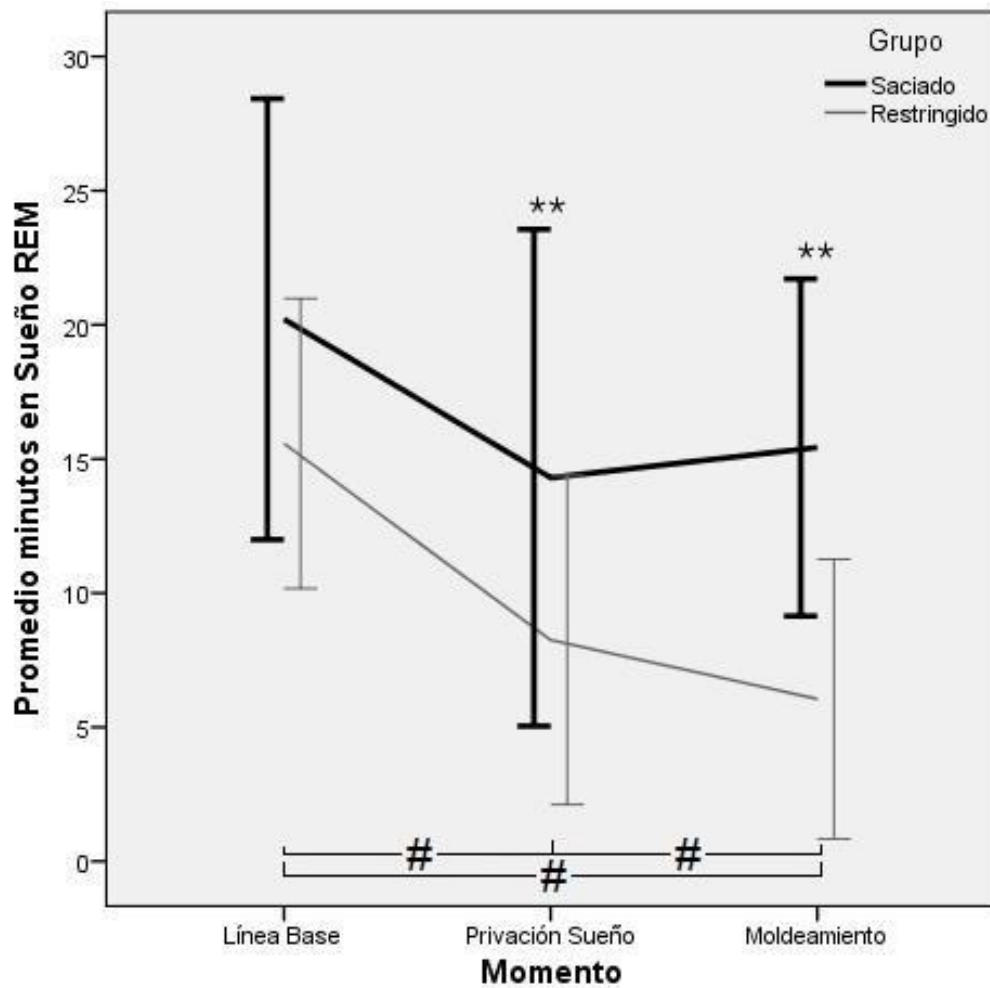


Figura 5. El gráfico muestra el promedio de tiempo (en minutos) que los sujetos de los grupos Satiado y Restringido pasaron en sueño REM en los distintos momentos de registro. Se observan diferencias significativas entre los grupos solo tras el moldeamiento (** $p < 0,01$). Las comparaciones intragrupalas muestran que solo en el grupo Restringido se observan diferencias significativas (# $p < 0,05$) entre los distintos momentos. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

ii. Demora en el inicio del sueño

El tiempo que los sujetos pasan en vigilia inmediatamente después de haber sido reconectados tras la privación de sueño y el moldeamiento (la demora en el inicio del sueño) no difiere significativamente ($p>0,05$) entre los grupos ni entre los momentos de registro (ver Figura 6).

El promedio de tiempo que los sujetos del grupo Saciado pasaron despiertos tras la privación de sueño fue de 18,875 minutos ($SD=9,489$), mientras que para el grupo Restringido fue de 20,055 minutos ($SD=15,220$). Tras el moldeamiento, los sujetos del grupo Saciado pasaron despiertos 20,025 minutos en promedio ($SD=17,229$), mientras que en el grupo Restringido pasaron despiertos 26,525 minutos en promedio ($SD=10,662$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni entre los momentos ($p>0,05$).

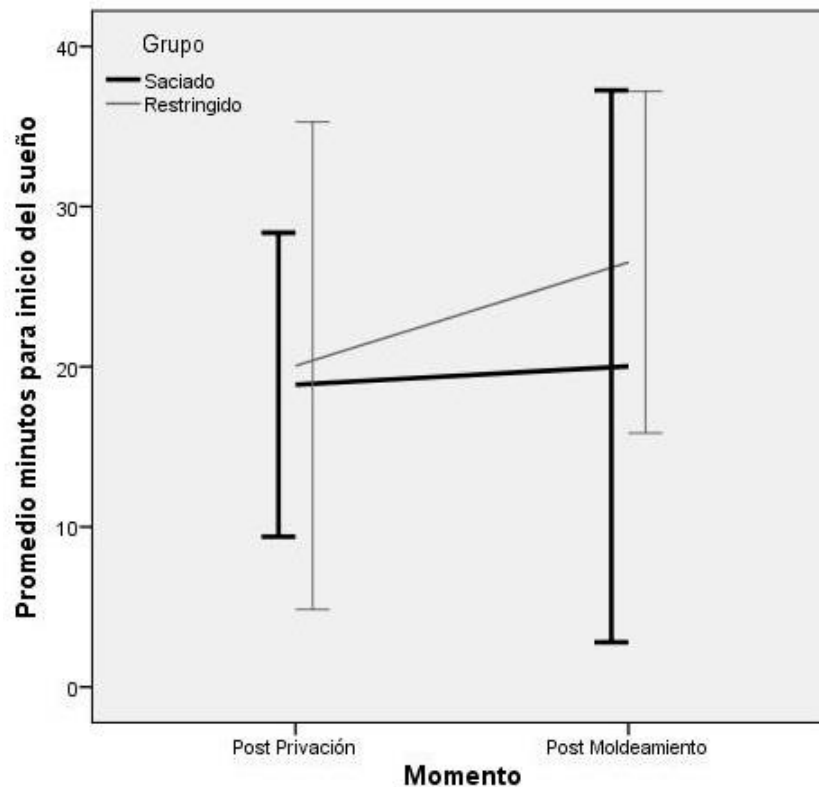


Figura 6. El gráfico muestra el promedio de tiempo (en minutos) que los sujetos de los grupos Saciado y Restringido demoran en quedarse dormidos tras las reconexiones tras la privación de sueño y el moldeamiento. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni entre los momentos. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

iii. Fragmentación del sueño

- Vigilia

En el grupo Saciado se observa una vigilia más fragmentada (episodios de vigilia de menor duración) que en el grupo Restringido. En el grupo Saciado, los episodios de vigilia se ven más interrumpidos por episodios de sueño que en el grupo Restringido. Las diferencias entre los grupos son significativas (ver Figura 7).

Durante los registros de línea base, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 35,6 episodios de vigilia ($SD=18,691$) de una duración promedio de 1,352 minutos ($SD=3,817$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 21,7 episodios de vigilia ($SD=10,242$) de una duración promedio de 4,596 minutos ($SD=10,244$). Durante los registros de privación de sueño, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 31,25 episodios de vigilia ($SD=14,058$) de una duración promedio de 1,654 minutos ($SD=4,526$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 17,444 episodios de vigilia ($SD=7,143$) de una duración promedio de 7,7 minutos ($SD=9,839$). Durante los registros del moldeamiento, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 32,9 episodios de vigilia ($SD=21,173$) de una duración promedio de 1,987 minutos ($SD=5,987$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 19,8 episodios de vigilia ($SD=7,020$) de una duración promedio de 7,13 minutos ($SD=10,290$).

Al comparar mediante una prueba T para muestras independientes la cantidad de episodios de vigilia entre los grupos, solo se encuentran diferencias significativas tras la privación de sueño ($p=0,020$), mientras que la cantidad de episodios de vigilia no difiere significativamente ($p>0,05$) entre los grupos ni durante línea base ni tras el moldeamiento. En cuanto a la duración de los episodios de vigilia, se observan diferencias significativas ($p=0,000$) en todos los momentos de registro.

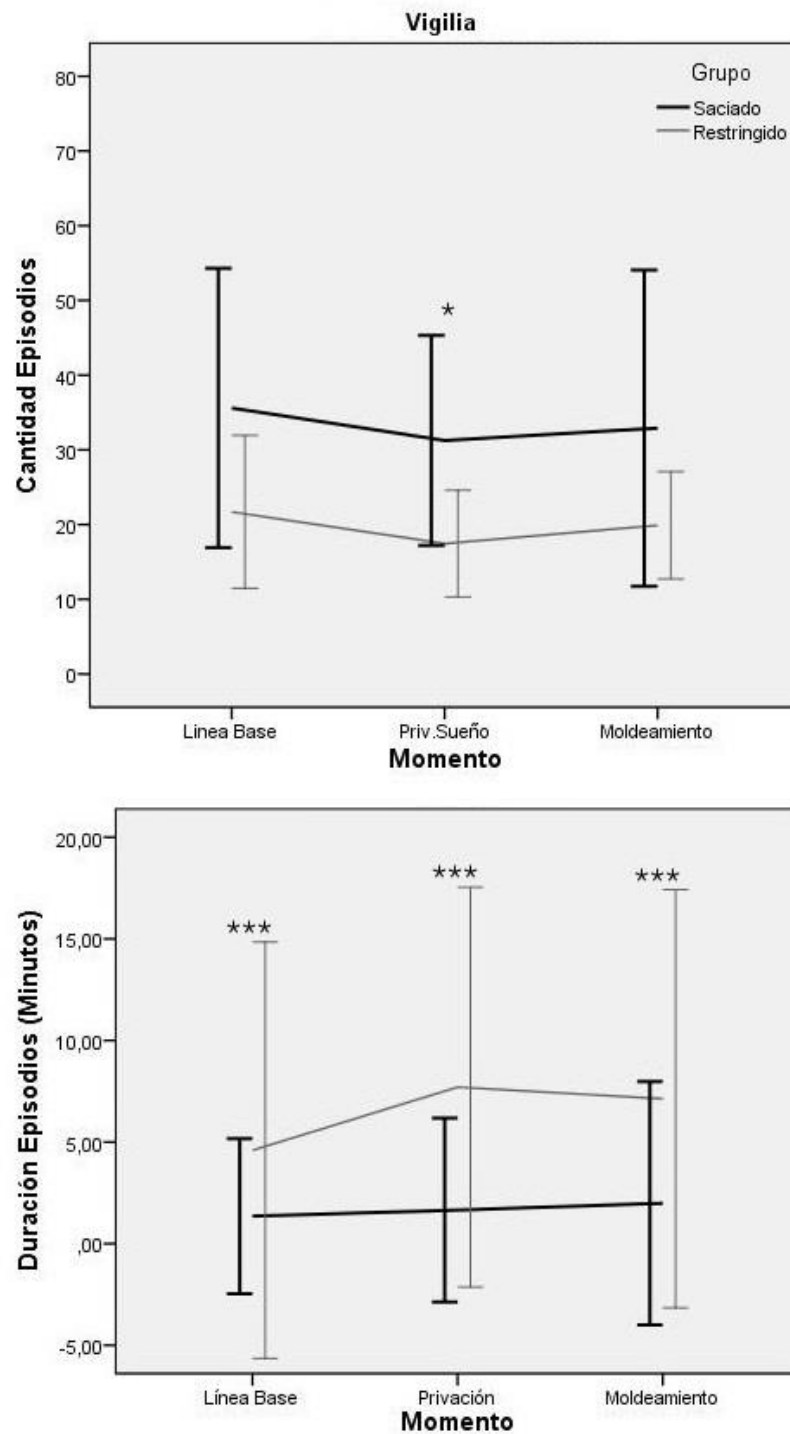


Figura 7. El panel superior muestra la cantidad de episodios de vigilia en cada momento de registro. El panel inferior muestra la duración de dichos episodios de vigilia.

Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

- **Sueño No-REM**

En el grupo Saciado se observan episodios menos fragmentados de sueño No-REM (episodios de sueño de mayor duración, menos interrumpidos), en comparación con el grupo Restringido. El grupo Restringido muestra episodios más fragmentados de sueño No-REM. Las diferencias entre los grupos son significativas (ver Figura 8)

Durante los registros de línea base, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 56,1 episodios de sueño No-REM ($SD=14,548$) de una duración promedio de 1,976 minutos ($SD=1,889$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 42 episodios de sueño No-REM ($SD=16,411$) de una duración promedio de 1,489 minutos ($SD=1,267$). Durante los registros de privación de sueño, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 45,5 episodios de sueño No-REM ($SD=12,130$) de una duración promedio de 2,432 minutos ($SD=2,187$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 30,222 episodios de sueño No-REM ($SD=14,254$) de una duración promedio de 1,216 minutos ($SD=0,960$). Durante los registros del moldeamiento, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 47,2 episodios de sueño No-REM ($SD=16,074$) de una duración promedio de 2,106 minutos ($SD=2,074$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 26,4 episodios de sueño No-REM ($SD=15,500$) de una duración promedio de 1,106 minutos ($SD=0,918$).

Al comparar mediante una prueba T para muestras independientes la cantidad de episodios de sueño No-REM entre los grupos, se encuentran diferencias significativas tras la privación de sueño ($p=0,032$) y tras el moldeamiento ($p=0,012$), mientras que la cantidad de episodios de sueño No-REM no difiere significativamente ($p>0,05$) entre los grupos durante los registros de línea base. En cuanto a la duración de los episodios de sueño No-REM entre los grupos, se observan diferencias significativas ($p=0,000$) en todos los momentos de registro.

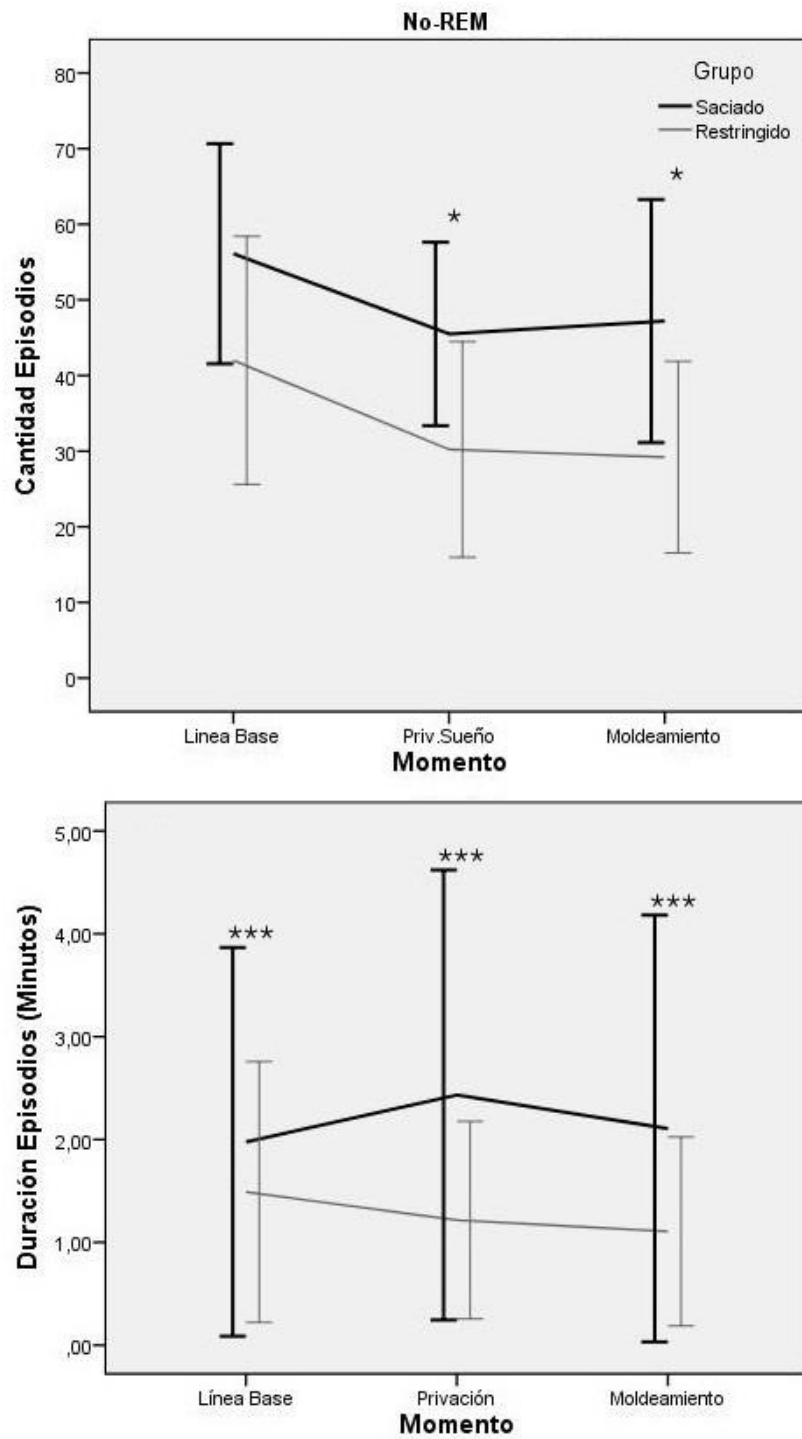


Figura 8. El panel superior muestra la cantidad de episodios de sueño No-REM en cada momento de registro. El panel inferior muestra la duración de dichos episodios. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

- **Sueño REM**

En el grupo Saciado se observan episodios menos fragmentados de sueño REM (episodios de sueño de mayor duración, menos interrumpidos), en comparación con el grupo Restringido. El grupo Restringido muestra episodios más fragmentados de sueño REM. Las diferencias entre los grupos son significativas (ver Figura 9).

Durante los registros de línea base, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 28,5 episodios de sueño REM ($SD=14,713$) de una duración promedio de 0,743 minutos ($SD=0,633$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 26,5 episodios de sueño REM ($SD=11,890$) de una duración promedio de 0,6 minutos ($SD=0,622$). Durante los registros de privación de sueño, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 21,125 episodios de sueño REM ($SD=8,951$) de una duración promedio de 0,846 minutos ($SD=0,831$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 21 episodios de sueño REM ($SD=9,526$) de una duración promedio de 0,518 minutos ($SD=0,404$). Durante los registros del moldeamiento, los sujetos del grupo Saciado tuvieron un promedio de 22,2 episodios de sueño REM ($SD=9,874$) de una duración promedio de 0,694 minutos ($SD=0,737$), mientras que los sujetos del grupo Restringido tuvieron un promedio de 18,2 episodios de sueño REM ($SD=13,472$) de una duración promedio de 0,435 minutos ($SD=0,317$).

Al comparar mediante una prueba T para muestras independientes la cantidad de episodios de sueño REM entre los grupos, no se encuentra ninguna diferencia significativa ($p>0,05$) entre los grupos en ninguno de los momentos de registro. En cuanto a la duración de los episodios de sueño REM entre los grupos, se observan diferencias significativas ($p=0,008$ en línea base, $p=0000$ en privación de sueño y moldeamiento) en todos los momentos de registro.

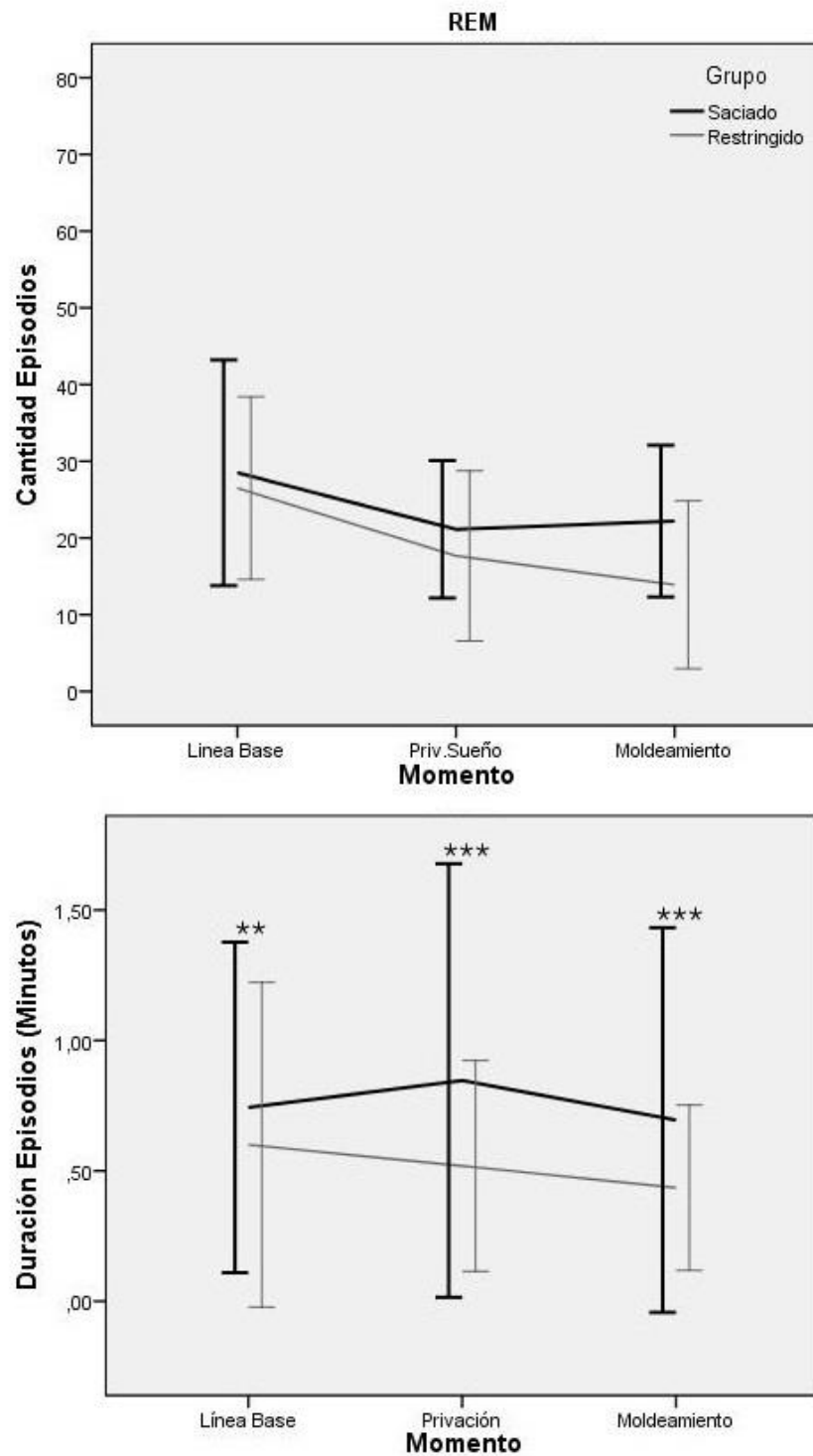


Figura 9. El panel superior muestra la cantidad de episodios de sueño REM en cada momento de registro. El panel inferior muestra la duración de dichos episodios. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

iv. Poder espectral del sueño No-REM

Tras *suavizar* (considerar solo los episodios de sueño No-REM cuya duración fuera de un minuto o más), estandarizar y analizar los valores promedio de la acumulación de *Energía Delta* (*Delta Energy buildup*) mediante pruebas T para muestras independientes, no se observan diferencias significativas entre los grupos Saciado y Restringido luego de la privación de sueño.

Sin embargo, tras el moldeamiento, la Energía Delta del grupo Restringido empieza a alcanzar niveles significativamente mayores que en del grupo Saciado (ver Figura 10).

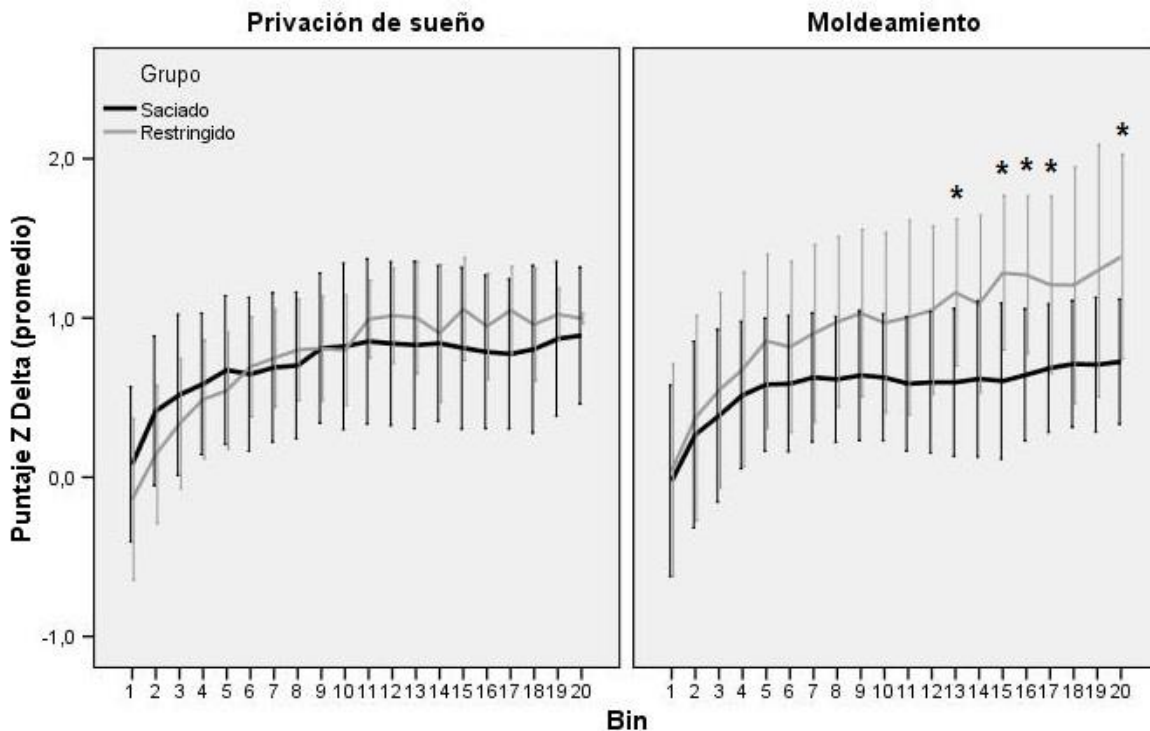


Figura 10. Promedio de Energía Delta (estandarizada) de los grupos Saciado y Restringido, tras la privación de sueño y tras el moldeamiento. Se observan diferencias significativas entre los grupos ($*p < 0,05$) solo durante los últimos bins del moldeamiento. Las barras de error representan ± 1 Desviación Estándar.

Al observar los hipnogramas, espectrogramas y gráficos del poder espectral de los distintos momentos de registro de una rata representativa del grupo Saciado (ver Figura 11), llama la atención la aparición de sueño No-REM en bloques poco fragmentados (sobre todo tras la privación de sueño), la gran predominancia de ondas de baja frecuencia y alta amplitud (color amarillo en las franjas inferiores de cada espectrograma), y un aumento del poder espectral del sueño No-REM tras el moldeamiento.

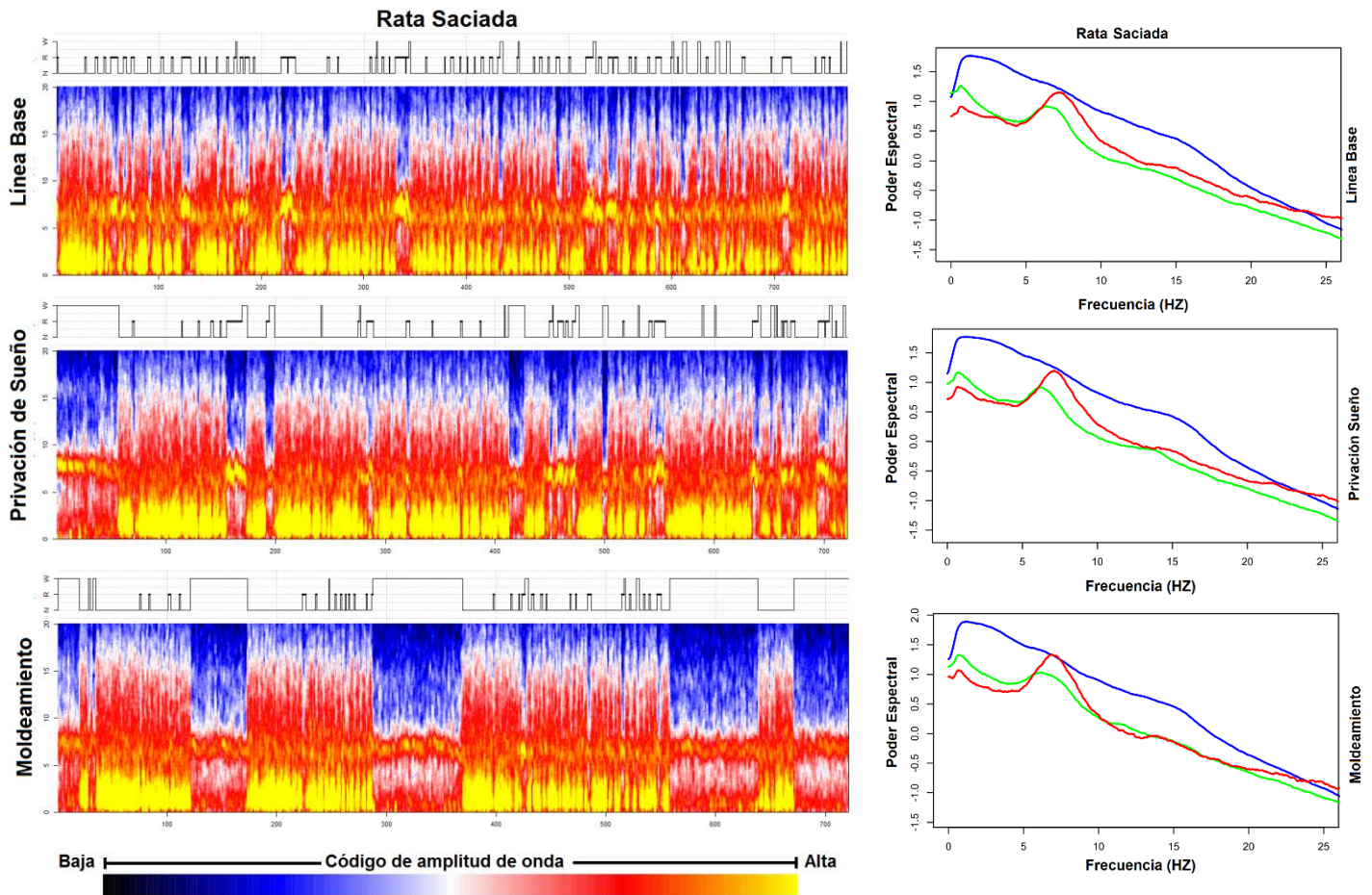


Figura 11. En la mitad izquierda de la imagen se presentan en blanco y negro los hipnogramas representativos de una rata del grupo Saciado, tanto en línea base como tras la privación de sueño y el moldeamiento. Cada hipnograma aparece acompañado por un espectrograma de frecuencias (izquierda), con 720 asignaciones de estado en épocas de 15s, junto con el poder espectral correspondiente (derecha). El poder espectral muestra las diferencias por estado (verde=Vigilia; azul= No-REM; rojo=REM)

En comparación con la figura anterior, al observar los gráficos de una rata representativa del grupo Restringido (ver Figura 12) llama la atención la presencia predominante del estado de vigilia en grandes bloques poco fragmentados (acompañada de un patrón más fragmentado de sueño), y la disminución de las ondas de baja frecuencia y alta amplitud (color amarillo en las franjas inferiores de cada espectrograma). El poder espectral del sueño No-REM en este caso parece no sufrir variaciones importantes entre los distintos momentos de registro.

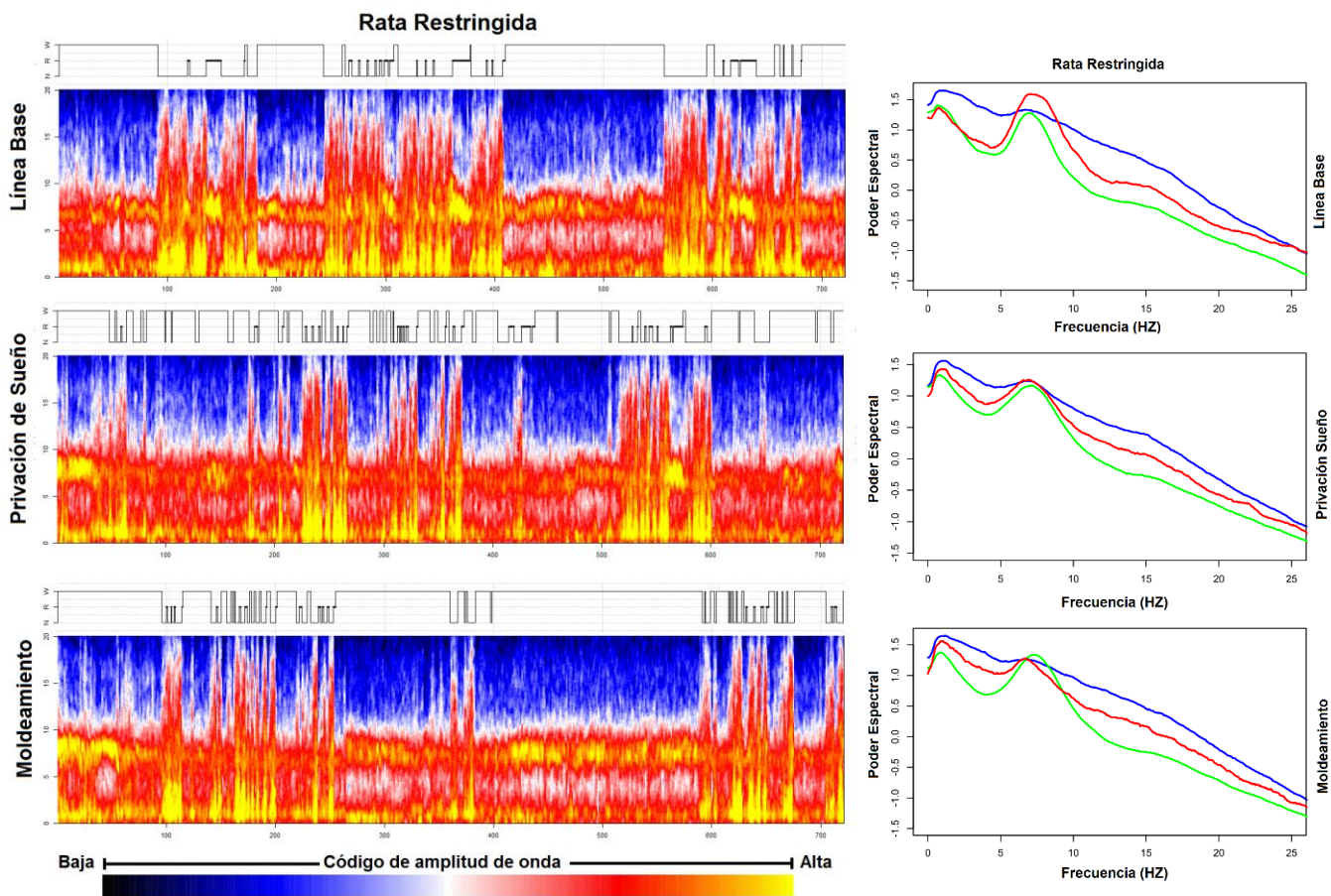


Figura 12. En la mitad izquierda de la imagen se presentan en blanco y negro los hipnogramas representativos de una rata del grupo Restringido, tanto en línea base como tras la privación de sueño y el moldeamiento. Cada hipnograma aparece acompañado por un espectrograma de frecuencias (izquierda), con 720 asignaciones de estado en épocas de 15s, junto con el poder espectral correspondiente (derecha). El poder espectral muestra las diferencias por estado (verde=Vigilia; azul= No-REM; rojo=REM)

VIII. DISCUSIÓN

Los principales objetivos de esta investigación fueron, en primer lugar, comparar el desempeño de un grupo de ratas con libre acceso a comida y un grupo de ratas sometidas a restricción alimenticia en una tarea de condicionamiento operante en que se usaron pellets como reforzadores. Y en segundo lugar, comparar distintas características del sueño en las horas posteriores al aprendizaje en estos grupos de ratas.

Para alcanzar el primer objetivo, se siguió un protocolo común de restricción alimenticia para uno de los grupos, y se mantuvo completamente *ad libitum* al otro. Sin embargo, en este primer intento de llevar a cabo el experimento, se descubrió que si las ratas llegan a la caja experimental en condiciones de libre acceso a comida (sin ningún tipo de restricción o privación alimenticia), el entrenamiento reforzado por la presentación de comida se hace extremadamente difícil. Las ratas completamente saciadas no se acercaban al comedero, y si lo hacían eran mucho más impredecibles que sus pares en restricción alimenticia, y en la mayoría de los casos dejaban de buscar los pellets a pocos minutos de iniciado el entrenamiento, ignorando por completo la presencia de la palanca e incluso adoptando una postura de sueño.

Para solucionar esta situación, se desarrolló un estudio piloto en que se probaron distintas formas de motivar a las ratas saciadas a trabajar en la caja experimental. Esto llevó a plantear un objetivo metodológico que inicialmente no había sido considerado: generar un protocolo experimental que permitiera entrenar mediante reforzamiento positivo (aprendizaje apetitivo) a ratas que no fueran sometidas a una restricción alimenticia prolongada que implique la reducción de la masa corporal de los sujetos.

Aunque no se reportan en detalle los resultados de ese estudio piloto, en primer lugar se intentó motivar a las ratas saciadas con pellets sabrosos (con sabor a chocolate). Sin embargo, esta modificación por sí sola no fue suficiente para motivar a los sujetos saciados a trabajar en la caja experimental. Solo se logró motivar a las ratas saciadas retirándoles todo el alimento 24 horas antes del moldeamiento de la conducta operante. Esta medida se tomó considerando los resultados de Dewasmes, Duchamp & Minaires, (1989), que no encontraron variaciones significativas en el sueño de las ratas privadas de alimento durante un día completo.

Si bien, ya se había propuesto la eliminación del protocolo de restricción de alimento por razones éticas y prácticas (e.g. Lupfer-Johnson et al., 2010), y se habían

diseñado investigaciones en que no se privó de alimento a los sujetos, esto se realizó para otras especies -hamsters- (e.g. Lupfer-Johnson et al., 2010), o con alimentos altos en grasas (Corwin et al., 1998; Todd et al., 2012), y hasta donde se sabe no se había diseñado un protocolo viable para entrenar con pellets a ratas que llegan al día del aprendizaje con su peso de alimentación libre.

Ya que la tasa de respuesta promedio de ambos grupos no difiere de forma significativa durante el moldeamiento ni durante la adquisición de la conducta operante (Figura 1), ni tampoco se observan diferencias en el desarrollo temporal de las respuestas (Figura 2), con esta investigación se aporta evidencia que permite sostener que a pesar de las dificultades iniciales en el entrenamiento, sí es posible trabajar en un experimento de aprendizaje apetitivo con ratas sin necesidad de mantenerlas durante varios días por debajo de su peso de alimentación libre. Sin embargo, a pesar de los intentos por trabajar con ratas totalmente saciadas, fue necesario retirarles la comida a los sujetos durante el día previo al inicio del entrenamiento para mantenerlos motivados a trabajar por comida. Otro de los aspectos a considerar, es que el desempeño de las ratas saciadas durante la adquisición de la conducta operante fue mucho más variado que el de las ratas restringidas, observándose una dispersión mucho mayor en el perfil temporal de respuestas (Figura 2).

En relación al segundo objetivo de la investigación, se observaron diferencias significativas en todas las características analizadas de la arquitectura del sueño de ambos grupos de ratas en las horas posteriores al aprendizaje, a excepción de la demora en el inicio del sueño tras las reconexiones (Figura 6). Las principales diferencias observadas en el sueño de ambos grupos fueron: tiempo total de vigilia (Figura 3), sueño No-REM (Figura 4) y sueño REM (Figura 5), mostrándose en las ratas saciadas un tiempo total de sueño No-REM y REM significativamente mayor que el que se registró en las ratas restringidas (que en cambio presentaban mayor tiempo en vigilia); y fragmentación del sueño (Figuras 7, 8 y 9), siendo la duración de los episodios la característica más notoriamente distinta entre ambos grupos (las ratas saciadas tenían ambos tipos de sueño menos fragmentado, es decir, con episodios de mayor duración que sus pares en restricción alimenticia). Estos resultados son concordantes con los espectrogramas en que se observa que en el grupo Saciado predomina la actividad de onda lenta menos fragmentada (Figura 11) en comparación con el grupo Restringido (Figura 12).

Aunque respecto al poder espectral del sueño No-REM también se observaron diferencias significativas, la interpretación de estos datos podría resultar ambigua, ya que por una parte, se señala que tras el moldeamiento el poder espectral es significativamente mayor en el grupo Restringido (Figura 10), y por otra parte, al comparar los gráficos de espectro del moldeamiento en ambos grupos se observa que el grupo Saciado tiene una puntuación mayor (cercana a 2,0, Figura 11) que el grupo Restringido (cercana a 1,5, Figura 12) para las frecuencias de onda menores a 5 Hz. Sin embargo, es importante recordar que estos espectrogramas representan una descripción individual, corresponden a una rata representativa de cada grupo, por lo que existe la posibilidad de que el comportamiento de esa rata elegida al azar no coincida con la tendencia general del grupo completo.

Que el poder espectral del sueño No-REM sea mayor en el grupo Restringido, podría considerarse una forma de compensación por la disminución del tiempo total de sueño (Deboer, 2013) en este grupo, y permitiría explicar el éxito en el aprendizaje de la conducta operante a pesar de la importante pérdida del tiempo de sueño y la fragmentación del mismo. Sin embargo, contradiría las suposiciones de deterioro general del sueño en el grupo Restringido que se hicieron antes de ver los resultados de esta investigación.

Por otro lado, si el poder espectral del sueño No-REM es mayor en el grupo Saciado, todas las características del sueño comparadas entre los grupos apuntarían a que en la condición de saciedad las ratas tienen un sueño mejor conservado que en la condición de restricción alimenticia, y por lo tanto un mejor aprendizaje. En este caso, también podría esperarse encontrar un beneficio en el desempeño de las ratas saciadas durante la adquisición de la conducta operante, y sin embargo esto no ocurre. Otra de las predicciones que no se cumplió, refiere a la mantención o disminución del tiempo total de ambos tipos sueño tras el moldeamiento (en comparación con los otros dos momentos de registro), en condiciones en que se esperaba un aumento del tiempo de sueño (Leenaars et al., 2013).

Una limitación importante de esta investigación es que solo se analizaron ventanas de tres horas, por lo que se desconoce si las diferencias observadas entre los grupos se mantienen durante el resto del día o si, por el contrario, los datos tienden a igualarse o incluso si tienden a revertirse las diferencias entre los grupos. A pesar de esta limitación y de la ambigüedad en la interpretación de las diferencias observadas en el poder espectral

del sueño No-REM tras el moldeamiento, con esta investigación se aporta evidencia que muestra que la tasa de respuesta de las ratas saciadas permite trabajar con ellas en un experimento de aprendizaje apetitivo -si se les retira la comida de mantención 24 horas antes del moldeamiento-, y además se muestra evidencia consistente sobre las diversas alteraciones en el sueño que sufren los sujetos experimentales sometidos a una restricción alimenticia que implica mantenerlos bajo su peso de alimentación libre por varios días.

En las investigaciones futuras de sueño y aprendizaje se debieran tener en cuenta estos datos, ya que los resultados fisiológicos obtenidos en tales investigaciones podrían estar siendo alterados por los efectos de la restricción alimenticia sobre el sueño. Además, sería interesante ver cómo se comportan los registros del día completo, ya que es posible que la pérdida de sueño observada durante las primeras tres horas de registro tienda a compensarse con un aumento del tiempo que los sujetos pasan durmiendo en las horas posteriores, o bien, con un aumento del poder espectral del sueño No-REM en las ratas sometidas a restricción alimenticia.

Finalmente, podrían generarse nuevas investigaciones en esta línea, en que se evalúen y comparen los efectos fisiológicos de otros protocolos de restricción alimenticia comúnmente usados en los experimentos de sueño y aprendizaje (por ejemplo, la mantención de los sujetos al 85% o al 90% de su peso de alimentación libre), en que se propongan otros métodos menos estresantes que la restricción alimenticia prolongada para motivar a los sujetos a trabajar por comida (por ejemplo, comparando el efecto de privaciones totales de comida en períodos de menos de 24 horas, o modificando características de la comida usada como reforzador), o en que se comparen otros tipos de aprendizaje que podrían estar siendo influenciados por las alteraciones de sueño que produce la restricción alimenticia (por ejemplo, la memoria dependiente de contexto, que no fue evaluada en este experimento).

IX. CONCLUSIONES

Esta investigación evidencia que el protocolo de restricción alimenticia usado comúnmente en experimentos de sueño y aprendizaje, en que se mantiene a los sujetos experimentales al 80% de su peso de alimentación libre, produce alteraciones fisiológicas en estos, lo cual se traduce principalmente en una disminución del tiempo que los sujetos restringidos de alimento pasan en ambos tipos de sueño (No-REM y REM) en las tres horas posteriores al entrenamiento de una conducta operante, además de una fragmentación del patrón de sueño.

Se logró generar un protocolo alimenticio alternativo, en que los sujetos tuvieron libre acceso a comida durante gran parte del experimento, y sólo se les retiró la comida durante las 24 horas previas al moldeamiento de la conducta operante. La tasa de respuesta de estos sujetos no difirió significativamente de la tasa de respuesta observada en los sujetos del grupo sometido a restricción alimenticia, lo cual demuestra que es posible trabajar de forma exitosa con ratas que no han sido mantenidas durante varios días por debajo de su peso de alimentación libre.

La comparación del poder espectral del sueño No-REM entre ambos grupos conduce a interpretaciones ambiguas, sin embargo, parece que la disminución del tiempo de sueño -así como la fragmentación del mismo- en los sujetos sometidos a restricción alimenticia, se ve compensado por un aumento del poder de la onda lenta durante el sueño No-REM en comparación con las ratas saciadas, lo que podría explicar que las ratas restringidas de alimento aprendan la conducta operante con episodios de sueño más breves y fragmentados que sus pares con libre acceso a comida. Sin embargo, para esclarecer este asunto, se necesitaría llevar a cabo investigaciones futuras.

X. REFERENCIAS

- Alvarenga, T. A. F., Andersen, M. L., Papale, L. A., Antunes, I. B., & Tufik, S. (2005). Influence of long-term food restriction on sleep pattern in male rats. *Brain Research*. 1057, 49-56. doi:10.1016/j.brainres.2005.07.024
- Bastien, C. H. (2011). Insomnia: Neurophysiological and Neuropsychological Approaches. *Neuropsychol Rev* (2011) 21:22-40. DOI 10.1007/s11065-011-9160-3
- Borbély, A. A. (1976). Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food. *Brain Research*. 124, 457-471. doi:10.1016/0006-8993(77)90947-7
- Bórquez, M. (2016). *Efecto del sueño en la renovación de una respuesta operante* (Tesis doctoral inédita). Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Castro-Faúndez, J., Díaz, J., Ocampo-Garcés, A. (2016). Temporal organization of the sleep-wake cycle under food entrainment in the rat. *SLEEP* 2016;39(7):1451–1465. DOI: <http://dx.doi.org/10.5665/sleep.5982>
- Colten H. R., & Altevogt, B. M. (Eds.). (2006). Sleep Physiology. En *Sleep Disorders and Sleep Deprivation: An Unmet Public Health Problem* (pp 33-53). Washington (DC): National Academies Press. PMID: 20669438
- Corwin, R. L. (2004). Binge-type eating induced by limited access in rats does not require energy restriction on the previous day. *Appetite* 42 (2004) 139–142. doi:10.1016/j.appet.2003.08.010
- Corwin, R. L., Wojnicki, F. H. E., Fisher, J. O., Dimitriou, S. G., Rice, H. B., & Young, M. A. (1998). Limited Access to a Dietary Fat Option Affects Ingestive Behavior But Not Body Composition in Male Rats. *Physiology & Behavior*, Vol. 65, No. 3, pp. 545–553, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00201-7)
- Danguir, J., & Nicolaidis, S. (1979). Dependence of sleep on nutrient's availability. *Physiology and Behavior*. 22, 735-740. doi:10.1016/0031-9384(79)90240-3
- Datta, S. (2010). Sleep: Learning and Memory. En Koob, G. F., Le Moal, M., & Thompson, R. F. (Eds.), *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (218–226). DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00228-1>
- Deboer, T. (2013). Behavioral and Electrophysiological Correlates of Sleep and Sleep Homeostasis. En Meerlo P., Benca R., Abel T. (Eds. de la serie), *Current Topics in Behavioral Neurosciences: Vol 25. Sleep, Neuronal Plasticity and Brain Function*. (pp. 1-24). DOI: 10.1007/7854_2013_248

- Dewasmes, G., Duchamp, C., & Minaire, Y. (1989). Sleep changes in fasting rats. *Physiology & Behavior*. 46(2), 179-184. doi:10.1016/0031-9384(89)90252-7
- Dieckelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience* 11, 114-126 (February 2010). doi:10.1038/nrn2762
- Dijk, D. J. (2009). Regulation and Functional Correlates of Slow Wave Sleep. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2009 5(2), 6-15. PMID: 19998869
- Fernández-Mendoza, J., & Puhl, M. D. (2014). Sueño y Arousal. En Redolar, D. (Ed.), *Neurociencia Cognitiva* (601-633). España: Editorial Médica Panamericana.
- Franklin, S., & Hall, G. (2011). Analysis of the US-Preexposure Effects in Appetitive Conditioning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 2011 37(4):495-500. doi: 10.1037/a0025484.
- Gallistel, C. R., & Matzel, L. D. (2013). The Neuroscience of Learning: Beyond the Hebbian Synapse. *Annu. Rev. Psychol.* 2013.64:7.1–7.32. DOI: 10.1146/annurev-psych-113011-143807
- Ghiglieri, O., Gambarana, C., Scheggi, S., Tagliamonte, A., Willner, P., & De Montis, M. G. (1997). Palatable food induces an appetitive behaviour in satiated rats which can be inhibited by chronic stress. *Behavioural Pharmacology* (1997), 8, 619-628. PMID: 9832974
- Guegan, T., Cutando, L., Ayuso, E., Santini, E., Fisone, G., Bosch., S., Martinez, A., Valjent, E., Maldonado, R., & Martin, M. (2013). Operant behavior to obtain palatable food modifies neuronal plasticity in the brain reward circuit. *European Neuropsychopharmacology* (2013) 23, 146-159. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.04.004>
- Guzmán, E. (1995). Sueño y Aprendizaje. *Revista de Psicología General y Aplicada* 1995, 48(3), 271-282. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2161395>
- Inostroza, M., & Born, J. (2013). Sleep for Preserving and Transforming Episodic Memory. *Annual Review of Neuroscience* 2013. 36:79–102. DOI: 10.1146/annurev-neuro-062012-170429
- Jacobs, B. L., & McGinty, D. J. (1971). Effects of food deprivation on sleep and wakefulness in the rat. *Experimental Neurology*. 30, 212-222. doi:10.1016/S0014-4886(71)80002-X

- Jellison, J. L. (2003). "Justification of effort" in rats: Effects of physical and discriminative effort on reward value. *Psychological Reports* 2003, 93, 1095-1100. DOI: 10.2466/pr0.2003.93.3f.1095
- Leenaars, C. H. C., Girardi, C. E. N., Joosten, R. N. J. M. A., Lako, I. M., Ruimschotel, E., Hanegraaf, M. A. J., Dematteis, M., Feenstra, M. G. P., & Van Someren, E. J. W. (2013). Instrumental learning: An animal model for sleep dependent memory enhancement. *Journal of Neuroscience Methods* 217 (2013) 44-53. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.04.003>
- Lesku, J. A., Bark, R. J., Martinez-Gonzalez, D., Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J., & Lima, S. L. (2008). Predator-induced plasticity in sleep architecture in wild-caught Norway rats (*Rattus Norvegicus*). *Behavioural Brain Research* 189 (2008) 298-305. doi:10.1016/j.bbr.2008.01.006
- Lupfer-Johnson, G., Murphy, E. S., Blackwell, L. C., LaCasse, J. L., & Drummond, S. (2010). Operant behavior in dwarf hamsters (*Phodopus campbelli*): Effects of rate of reinforcement and reinforcer flavor variety. *Behavioural Processes* 84 (2010) 573-580. doi:10.1016/j.beproc.2010.02.016
- Maquet, P. (2001). The Role of Sleep in Learning and Memory. *Science*, 2001 Nov 2;294(5544):1048-52. PMID: 11691982. DOI: 10.1126/science.1062856
- Ocampo-Garcés, A., Castro, J., & Espinoza, D. (2012). Mecanismos neurales en el control del dormir. *Rev Hosp Clín Univ Chile* 2012; 23: 5 – 12. ISSN: 0716-7849 URI: <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/124265>
- Oliveira L. M. O., & Dimitrov, D. (2008). Surgical Techniques for Chronic Implantation of Microwire Arrays in Rodents and Primates. En Nicolelis M. A. L. (Ed.), *Methods for Neural Ensemble Recordings*. Segunda Edición. Boca Ratón (Florida): CRC Press/Taylor & Francis. Capítulo 2. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3895/>
- Rommelink, E., Loos, M., Koopmans, B., Aarts, E., Van der Sluis, S., Smit, A. B., Verhage, M., Neuro-BSIK Mouse Phenomics Consortium (2015). A 1-night operant learning task without food-restriction differentiates among mouse strains in an automated home-cage environment. *Behavioural Brain Research* 283 (2015) 53-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.020>

- Reppucci, C. J., & Petrovich, G. D. (2012). Learned food-cue stimulates persistent feeding in sated rats. *Appetite* 59 (2012) 437-447. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2012.06.007>
- Roky, R., Kapás, L., Taishi, P., Fang, J & Krueger, J. M. (1999). Food Restriction Alters the Diurnal Distribution of Sleep in Rats. *Physiology & Behavior*. 67(5), 697-703. doi:10.1016/S0031-9384(99)00137-7
- Siegel, J. M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437, 1264-1271 (October 2005). doi:10.1038/nature04285
- Skinner, B. F. (1938). *The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis*. Cambridge, Massachusetts: ProQuest. Recuperado de <http://s-f-walker.org.uk/pubsebooks/pdfs/The%20Behavior%20of%20Organisms%20-%20BF%20Skinner.pdf>
- Smith, C. (1984). Sleep States and Learning: A Review of the Animal Literature. *Neurosci Biobehav Rev*. 1985 Summer;9(2):157-68. PMID: 3892377
- Smith, C., Lowe, D., & Smith M. J. (1977). Increases in paradoxical and slow sleep during the acquisition of an appetitive task in rats. *Physiological Psychology* 1977, Vol.5 (3), 364-372. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.3758%2FBF03335346.pdf>
- Stephenson, R., Caron, A. M., Cassel, D. B., & Kostela, J. C. (2009). Automated analysis of sleep-wake state in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 184 (2009) 263-274. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.08.014
- Todd, T. P., Winterbauer, N. E., & Bouton, M. E. (2012). Contextual control of appetite. Renewal of inhibited food-seeking behavior in sated rats after extinction. *Appetite* 58 (2012) 484-489. doi:10.1016/j.appet.2011.12.006
- Yoon, S. Y. R., & Shapiro, C. M. (2013). Chronobiology of Sleep – Circadian Rhythms, Behavior, and Performance. En Kushida, C. (Ed.), *Encyclopedia of Sleep* (426–434). DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378610-4.00094-2>

XI. ANEXOS

Anexos sobre protocolos quirúrgicos idénticos a los utilizados por Bórquez (2016).

Anexo 1: Protocolos anestésicos, antibióticos, y de manejo inflamatorio.

Protocolo anestésico

<i>Inducción:</i>	Xilacina 0.1 mg/Kg. + Ketamina 0.1 mg/Kg.
<i>Dosis:</i>	0,15 ml Xilacina + 0,15 ml Ketamina disueltos en 0,7 ml de solución fisiológica 0,9%.
<i>Vía de administración:</i>	Punción directa intra-peritoneal.
<i>Intervalo administración:</i>	Al inicio de etapa quirúrgica, una vez.
<i>Conducción anestésica:</i>	Ketamina 0.1 mg/Kg.
<i>Dosis:</i>	0,20 ml Ketamina disueltos en 0,8 ml de solución fisiológica 0,9%.
<i>Vía de administración:</i>	Punción directa intra-peritoneal.
<i>Intervalo administración:</i>	Durante procedimiento quirúrgico si el animal demuestra signos de dolor, con un máximo de 3 veces.

Todos los procedimientos fueron registrados en la ficha quirúrgica de seguimiento.

Protocolo antibiótico y manejo del proceso inflamatorio

<i>Antibiótico:</i>	Enrofloxacino 10%
<i>Vía de administración:</i>	Punción directa intra-peritoneal.
<i>Dosis:</i>	0,1 ml disuelto en 0,4 ml de solución fisiológica 0,9%.
<i>Antiinflamatorio:</i>	Ketoprofeno 1%
<i>Vía de administración:</i>	Punción directa intra-peritoneal
<i>Dosis:</i>	0,1 ml. disuelto en 0,4 ml de solución fisiológica 0,9%.

Las dosis señaladas se colocaron al término del procedimiento quirúrgico. Todos los procedimientos fueron registrados en la ficha quirúrgica.

Anexo 2: Esquema de ubicación de electrodos para registro polisomnográfico

Nº Electrodo	Registro
1 y 3	EMGW
2 y 4	EOG
5, 6 y 7	EEG
8, 9 y 10	EMG

Coordenadas estereotáxicas para ubicación de electrodos corticales

Nº Electrodo	Antero-Posterior	Lateral
5	2,5	-3,0
6	2,5	3,0
7	-2,0	0,0

