



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



INTERACCIÓN ENTRE LA HOMEOSTASIS DEL SUEÑO DE
MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS (MOR), LA
EXPRESIÓN DE LA VIGILIA Y EL SUEÑO NO-MOR

SEBASTIÁN ROBERTO LÓPEZ ROMERO

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

PROFESOR GUIA: DR. ADRIÁN OCAMPO GARCÉS, MD

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



INTERACCIÓN ENTRE LA HOMEOSTASIS DEL SUEÑO DE MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS (MOR), LA EXPRESION DE LA VIGILIA Y EL SUEÑO NO-MOR

SEBASTIÁN ROBERTO LÓPEZ ROMERO

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

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA : ADRIÁN OCAMPO GARCÉS

PROFESOR CONSEJERO: ANDRONICO NEIRA CARRILLO

PROFESOR CONSEJERO: ENZO BOSCO VIDAL

NOTA

FIRMA

7.0
7.0
7.0

SANTIAGO, CHILE
2009

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	pag. 3
RESUMEN.....	pag. 4
ABSTRACT.....	pag. 5
INTRODUCCIÓN.....	pag. 6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	pag. 8
1. El Ciclo sueño-vigilia (CSV).....	pag. 8
2. Los estados de ciclo sueño-vigilia.....	pag. 9
3. Mecanismos de regulación del ciclo sueño-vigilia.....	pag. 11
3.1 Ritmos circadianos.....	pag. 12
3.1.1 Propiedades de los ritmos circadianos.....	pag.12
3.1.2. El reloj circadiano.....	pag. 13
3.1.3 Control circadiano del ciclo sueño vigilia.....	pag. 14
3.2 Mecanismos Homeostáticos.....	pag. 15
3.2.1 Homeostasis del sueño NMOR.....	pag. 15
3.2.2 Homeostasis del sueño MOR.....	pag. 17
4. El problema: Interacción entre la homeostasis del NMOR y el MOR.....	pag. 18
HIPÓTESIS.....	pag. 20
OBJETIVO GENERAL.....	pag. 20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	pag. 20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	pag. 21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	pag. 26
RESULTADOS.....	pag. 28
1. Descripción de un caso representativo.....	pag. 28

2. Perfil temporal de la respuesta de los estados.....	pag. 32
2.1 Respuesta del sueño NMOR.....	pag. 34
2.2 Respuesta del sueño MOR.....	pag. 35
2.3 Respuesta de sueño MOR en función del sueño total.....	pag. 37
3 Respuesta de los estados durante las ventanas de sueño espontáneo.....	pag. 38
3.1 Respuesta del sueño NMOR	pag. 40
3.2 Respuesta del sueño MOR.....	pag. 40
3.3 Respuesta de MOR/TST.....	pag. 41
4. Estimación de la presión homeostática del sueño NMOR.....	pag. 41
5 Estimación de la presión homeostática del sueño MOR.....	pag. 44
5.1 Índice de transiciones.....	pag. 44
5.1.2 Índice de transiciones al interior de la privación intermitente....	pag. 46
5.2 Rebote de Sueño MOR.....	pag. 47
5.2.1 Número de episodios.....	pag. 47
5.2.2 Tasa de consolidación.....	pag. 49
5.2.3 Duración de los episodios de Sueño MOR.....	pag. 51
5.3 Acumulación del Sueño MOR.....	pag. 53
DISCUSIÓN.....	pag. 55
CONCLUSIONES.....	pag. 65
BIBLIOGRAFÍA.....	pag. 66

AGRADECIMIENTOS

En este camino que finaliza con la gran meta de convertirme en Médico Veterinario son varias las personas con las que me siento en deuda. De diferentes formas todas ellas han contribuido a que pueda concretar este logro. Las personas que sin ninguna duda fueron clave en este proceso fueron mis padres, Bernardita y Luis, agradezco profundamente el amor y el esfuerzo que me entregaron y que permitió este sueño. Durante la última etapa de este camino, que estando tan cerca fue muy difícil, estuvo siempre el apoyo de mi mujer, Francisca, en todo momento y por sobre todo en los momentos de flaqueza, gracias por ayudarme a mantenerme en la senda.

Muy agradecido estoy de mi profesor guía, Adrián Ocampo, gracias por tu profesionalismo, por la muy buena disponibilidad, tu enseñanza y generosidad.

En un momento me vi enfrentado al dilema del trabajo o realizar la Memoria de título, mis amigos Cristóbal, Paulina, Marcelo, Eugenio, Romina y Ana, muchas gracias por sus sabios consejos en ese difícil momento y en otras innumerables ocasiones.

Debo a agradecer también la ayuda desinteresada, durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio, de Jorge Estrada y de Cristián López, gracias por la amistad y la buena disposición a responder mis preguntas y ayudarme cada vez que se presentaron dificultades.

Muchas gracias a todos Ustedes.

RESUMEN

En gatos, ratas y ratones, la cantidad de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) perdido durante una privación de sueño, predice durante la recuperación de sueño, el rebote de sueño MOR. Esto sugiere que el sueño MOR es homeostáticamente regulado y que una presión por sueño MOR se acumula durante su ausencia, por ejemplo: durante vigilia y sueño No-MOR (NMOR). Alternativamente ha sido propuesto que la presión al sueño MOR se acumula exclusivamente durante la ocurrencia de sueño NMOR (Benington, 2002). Para intentar clarificar si la presión al sueño MOR depende exclusivamente de su ausencia o más bien de la expresión del sueño NMOR, se realizaron privaciones de sueño en 15 ratas implantadas con electrodos de registro encefalográfico. Las privaciones fueron parte de 2 protocolos de privación. El primero consistió en 2 horas de privación total de sueño, seguidas de 2 horas de privación selectiva e intermitente de sueño MOR (2T2I). El segundo en 2 horas de privación continua y selectiva de sueño MOR, seguida de 2 horas de privación selectiva e intermitente de sueño MOR. Se logró obtener 2 escenarios diferentes durante la recuperación de sueño de las ratas. Uno con alta presión al sueño NMOR y otro con baja presión. Se realizó un protocolo Control (CL) para descartar posibles efectos inespecíficos producto de las privaciones.

Los datos obtenidos permiten concluir que la presión homeostática al sueño MOR se acumula durante la ausencia de este estado y que frente a una alta presión de sueño MOR, tanto como de sueño NMOR, existe prioridad para descargar la presión del sueño NMOR.

ABSTRACT

In cats, rats and mice, the amounts of rapid eye movement sleep (REMS) lost during a sleep deprivation predicts the subsequent REMS rebound during recovery sleep. This suggests that REMS accumulates in its absence, i.e. during both wakefulness and non-rapid eye movement sleep (NREMS). Conversely, it has been proposed that REMS pressure accumulates exclusively during NREMS (Benington, 2002). To try to clarify if the REMS pressure depends exclusively on its absence or rather on the expression of NREMS, sleep deprivations were realized in 15 rats implanted with electrodes of encephalographic registry. The deprivations were part of 2 protocols of sleep deprivation. The first protocol consisted of 2 hours of total sleep deprivation, followed of 2 hours of selective and intermittent REMS deprivation (2T2I). The second protocol in 2 hours of continuous and selective REMS deprivation followed of 2 hours of selective and intermittent REMS deprivation. It was managed to obtain 2 different scenes during the sleep recovery of the rats. One of them with high pressure to NREMS and another one with low pressure to NREMS. A Control (CL) protocol was realized to discard unspecified effects product of the deprivations.

The collected data allow concluding that the homeostatic REMS pressure is accumulated during the absence of this state and that against a high REMS pressure, as NMORS, priority exists to unload the NREMS pressure.

INTRODUCCIÓN

En el mamífero adulto podemos distinguir tres configuraciones o estados conductuales: la vigilia, el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y el sueño quieto o No-MOR (NMOR) (Zepelin, 1994). Los estados de sueño (NMOR y MOR) podrían ser concebidos como la expresión de dispositivos neurales que optimizan el reposo del individuo. Se ha postulado que la organización temporal del ciclo sueño-vigilia (CSV) es el producto de la articulación de ritmos circadianos y homeostáticos del sueño (Borbély 1982, Daan *et al.*, 1984).

Ante una prolongada privación total de sueño, es característico observar un marcado deterioro en el alerta subjetivo, aumento en la somnolencia, pérdida de capacidad de concentración y perturbación en diversas habilidades relacionadas con la memoria, el aprendizaje y los estados de ánimo, entre otros. Las privaciones extremas realizadas en ratas han derivado en la muerte del animal al cabo de semanas o meses, la cual sólo es evitable si se les permite dormir. En respuesta a la privación se produce un *rebote de sueño*, es decir, un aumento en la cantidad (tiempo en el estado) de sueño total (NMOR más MOR) en las horas y hasta días siguientes a la privación. Esta respuesta de sueño corre asociada a una recuperación de las habilidades y de la percepción del alerta. Esto permite concebir el dormir como un proceso homeostático. El concepto de homeostasis del dormir, presupone la existencia de un mecanismo de retroalimentación que compensa las pérdidas y ganancias de los estados de sueño modificando la propensión hacia esos estados, de acuerdo a su desviación respecto a un nivel de referencia. La respuesta del NMOR ante la privación de sueño es diferente a la del MOR lo que permite suponer la existencia de dos procesos homeostáticos independientes, uno vinculado al NMOR y otro al MOR (Brunner *et al.*, 1990).

Esta Memoria de Título profundiza el conocimiento acerca de la interacción entre los procesos homeostáticos de regulación del sueño MOR y los estados de vigilia y sueño NMOR en la rata. Se diseñó un experimento que incluye dos protocolos que combinan, de manera variable la privación total de sueño y la privación selectiva de sueño MOR, que permitió obtener en cierta fase del día, proporciones conocidas de sueño NMOR y vigilia. Interesaba determinar si la propensión al sueño MOR aumenta en relación a la expresión de un estado particular (sueño NMOR o vigilia) o, alternativamente, si la propensión al sueño MOR depende exclusivamente de la ausencia de sueño MOR, es decir, que la propensión aumenta tanto durante el sueño NMOR como durante la vigilia. Adicionalmente se evaluó el curso temporal de la presión al sueño MOR en función de la expresión del estado durante el rebote post-privación. Para ello, se implantaron crónicamente electrodos de registro polisomnográfico en ratas que fueron monitoreadas a tiempo real, mediante un sistema automatizado de adquisición de datos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. El Ciclo sueño-vigilia (CSV):

El ciclo sueño-vigilia representa una sucesión ordenada de estados conductuales. Estos son tres: la vigilia, el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y el sueño NMOR.

En general el sueño se puede definir como un estado de quietud sostenida en una postura especie específica, acompañado de una reducción en la respuesta al entorno y con rápida reversibilidad al estado de vigilia. La rápida reversibilidad diferencia al sueño de coma y estados hipotérmicos (Ej.: Hibernación). Cambios en el electroencefalograma (EEG) confirman confiablemente cambios de estado y de actividad cerebral. Típicamente, en los mamíferos se distingue una fase de actividad y otra de reposo que se localizan en distintas fases del día, dando lugar a los cronotipos nocturnos, crepuscular o diurno (ver figura 1). Los humanos poseen un cronotipo diurno y el sueño se concentra en la fase de oscuridad, el cual ocurre en un único episodio consolidado, de aproximadamente ocho horas. La rata, por el contrario, despliega un cronotipo nocturno y, en consecuencia, concentran el sueño en las horas de luz. El perfil de la expresión de sueño de la rata es polifásico, es decir, ocurre en numerosos episodios de sueño interrumpidos por períodos breves de vigilia (Zepelin *et al.*, 2005).

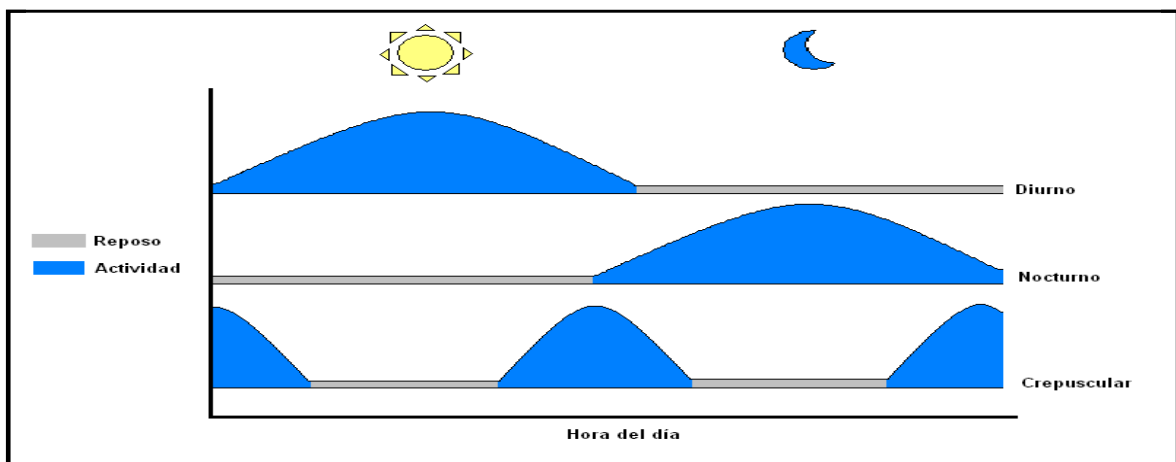


Figura 1. Esquema de los diferentes cronotipos de los mamíferos.

2. Los estados de ciclo sueño-vigilia

Podemos caracterizar los estados conductuales evaluando la modalidad de actividad mental, la capacidad de interacción con el entorno, la actividad eléctrica observada en diversas áreas del encéfalo (a través del electroencefalograma, EEG), el tono muscular (electromiograma, EMG), la regulación neurovegetativa y la motilidad ocular (Steriade, 2005).

La vigilia se caracteriza por actividad motora voluntaria, tono muscular conservado, electroencefalograma (EEG) de alta frecuencia (ondas beta 20-30 Hz; y gamma 30-50 Hz) y baja amplitud, característicos del EEG desincronizado. Los circuitos homeostáticos autonómicos se encuentran plenamente operativos y la temperatura corporal central está estrechamente acotada.

El sueño NMOR se caracteriza por actividad gruesa músculo-esquelética ocasional involuntaria y tono muscular conservado. Los circuitos homeostáticos autonómicos están preservados con predominio parasimpático, y la temperatura corporal central sufre una leve disminución producto del ajuste estado-dependiente del termostato hipotalámico. En el EEG del sueño NMOR se observan las ondas lentas u ondas delta (0.5-4 Hz), característicos del sueño NMOR profundo (o sueño de ondas lentas, *slow wave sleep*), y los grafoelementos denominados husos de sueño, de 10-15 Hz, asociados a NMOR más superficial, o de transición hacia otros estados. Un registro en el que concurren ondas delta y husos de sueño es denominado EEG sincronizado. Durante el NMOR el reporte de actividad onírica es infrecuente.

En los años 50 del siglo XX Nathaniel Kleitman describió la ocurrencia de intervalos de sueño que cursaban con EEG desincronizado (similar al de la vigilia), asociado a movimientos oculares rápidos. Llamativamente, las personas al ser despertadas de este estado reportaban el haber estado soñando. Kleitman bautizó este nuevo estado de sueño como sueño MOR. Los principales signos que permiten identificar el sueño MOR son: reducción de la amplitud del EEG en los rangos de baja frecuencia, supresión del tono muscular (atonía), visible en el EMG y la recurrencia de movimientos oculares rápidos (Kleitman y Aserinsky, 1953). Otra característica de este estado es la pérdida de la termorregulación con lo que la temperatura corporal de los animales tiende a aproximarse a la del ambiente, al igual que los reptiles (Parmeggiani *et al.*, 1977). En los episodios de sueño MOR ocurren períodos de marcada irregularidad en las frecuencias respiratoria y cardiaca, en contraste con lo que ocurre durante el sueño NMOR en el cual las frecuencias se mantienen muy regulares. Estos cambios que ocurren episódicamente durante el sueño MOR han sido llamados períodos de actividad fásica (Siegel, 2005). Una definición más simple del sueño MOR habla de un cerebro activo en un cuerpo inactivo, lo que le da también el nombre de sueño paradójal.

En los mamíferos los estados se expresan de acuerdo a un orden estereotipado. Al llegar el momento del inicio del sueño se transita desde la vigilia al sueño NMOR. Mientras ocurre este estado el sujeto puede volver al estado de vigilia o consolidar un episodio de sueño MOR. Desde el estado de sueño MOR se puede volver a transitar a sueño NMOR o bien, pasar a vigilia. No ocurre transición desde vigilia a sueño MOR en individuos sanos, pero si ocurre en la patología del dormir conocida como narcolepsia (Zorick *et al.*, 1986). En la arquitectura normal del dormir del humano se observa la alternancia periódica (cerca

de 90 minutos) de sueño NMOR y MOR, los llamados ciclos ultradianos de sueño. En la rata los ciclos ultradianos de sueño duran entre 10 y 15 minutos durante la fase de reposo (fase de luz). Además de la diferencia de duración de los ciclos ultradianos entre humanos y ratas, cabe mencionar el contenido de vigilia de los mismos, que en la rata es mayor. La alta cantidad de vigilia intercurrente permite definir el tipo de dormir de la rata como *sueño fragmentario*, como es el caso de la gran mayoría de los mamíferos no-primates.

La organización está vinculada a mecanismos oscilatorios ultradianos (Kleitman, 1982) o alternativamente, a procesos homeostáticos de corto plazo del sueño MOR, como ha sido sugerido en resultados obtenidos en gatos, ratas y humanos (Barbato y Wehr, 1998; Franken, 2002; Ocampo-Garcés y Vivaldi, 2002; Vivaldi *et al.*, 2005).

3. Mecanismos de regulación del ciclo sueño-vigilia (CSV)

Los mecanismos neurales que configuran al conjunto del encéfalo en los tres estados conductuales se manifiestan en dos grandes contextos temporales: el circadiano, que modula la conducta a los predecibles, y biológicamente críticos, cambios que ocurren en el ambiente a lo largo de las 24 horas, y la arquitectura interna del ciclo sueño-vigilia, que se refiere a la sucesión y distribución de los estados y etapas del dormir a lo largo de una noche de sueño. A la inscripción del CSV en estos dos contextos temporales han de corresponder mecanismos que por una parte vinculen aquellas áreas estratégicamente localizadas y conectadas que son responsables de la orquestación de los estados conductuales con los osciladores circadianos y claves ambientales; y, por otra, expliquen el desencadenamiento, mantención y sucesión de los estados, en términos ya sea de interacción entre poblaciones neuronales o de mecanismos homeostáticos intrínsecos a un

generador de estado conductual (Vivaldi, 2002). En suma, la regulación del CSV es el resultado de la interacción de dos procesos: procesos circadianos y homeostáticos (Borbély, 1982; Daan *et al.*, 1984).

3.1 Ritmos circadianos

La actividad y el reposo, el sueño y la vigilia, ocurren en un preciso ciclo de 24 horas que ha sido consecuencia de la adaptación especie-específica al ciclo solar de luz y oscuridad. Estos ciclos son la expresión de mecanismos de cronometría conocidos como ritmos circadianos (Moore, 2007). Una de las funciones primarias de los ritmos circadianos es establecer la predilección nocturna o diurna de la actividad y reposo de las especies, es decir, establecer el cronotipo de los individuos (Smale *et al.*, 2003). De esta forma los ritmos circadianos poseen un alto valor adaptativo al coordinar la conducta del individuo (vigilia, reposo, reproducción, migración, etc.) con la fase más apropiada del ciclo luz-oscuridad (CLO) con respecto a sus necesidades especie-específicas.

3.1.1 Propiedades de los ritmos circadianos

Los ritmos circadianos tienen dos propiedades principales:

- a. Los ritmos son autosostenidos: en ausencia de claves temporales ambientales los ritmos corren libremente (*free-running*) con un período que difiere levemente de 24 horas.
- b. Los ritmos son ajustables (encarrilables): los ritmos circadianos pueden sufrir ajustes por parte de estímulos ambientales. El más potente estímulo ambiental es el CLO. Los ritmos circadianos de un sujeto expuesto a un CLO estable de 24 horas, establecen una relación de fase estable con el amanecer o el atardecer. El proceso de ajuste se denomina encarrilamiento (*entrainment*). La clave temporal ambiental capaz de producir

encarrilamiento se llama *zeitgeber* (del alemán, *dador de tiempo*). De este modo, en condiciones de vida libre, la principal clave ambiental para ajustar la fase de los ritmos circadianos es el ciclo solar (Van Esseveldt *et al.*, 2000).

3.1.2. El reloj circadiano

Existen evidencias de que existe un reloj maestro localizado en hipotálamo cuya función es la mantención del los ritmos circadianos.

1-. La lesión del hipotálamo en la rata produce la pérdida de la ritmicidad en el ciclo actividad y reposo (Ritcher y Thomas, 1965).

2-. El tracto retinohipotalámico conecta específicamente la retina y una región discreta del hipotálamo denominada núcleo supraquiasmático (NSQ) (Moore y Leen, 1972)

3-. Lesiones circunscritas al NSQ originaron la eliminación de diversas conductas circadianas (Stephan y Zucker, 1972).

4. La ritmicidad circadiana fue reestablecida mediante el transplante de neuronas embrionarias de NSQ, en individuos arrítmicos por lesión en el NSQ (Ralph *et al.*, 1990).

5. Las neuronas del NSQ poseen la capacidad de oscilar de manera estable en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Green y Gillette; 1982, Gross y Hendriks, 1982).

Estos datos indicaron al NSQ como el marcapaso o reloj maestro que controla la función circadiana (Moore, 2007) y ser el responsable de conseguir estabilidad y ajuste de fase precisos para las diversas actividades fisiológicas y conductuales asegurando al organismo estar totalmente preparado para la actividad o reposo en el momento correcto (Hastings *et al.*, 2003).

3.1.3 Control circadiano del ciclo sueño vigilia

Humanos y otras especies diurnas exhiben un incremento gradual en la temperatura corporal, cortisol plasmático y el tono simpático, comenzando unas horas antes del despertar, facilitando un rápido cambio desde el sueño a vigilia. En las horas de transición de la fase de actividad a la de reposo, existe también un proceso preparativo del sueño: declina la temperatura corporal, preparación de madrigueras, aumento de la somnolencia subjetiva, etc. (Hastings *et al.*, 2003). Estas conductas se explican por la existencia de eferencias del NSQ que modulan directa o indirectamente diversos centros neurales, entre ellos, los que promueven la vigilia y el sueño. En efecto, la lesión del NSQ elimina la predilección diurna/nocturna de los estados del CSV. Por otro lado, estímulos fóticos, eléctricos o farmacológicos, que afectan la actividad del NSQ, impactan en la organización temporal del CSV.

Los principales elementos del CSV que son blancos de regulación circadiana son la hora de mínima somnolencia, la "ventana prohibida del dormir" y la hora de máxima somnolencia. En el humano, la "ventana prohibida del dormir" corresponde al tercer tercio de la fase de actividad (18-22 horas), y coincide con la acrofase del ritmo de la temperatura corporal. En estas horas, la somnolencia subjetiva está disminuida y latencia al dormir está aumentada. La hora de máxima somnolencia subjetiva y mínima latencia al sueño coincide con el nadir de la temperatura corporal, que en el humano corresponde a las horas finales de la fase de sueño (de 4 a 6 AM). En esta hora ocurre la máxima probabilidad de ocurrencia de sueño MOR en el humano. Es llamativa la posición "paradójica" de las fases de mínima y máxima somnolencia, pues contraintuitivamente, se localizan próximas al inicio de la fase de reposo y de la fase de actividad respectivamente.

3.2 Mecanismos Homeostáticos

El CSV es regulado homeostáticamente. Los mecanismos homeostáticos son activados para compensar las pérdidas o los excesos de sueño, para mantener la necesidad de sueño dentro de un rango "aceptable" (Franken, 2002). Ya sabemos que en ratas lesionadas en el NSQ se observa una pérdida de la organización temporal del ciclo sueño vigilia, sin embargo, no se afecta cuantitativamente la expresión de los estados, ni la magnitud del rebote homeostático, lo que sugiere fuertemente que los mecanismos homeostáticos del dormir son funcional y anatómicamente independientes de los mecanismos circadianos. En ratas lesionadas en el NSQ no se afecta cuantitativamente la expresión de los estados, ni la magnitud del rebote homeostático, sólo se observa una distribución temporal aleatoria de estos estados (Ibuka y Kawamura, 1975).

El aspecto homeostático de la regulación de sueño es evidente durante los experimentos de privación de sueño, donde la pérdida de sueño es seguido por un incremento compensatorio de sueño (rebote de sueño). Existen dos mecanismos homeostáticos independientes para la regulación del sueño: uno compensa las pérdidas del sueño NMOR, y otro las del sueño MOR (Ocampo-Garcés *et al.*, 2000; Franken, 2002).

3.2.1 Homeostasis del sueño NMOR

La expresión y curso temporal del sueño NMOR guarda relación estricta con la acumulación de la presión al sueño durante la vigilia (Borbély y Achermann, 1999). Durante una vigilia prolongada, el aumento de la presión homeostática del sueño NMOR se manifiesta primariamente como somnolencia que favorece la transición al sueño. Una vez establecido, el sueño NMOR es más consolidado (no ocurren interrupciones del

dormir), y tiende a ser un sueño prolongado. Un importante logro fue establecer que no sólo la duración de este estado del sueño, sino también su intensidad puede variar (Borbély y Achermann, 1999). La intensidad del sueño NMOR se hace evidente en la expresión de ondas delta (0.5 a 4 Hz) en el electroencefalograma. El poder espectral de las ondas lentas (banda delta) es proporcional a la duración de la vigilia previa al dormir. El sueño NMOR rico en ondas lentas es denominado *sueño profundo* o *sueño de ondas lentas* (SOL o SWS de *slow wave sleep*), que en el humano corresponde a las etapas III y IV del sueño NMOR. El SOL en los mamíferos se concentra al inicio de la fase del dormir.

La presión homeostática al sueño NMOR acumulada durante la vigilia ha sido denominada como "proceso S", que puede ser descrito como el curso temporal del poder espectral de ondas delta en el sueño posterior a la vigilia (Achermann, 2004). Las evidencias que sustentan la existencia del proceso S pueden resumirse como:

a: Posterior a una prolongación de la vigilia, las ondas delta se ven incrementadas durante la recuperación de sueño. Este aumento es proporcional a la duración de la vigilia, existiendo una relación dosis-respuesta de perfil exponencial creciente saturante.

b: Durante la fase de sueño ocurre una caída exponencial del poder espectral de las ondas delta durante el sueño NMOR, que alcanza su mínimo hacia la segunda mitad de la fase de reposo (Franken, 2002).

c: La interposición de una siesta durante la vigilia interfiere con el crecimiento del proceso S, de manera dosis dependiente (Werth *et al.*, 1996).

El proceso homeostático del sueño NMOR persiste en ausencia de modulación circadiana, como ha sido observado en animales lesionados en el NSQ (Mistlberger *et al.*, 1983) y en protocolos de “desincronización forzada” en humanos (Dijk y Czeisler, 1994).

3.2.2 Homeostasis del sueño MOR

También el sueño MOR es homeostáticamente regulado. Pérdidas de sueño MOR parecen ser primariamente compensadas por incremento de la cantidad tiempo de sueño MOR, como ha sido observado después de privaciones selectivas de sueño MOR o de sueño total en variadas especies de mamíferos. A este incremento sobre un nivel de referencia se le conoce como *rebote de sueño MOR*. Estudios en ratas, gatos y ratones a los cuales se les privó de sueño MOR, demostraron que el incremento de sueño MOR posterior a las privaciones selectivas es proporcional a la pérdida ocurrida durante la privación, lo que sugiere que la cantidad diaria de sueño MOR es finamente regulada (Cerri *et al.*, 2005; Franken 2002). Otro aspecto que confirma el control homeostático del sueño MOR es que mientras se realizan las privaciones selectivas de este estado, es observable un aumento en los intentos por entrar a sueño MOR. Experimentalmente, esto se traduce en un aumento en el número de intervenciones necesarias para suprimir la expresión de sueño MOR (Endo *et al.*, 1997). El curso temporal y el número de los intentos de sueño MOR, permiten una aproximación cuantitativa a la presión de sueño MOR (Ocampo-Garcés *et al.*, 2000). A diferencia de lo que ocurre con el sueño NMOR, no parece haber, en la regulación homeostática de MOR una dimensión de intensidad del rebote homeostático (Roth *et al.*, 1999).

4. El problema: Interacción entre la homeostasis del NMOR y el MOR

Durante un episodio de sueño, las cuotas de ambos estados de sueño, NMOR y MOR, necesitan ser satisfechas. Ambos estados parecen competir por expresarse. Diversas evidencias sugieren que una alta presión selectiva para uno de ellos tiene repercusión en la expresión del otro. El incremento en la presión de sueño MOR secundario a la privación selectiva de éste, afecta significativamente el espectro de poder de ondas delta en el EEG del sueño NMOR. A la inversa, una alta presión a NMOR producida por una vigilia prolongada, o privación total de sueño, puede suprimir transitoriamente la expresión del sueño MOR en ratas y humanos (Franken, 2002).

La interpretación de estos resultados por parte de algunos autores es, que la presión homeostática al sueño MOR está determinada por la expresión de sueño NMOR intercurrente (Benington, 2002). Así la ocurrencia periódica de sueño MOR durante la fase de sueño se llevaría a cabo por un proceso similar al de un reloj de arena, donde la fuerza motriz del proceso es la acumulación de la presión al sueño MOR durante los intervalos de NMOR. Al alcanzar la presión de MOR un valor crítico, esta se descarga durante la ocurrencia de un episodio de sueño MOR, iniciándose un nuevo ciclo (Benington, *et al.* 1994). Alternativamente, la acumulación y descarga de la presión homeostática del sueño MOR podría estar determinada sólo por la ocurrencia del estado, es decir, la presión aumenta en ausencia de MOR y se descarga durante los episodios de dicho estado (Endo *et al.* 1997; Franken, 2002, Ocampo-Garcés *et al.*, 2000, Vivaldi *et al.*, 1994^a).

Interesaba evaluar el proceso homeostático del sueño MOR, es decir, (i) el curso temporal de las transiciones al sueño MOR, (ii) la cantidad del sueño MOR y (iii) la duración de los

episodios de sueño MOR en condiciones de alta y baja presión homeostática del sueño NMOR. Si el proceso homeostático del sueño MOR depende exclusivamente de ciclos expresión-ausencia de sueño MOR, éste debe estar operativo independientemente del estado homeostático del sueño NMOR. Alternativamente, la expresión del sueño NMOR afectará el curso temporal de los parámetros que caracterizan la homeostasis del MOR.

HIPÓTESIS

La presión homeostática al sueño MOR se acumula durante la vigilia y el sueño NMOR.

Si la hipótesis es verdadera:

1. Los intentos de sueño MOR durante la privación serán proporcionales al tiempo acumulado sin sueño MOR.
2. El rebote del sueño MOR tras una privación total del sueño o selectiva de sueño MOR serán semejantes.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el curso temporal del rebote de sueño MOR, en su interacción con la expresión intercurrente de vigilia, sueño NMOR y sueño MOR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-. Evaluar la interferencia del sueño de ondas lentas del NMOR con el rebote de sueño MOR.
- 2-. Evaluar la interferencia del sueño de ondas lentas del NMOR en el curso temporal de las transiciones del sueño MOR durante el rebote post-privación.
- 3-. Determinar la duración y frecuencia de los episodios de sueño MOR durante el rebote post-privación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Se emplearon 15 ratas macho Sprague-Dawley entre 250 y 300 gr. de peso.

Procedimiento quirúrgico: Previo a la cirugía, las ratas fueron anestesiadas con xilazina (1 mg/100gr) y ketamina (8mg/100gr) (Gvilia *et al.*, 2006) vía intraperitoneal, una vez alcanzado el plano anestésico se les afeitó la parte superior del cráneo con una maquina de afeitar desechable y puestas en un estereotáxico para su fijación durante la cirugía. Se aplicó povidona yodada sobre el área previamente depilada y se realizó una incisión en la línea media de la superficie del cráneo con un mango de bisturí N° 3 con hoja desechable N° 10, el área de la incisión se aumentó con tijera Mayo y los tejidos expuestos sobre la calota fueron degradados con agua oxigenada hasta lograr identificar bregma y lambda (bregma: cisura que divide hueso frontal de parietal; lambda: cisura que divide hueso parietal de occipital). A partir de los dos puntos mencionados se encontraron 4 puntos realizando las siguientes medidas:

Antero posterior	Lateral
Electrodo N° 1: 2,5 mm. Respecto de bregma	-4,5 mm.
Electrodo N° 2: 2,5 mm. Respecto de bregma	4,5 mm.
Electrodo N° 3: 7,5 mm. Respecto de bregma	-1,5 mm.
Electrodo N° 4: 2 mm. Respecto de lambda	0 mm.

Los puntos se marcaron y se perforaron con un taladro eléctrico y broca de 44 mm de largo, 2.3 mm de diámetro (cuerpo) y 0.9 mm de diámetro (cabeza). En los agujeros realizados se atornillaron 4 electrodos epidurales (tornillos de 4,7 mm de largo y 1,17 mm de diámetro, soldados a una porción de cable de acero inoxidable, aislado con teflón) para obtener el registro electroencefalográfico. Los electrodos se localizaron de tal forma de

optimizar la detección de actividad delta y husos de sueño (trenes de ondas de 10-15 Hz), (electrodos Nº 1 y 2); y la detección de actividad theta (ondas de 4 a 8 Hz) (electrodos Nº 3 y 4). Puestos los electrodos se hizo un pequeño corte en la piel, a continuación de la incisión hecha sobre el cráneo, hacia caudal para exponer los músculos dorsales del cuello. Con una aguja de sutura (simple, curva y atraumática) se insertaron 4 trozos de alambre con teflón a modo de electrodos musculares para obtener el registro electromiográfico (ver figura 2). El procedimiento quirúrgico está aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Medicina, número de protocolo 022A.

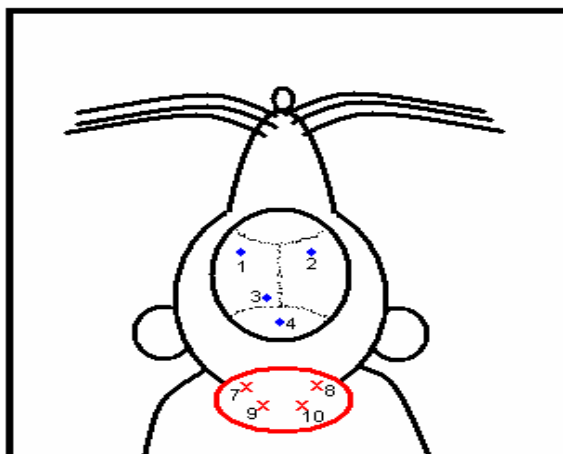


Figura 2. Esquema de la porción anterior de la rata, vista dorso ventral y de la ubicación de los electrodos de registro corticales y musculares.

Luego los electrodos fueron soldados a un conector hembra de 10 pines con soldadura y ácido ortofosfórico y todo fue recubierto con acrílico dental para dar más estabilidad y protección al implante.

Como medida de profilaxis se aplicó enrofloxacino (0,16 mg/100gr.) y como analgésico y antiinflamatorio ketoprofeno (0,33 mg/100gr.).

Las ratas tuvieron un período post-operatorio de 10 días, los animales fueron confinados en jaulas de 30x30x25 cm. ubicadas dentro de cámaras de aislamiento de 60x60x70, y

mantenidos bajo un horario luz-oscuridad 12:12, temperatura ambiente de 21-24°C, con agua y alimento *ad libitum*.

Registro y adquisición de datos: Luego de al menos 10 días post implante de electrodos, los animales se conectaron mediante un cable con un conector macho a cada extremo, a un conmutador sostenido por un brazo oscilante contrabalanceado que permitió el libre desplazamiento del animal por la jaula. Dos días fueron considerados para adaptación, estabilización del registro y también encontrar las mejores derivaciones.

La señal fue amplificada y filtrada, un sistema automatizado de adquisición de datos basado en LabWindows registró, cuantificó y almacenó de manera continua el EEG y EMG en ventanas de 15 segundos (épocas diagnósticas) para el posterior procesamiento *off-line* (ver figura 3).

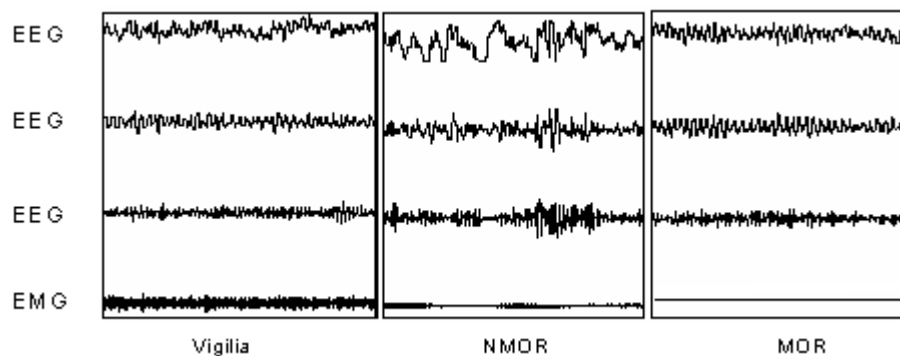


Figura 3. Diagnostico polisomnográfico de estado a través de la visualización del EEG y el EMG.

Protocolo experimental (ver figuras 4 y 5)

Terminado el período de adaptación a las condiciones de registro en cámara aislada, las ratas fueron sometidas al siguiente protocolo experimental:

Las ratas se registraron durante 2 días (días basales) y en días posteriores sometidas a dos diferentes protocolos de privación de sueño y un protocolo control. Los protocolos de privación de sueño consistían en períodos de privación de sueño total o selectiva de sueño MOR, seguidos de períodos de privación intermitente y selectiva de sueño MOR.

Los protocolos de privación y control estuvieron separados al menos por un día de descanso (ver figura 4) y se extendieron durante 4 horas, comenzando a la hora 4. Por convención el horario de los protocolos fue referido a la hora de encendido de la luz (Hora 0) que corresponde a la hora local 8:00 AM.

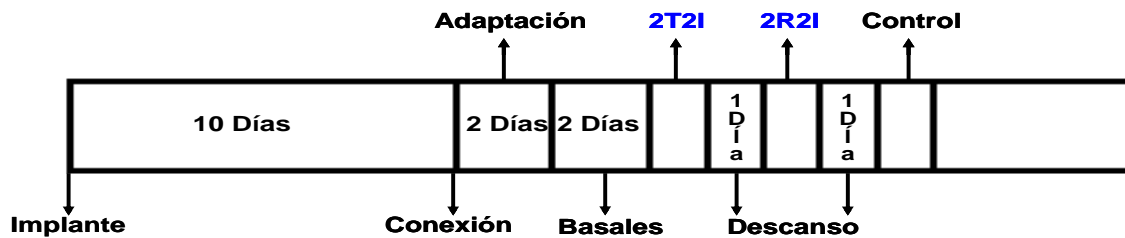


Figura 4. Esquema de los manejos realizados a las ratas posteriores a la cirugía.

El primer protocolo fue el **2T2I** que consistía en dos horas continuas de privación total de sueño activo y a continuación 2 horas de privación intermitente y selectiva de sueño MOR.

El segundo el **2R2I**, dos horas de privación selectiva de sueño MOR y a continuación 2 horas de privación intermitente y selectiva de MOR. La privación intermitente consistió en la alternancia de 4 períodos sucesivos de 10 minutos sin intervención (ventana permisiva para MOR) y 20 minutos de privación intermitente de MOR (ventana de privación de MOR). Para mejor entendimiento ver la figura 5.

Protocolo Control, **CL**: durante el control se replicó el número de intervenciones aplicadas a la rata en el protocolo 2R2I. Para ello, se dividió el número total de intervenciones documentadas por el tiempo total de privación selectiva de sueño MOR (200 minutos) obteniéndose el intervalo inter-estímulos. Las intervenciones se distribuyeron de manera continua durante 2 horas a partir de la hora 4, y en las horas 6 y 7 se repartieron en ventanas correspondientes a la privación intermitente.

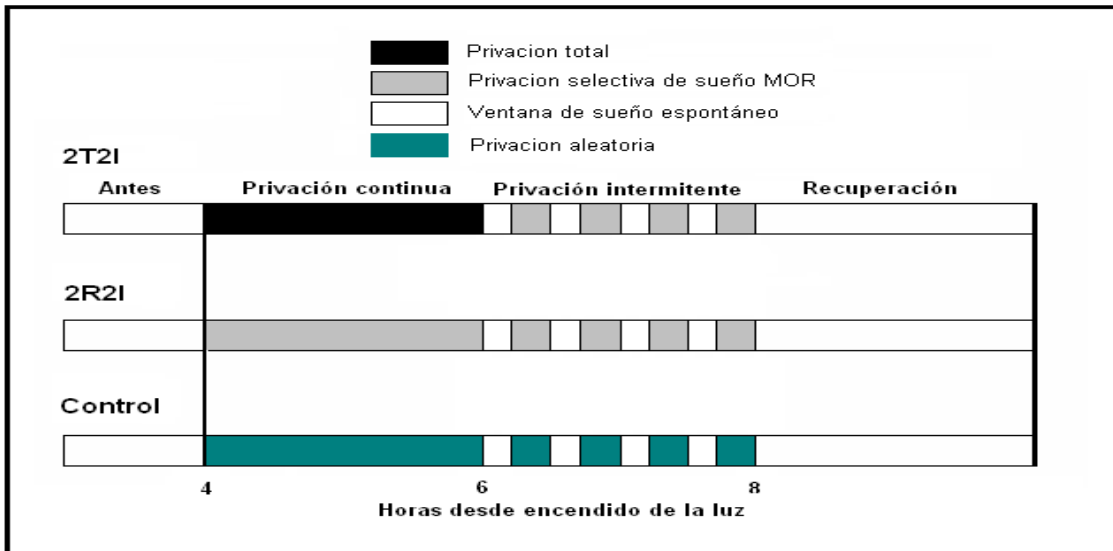


Figura 5. Tipos de privación de sueño y su distribución, desde el encendido de la luz, durante los protocolos 2T2I, 2R2I y el control.

Las privaciones de sueño se realizaron bajo monitoreo polisomnográfico del animal (ver figura 3) y se llevaron a cabo mediante movimientos suaves de jaula. La privación total de sueño se practicó al momento de observar transiciones desde la vigilia al sueño NMOR (emergencia de ondas delta o sigma polisomnográficas). Para facilitar la privación total de sueño se introdujeron objetos o se practicó el aseo de la jaula durante el período de privación total. La privación selectiva de sueño MOR consistió en intervenir cada vez que el animal transita de sueño NMOR a sueño MOR (aumento de husos de sueño y ondas theta en el EEG; y disminución del tono postural y el EMG). Las intervenciones fueron cuidadosamente documentadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables de interés fueron: 1) el tiempo en cada estado de sueño (NMOR y MOR), 2) el poder espectral de ondas delta (PEOD) en el sueño NMOR (obtenido mediante transformada rápida de Fourier (FFT) a partir del EEG), y, 3) parámetros de la respuesta homeostática de sueño MOR: índice de transiciones (IT), tasa de consolidación, tiempo en sueño MOR/tiempo sueño total (MOR/TST) y eficiencia de rebote (Ocampo-Garcés *et al.*, 2000; Ocampo-Garcés y Vivaldi, 2002; Franken, 2002).

El índice de transiciones (IT) es una medida objetiva de probabilidad de transición de sueño NMOR a MOR, y ha sido empleado como un estimador de la presión homeostática del sueño MOR (Ocampo-Garcés y Vivaldi 2002). El IT se calcula en base al número de intentos de la rata (numerador) dividido por el tiempo total que la rata permanece en sueño NMOR (expresado en épocas de 15 segundos) obtenido en una ventana discreta de tiempo de registro (ver figura 16). El valor se expresa como número de transiciones al MOR por 10 minutos de sueño NMOR, multiplicando por 40 la razón obtenida (40 épocas de 15 segundos corresponden a 10 minutos). El MOR/TST es un porcentaje que se estima mediante la relación: tiempo en sueño MOR / (tiempo en sueño MOR + tiempo en sueño NMOR)*100.

Los valores de línea de base corresponden al promedio obtenido en dos días de registro no-perturbados. En el caso del PEOD, los valores presentados corresponden al valor integrado de la banda delta: 0.5 a 4 Hz, obtenido mediante FFT (ventanas de 2 segundos, en la banda de 0.5 a 30 Hz, con intervalos de 0.5 Hz) a partir del registro obtenido durante el sueño NMOR. El PEOD es posteriormente colapsado en un valor que representa

10 minutos de registro, obteniéndose una serie temporal de 72 puntos que cubren las 12 horas de la fase de luz. El valor de cada punto de la serie es expresado como porcentaje del valor promedio obtenido en las dos primeras horas de registro desde encendido de la luz del día, valor que corresponde al 100%, del día experimental (ver figuras 14 y 15).

En el análisis del curso temporal con resolución temporal de una hora, se empleó análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías para los factores hora desde encendido de la luz (12 niveles), factor protocolo (4 niveles) y la interacción de ambos factores (hora * protocolo). Cuando el modelo global y la interacción *protocolo * hora* alcanzó la significación estadística se realizó la comparación mediante test de Student pareado para la condición experimental respecto de su línea de base en cada hora experimental. Para determinar el efecto específico de cada tipo de privación se compararon los protocolos 2T2I y 2R2I mediante test de Student pareado. Para evaluar efectos inespecíficos de la estimulación de la rata mediante la agitación suave, se compararon los protocolos 2R2I con la condición control mediante test de Student pareado. Se estableció como nivel crítico de significancia estadística un $p < 0.05$. En el análisis de las ventanas de 10 minutos de sueño espontáneo, se empleó el ANOVA de 2 vías para los factores *ventana* (4 niveles), factor *protocolo* (4 niveles) y la interacción de ambos factores (*ventana * protocolo*).

RESULTADOS

1. Descripción de un caso representativo

La siguiente figura muestra las principales variables electrofisiológicas analizadas.

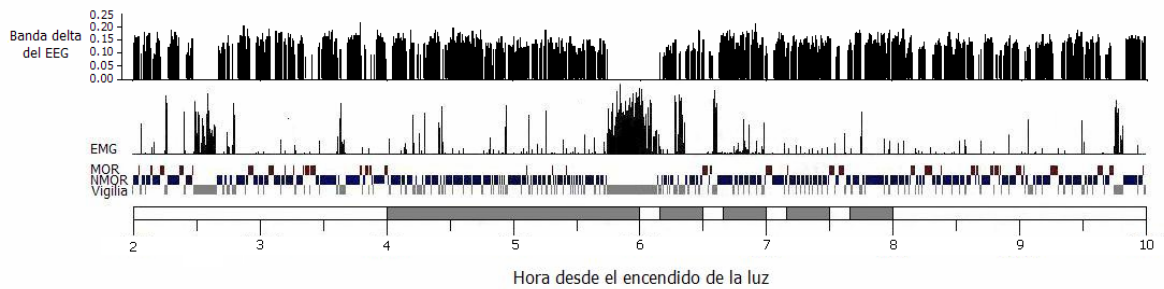


Figura 6. Variables electrofisiológicas de la rata n° 3 durante el protocolo 2R2I. En la parte inferior de la figura se muestra el horario desde el encendido de la luz, en gris se indican los períodos de privación selectiva de sueño MOR. Sobre la barra de horario, se encuentra el hipnograma de la rata. Se presenta el registro electromiográfico y el espectro de poder de la banda delta del sueño NMOR obtenido con una resolución temporal de 15 segundos.

La distribución de los estados conductuales manifestados en el hipnograma dan cuenta del perfil de expresión de sueño polifásico o fragmentario característico de los roedores. El período presentado corresponde a las horas centrales de la fase de reposo, lo que explica el predominio de los estados de sueño. Es importante señalar, como se aprecia en el hipnograma, que durante el período de privación continua de sueño MOR (desde hora 4 a 6) no se impide la manifestación del sueño NMOR. Es apreciable como la rata aprovecha las cortas ventanas de sueño espontáneo (10 minutos), durante la privación intermitente, para expresar sueño MOR.

Las figuras que siguen a continuación muestran datos de una rata representativa del experimento (rata Nº 3). Se indica con una resolución temporal de una hora, la cantidad de tiempo obtenida para cada estado, antes (horas 0 a 3), durante (horas 4 a 7) y después (8 a 11) de la aplicación de los protocolos de privación (2T2I, 2R2I y control). Superpuestos se muestran los valores de línea de base (línea continua y círculos llenos), que corresponde al promedio aritmético de los dos días basales. En la abscisa inferior de cada gráfico se indica las horas de aplicación de los correspondientes protocolos de privación (barra negra indica privación total de sueño, barra gris indica privación selectiva continua de sueño MOR y barra blanca las horas de privación intermitente selectiva de sueño MOR) y de control.

En la figura 7 es destacable el aumento en la cantidad de tiempo del estado de vigilia durante las horas 4 y 5 en el protocolo 2T2I como resultado de las 2 horas de privación total de sueño, en contraste a lo observado en los protocolos 2R2I y CL.

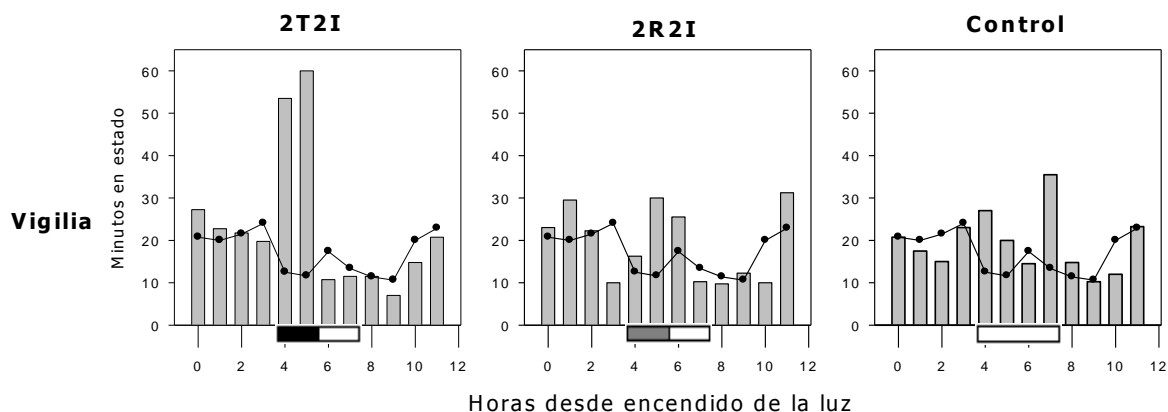


Figura 7. Minutos en el estado de vigilia (en barras) durante los protocolos 2T2I, 2R2I y la condición Control, con resolución de una hora. Superpuesto en líneas con círculos negros están representados los datos del estado de vigilia durante LB.

A la inversa, el sueño NMOR (ver figura 8) es prácticamente eliminado durante las horas 4 y 5 del protocolo 2T2I y en las horas posteriores a 2T (horas 6-7) ocurre una consolidación del sueño NMOR, mientras en la condición 2R2I no parece ser afectado por la privación selectiva y continua del sueño MOR.

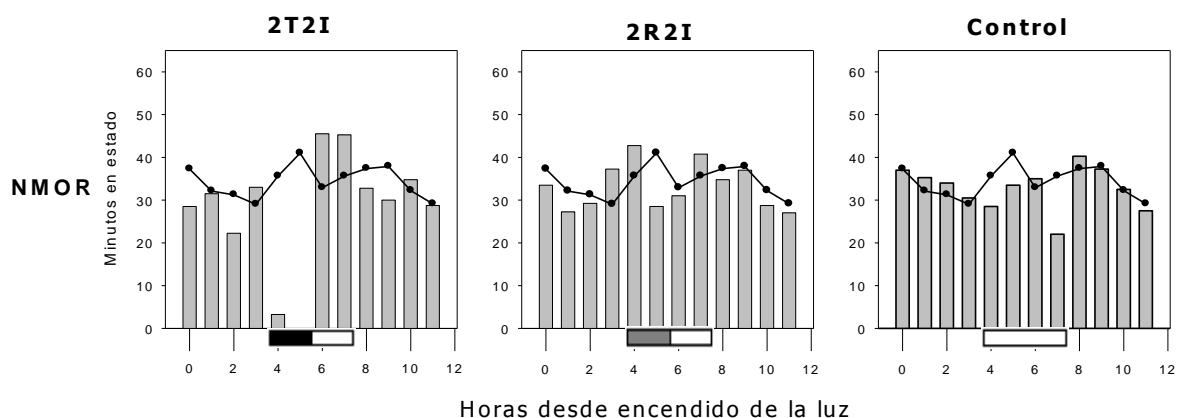


Figura 8. Minutos en el estado de sueño NMOR (en barras) durante los protocolos 2T2I, 2R2I y la condición Control, con resolución de una hora. Superpuesto en líneas con círculos negros están representados los datos del estado de sueño NMOR durante LB.

La expresión de sueño MOR es afectada de manera similar por la aplicación de los protocolos 2T2I y 2R2I en las horas 4 y 5 (ver figura 9). Durante la privación intermitente, se observa la expresión incipiente de sueño MOR en ambos protocolos, que corresponde al que es capaz de expresar durante los 20 minutos de sueño espontáneo durante las horas 6 y 7. En las horas posteriores a la privación (desde la hora 8) es manifiesto el aumento de sueño MOR por sobre los niveles de línea de base en las condiciones 2T2I y 2R2I (rebote de sueño MOR). En la condición CL es posible distinguir un leve aumento por sobre LB.

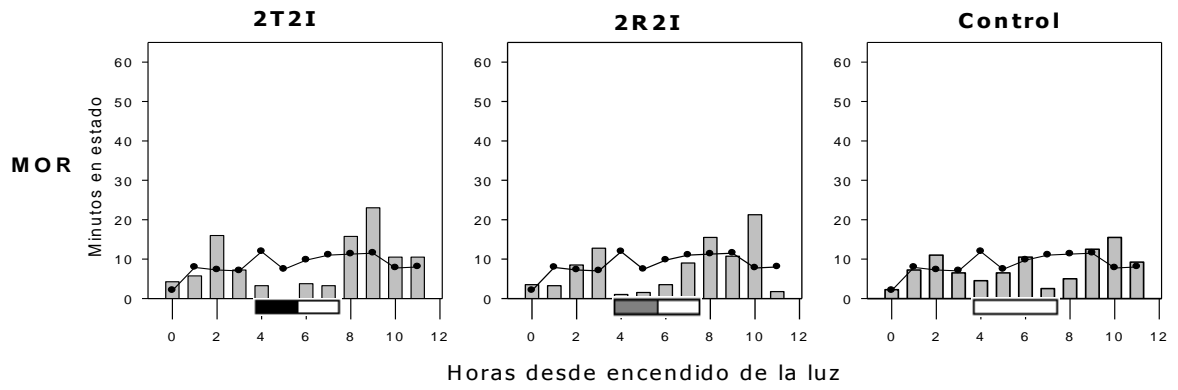


Figura 9. Minutos en el estado de sueño MOR (en barras) durante los protocolos 2T2I, 2R2I y la condición Control, con resolución de una hora. Superpuesto en líneas con círculos negros están representados los datos del estado de sueño MOR durante LB.

2. Perfil temporal de la respuesta de los estados

La tabla I presenta los minutos en los estados de sueño y en la relación MOR/TST en las tres fases (sextantes) del experimento. Cada sextante corresponde a 4 horas de registro, correspondiendo el sextante 0 a las horas previas a la privación (horas 0 a 3), el sextante 1 a las horas durante la privación (horas 4 a 7) y el sextante 2 a las horas de recuperación post-privación. El Análisis de varianza de 2 factores (sextante y protocolo) demuestra interacción de ambos factores en las tres variables estudiadas.

Tabla I.

Estado	sextante	LB n=15		2t2i n=15		2r2i n=15		CI n=11	
		promedio	E.S	promedio	E.S	promedio	E.S	promedio	E.S
NMOR	0	120,7	4,0	117,9	4,7	120,8	4,5	120,5	5,4
	1	125,7	3,5	74,8	2,9 *	119,5	6,4 #	116,3	5,6 *
	2	115,8	5,2	118,4	4,9	118,6	6,1	120,8	6,2
MOR	0	15,7	1,1	15,0	1,9	16,8	1,8	15,0	2,2
	1	23,8	2,1	8,4	1,2 *	11,8	1,4 * #	22,4	1,7 &
	2	25,2	2,7	37,1	3,2 *	35,7	2,5 *	31,6	2,7 *&
MOR/TST	0	11,5	0,7	11,2	1,2	12,0	1,1	11,1	1,6
	1	15,6	1,0	10,0	1,5 *	9,1	1,1 *	16,2	1,0 &
	2	17,7	1,5	23,6	1,5 *	23,3	1,4 *	20,7	1,5 * %

Diferencias significativas (test de Student pareado, $p < 0.05$): * respecto de LB; # 2R2I respecto a 2T2I; & 2R2I respecto a control (CI); % señala tendencia ($0.1 > p > 0.05$) en la diferencia de 2R2I respecto a CI

El test de Student pareado entre cada protocolo y la condición LB muestra una disminución global del 40% del sueño NMOR durante el sextante de privación en el protocolo 2T2I, mientras el estado no resultó afectado en el mismo sextante en el protocolo 2R2I, existiendo una diferencia significativa entre 2T2I y 2R2I en la expresión de NMOR en ese cuadrante. En el protocolo control se observa una leve disminución (7.5%) del sueño NMOR durante este sextante. El test pareado muestra una disminución del 65% y del 50% en la expresión del sueño MOR durante las horas de privación (sextante 1) en los protocolos 2T2I y 2R2I respectivamente, comparados con LB. La

pérdida en sueño MOR fue significativamente mayor en 2T2I que 2R2I en el sextante 1. El sueño MOR durante el sextante 1 del protocolo control alcanza valores comparables a los de LB y significativamente mayores que 2R2I. Durante las horas de rebote (sextante 2), el sueño MOR despliega una respuesta homeostática robusta en los protocolos 2T2I y 2R2I (47 y 41% respectivamente) respecto a línea de base. El protocolo control muestra un aumento del 25% del sueño MOR respecto a LB, siendo significativamente menor que la obtenida en 2R2I.

El valor observado en los protocolos 2T2I 2R2I para la variable MOR/TST alcanza una diferencia significativa respecto de LB. El protocolo control exhibe un aumento en MOR/TST de 3% respecto de LB y tiende a ser menor que el valor observado en el protocolo 2R2I ($p=0.089$).

2.1 Respuesta del sueño NMOR

En la figura 10 se muestra el curso temporal del sueño NMOR para la condición línea de base y los protocolos 2T2I, 2R2I y control.

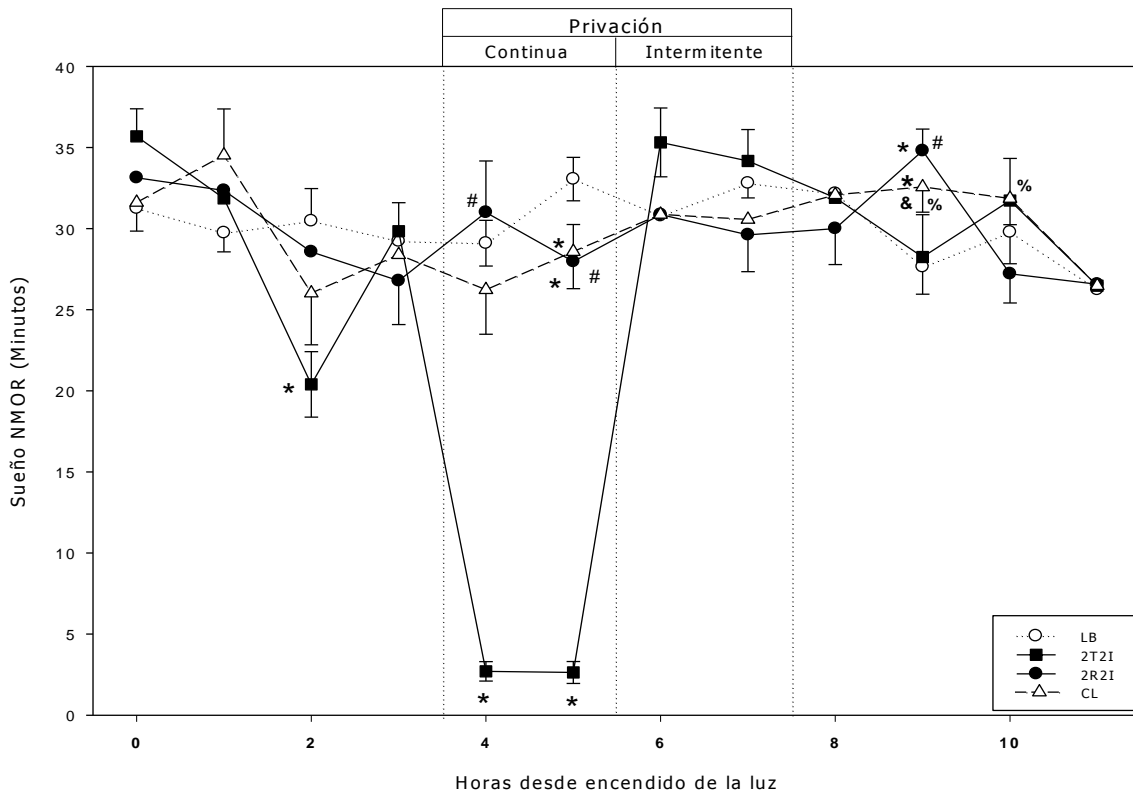


Figura 10. Curso temporal de la expresión del sueño NMOR en las condiciones LB, 2T2I, 2R2I y Control, obtenidos en 15 animales (promedios \pm error estándar), presentados con una resolución temporal de 1 hora. Diferencias significativas (test de Student pareado, $p < 0.05$): * respecto de LB; # 2R2I respecto a 2T2I; & 2R2I respecto a control (CL); % señala tendencia ($0.1 > p > 0.05$) en la diferencia de 2R2I respecto a CL.

El ANOVA de 2 vías (factores protocolo y hora desde encendido de la luz, e interacción de protocolo y hora) resultó estadísticamente significativo ($F=10.2$; $p < 0.001$; grados de libertad = 47), obteniéndose para la interacción de hora y protocolo un $F=8.71$ ($p < 0.001$, grados de libertad = 33). La comparación múltiple demuestra que, como se esperaba, el protocolo 2T2I es diferente de los demás protocolos en las horas de aplicación de la privación total de sueño (hora 4 y 5), donde se observa una disminución del 91% en la

expresión del sueño NMOR respecto de las horas correspondientes en LB. En el horario correspondiente el sueño NMOR no se ve afectado por el protocolo 2R2I ni por la condición control. Durante la privación intermitente y selectiva de sueño MOR (horas 6 y 7) la ocurrencia del sueño NMOR no se vio afectada.

2.2 Respuesta del sueño MOR

En la figura 11 se muestra el curso temporal del sueño MOR para la condición línea de base y los protocolos 2T2I, 2R2I y control.

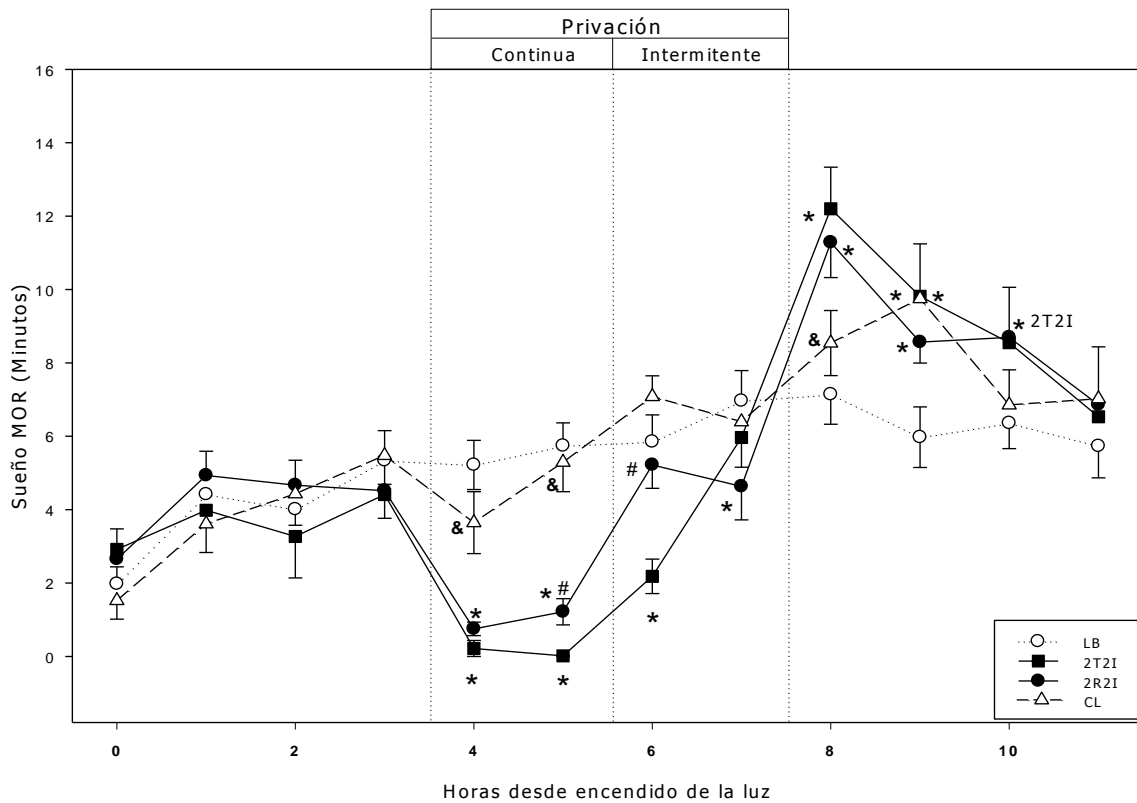


Figura 11. Curso temporal de la expresión del sueño MOR en las condiciones LB, 2T2I, 2R2I y Control, obtenidos en 15 animales (promedios \pm error estándar), presentados con una resolución temporal de 1 hora. Diferencias significativas (test de Student pareado, $p < 0.05$): * respecto de LB; # 2R2I respecto a 2T2I; & 2R2I respecto a control (CL).

El ANOVA de 2 vías resultó estadísticamente significativo ($F=11.64$; $p < 0.001$; grados de libertad= 47), obteniéndose para la interacción de hora y protocolo un $F=4.34$ ($p < 0.001$,

con 33 grados de libertad). La comparación múltiple demuestra que durante la privación continua (hora 4 y 5) el sueño MOR es afectado en los protocolos 2T2I y 2R2I respecto de las condiciones LB y CL. El sueño MOR perdido fue de 91% y 82% en las condiciones 2T2I y 2R2I respectivamente. Las pérdidas de sueño MOR fueron significativamente mayores en al hora 5 para el protocolo 2T2I respecto a 2R2I. Durante la privación intermitente y selectiva de sueño MOR (horas 6 y 7) se observa una divergencia en el curso temporal de expresión del estado en las condiciones 2T2I y 2R2I. En la condición 2R2I se observa un aumento en el tiempo de MOR, que alcanza valores similares a las condiciones LB y CL durante la hora 6. Por el contrario, el sueño MOR observado en el protocolo 2T2I en la hora 6 es diferente de los otros tres protocolos, retornando a valores comparables a línea de base sólo durante hora 7. Cabe recordar que el tiempo permitido para la ocurrencia de sueño MOR es de 20 minutos por hora en las horas 6 y 7 de las condiciones 2T2I y 2R2I, lo que significa que el sueño MOR está sobrerrepresentado en las ventanas de sueño espontáneo (ver figura 11). En las horas posteriores a la privación, se observa una respuesta robusta de rebote en los protocolos 2T2I y 2R2I. 2T2I manifiesta un aumento significativo respecto a LB en las horas 8, 9 y 10. 2R2I rebota entre las horas 8 y 9. 2R2I muestra una diferencia significativa respecto a la condición control en la hora 8. Finalmente, la condición control muestra un aumento de sueño MOR respecto de LB en la hora 9 sugiriendo una respuesta inespecífica de aumento de MOR en respuesta al procedimiento de privación.

2.3 Respuesta de sueño MOR en función del sueño total

Debido a que la expresión del sueño MOR esta asociada a la expresión del sueño NMOR, la razón Sueño MOR/Sueño total es usada como un indicador sensible de la respuesta homeostática del sueño MOR, porque descarta el "efecto de arrastre" de sueño NMOR sobre el MOR (ver figura 12).

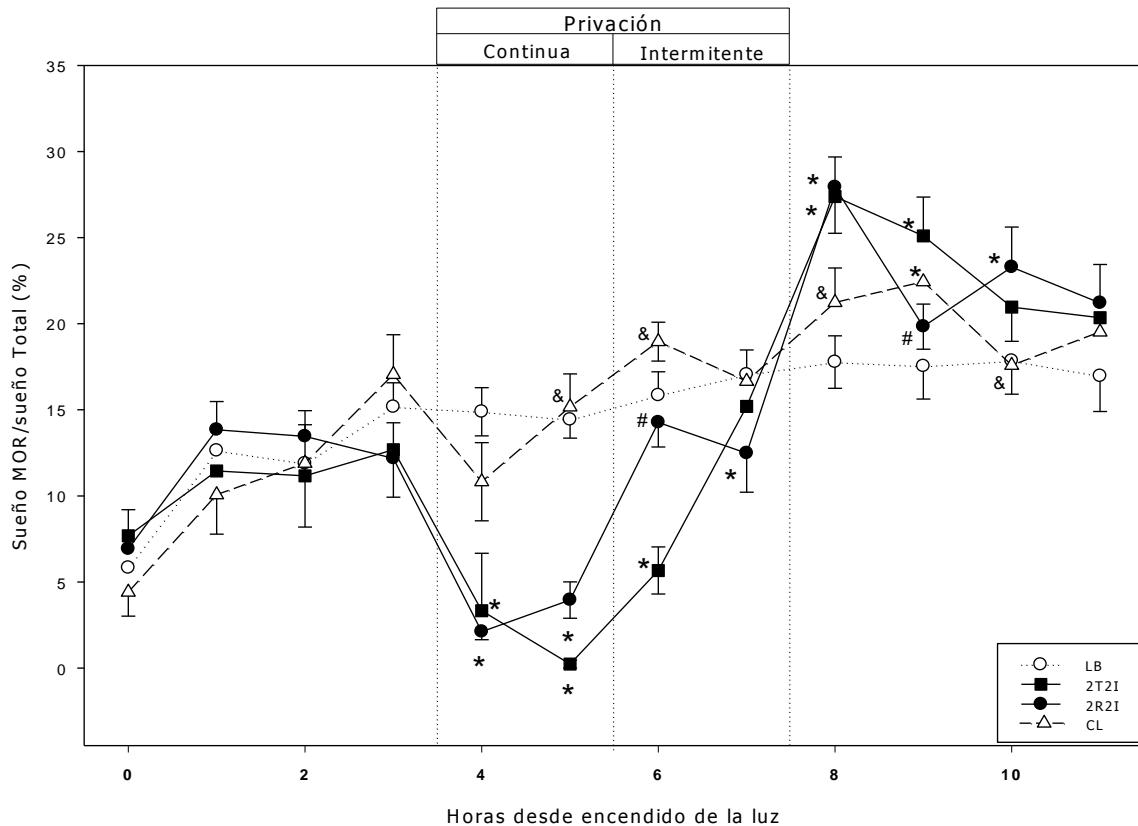


Figura 12. Magnitud de la razón Sueño MOR/Sueño total (%) en las condiciones LB, 2T2I, 2R2I y Control, obtenidos en 15 animales (promedios \pm error estándar), presentados con una resolución temporal de 1 hora. Diferencias significativas (test de Student pareado, $p < 0.05$): * respecto de LB; # 2R2I respecto a 2T2I; & 2R2I respecto a control (C).

El ANOVA de 2 vías resultó estadísticamente significativo ($F=12.8$; $p < 0.001$; grados de libertad= 47), obteniéndose para la interacción de hora y protocolo un $F=4.71$ ($p < 0.001$, con 33 grados de libertad).

La variable MOR/TST es particularmente informativa en los intervalos de recuperación, en el caso de la figura 12, entre las horas 8 y 11. En ese intervalo 2T2I demuestra una

diferencia consistente respecto de LB entre las horas 8 y 9, y respecto de 2R2I en la hora 9. 2R2I exhibe diferencias significativas con LB y condición control en las horas 8 y 10.

3 Respuesta de los estados durante las ventanas de sueño espontáneo:

En la figura 13 se muestra la expresión de los estados sueño MOR, sueño NMOR expresados en minutos y la relación Sueño MOR/Sueño total, durante las cuatro ventanas de 10 minutos de sueño espontáneo de la privación intermitente en las horas 6 y 7 de los protocolos 2T2I y 2R2I y control. Los valores de línea de base se ajustaron a la ventana de 10 minutos mediante la siguiente operación: para minimizar la variabilidad de la línea de base esperable en una ventana de tiempo estrecha (10 minutos) la línea de base del sueño NMOR y del sueño MOR se estimó multiplicando por 1/6 los valores respectivos acumulados en las horas 6 y 7 de los días LB. El valor de MOR/TST se estimó directamente de los valores antes indicados.

La serie de datos correspondientes a cada figura fue objeto de un ANOVA de 2 vías (factores *protocolo* y *ventana* e interacción de *protocolo * ventana*). Cuando el modelo global y la interacción *protocolo * ventana* alcanzó la significación estadística ($p < 0.05$) se realizó la comparación mediante test de Student pareado para cada condición experimental respecto de su línea de base en cada ventana experimental. Adicionalmente se compararon los protocolos 2T2I y 2R2I, y el protocolo 2R2I y el protocolo control.

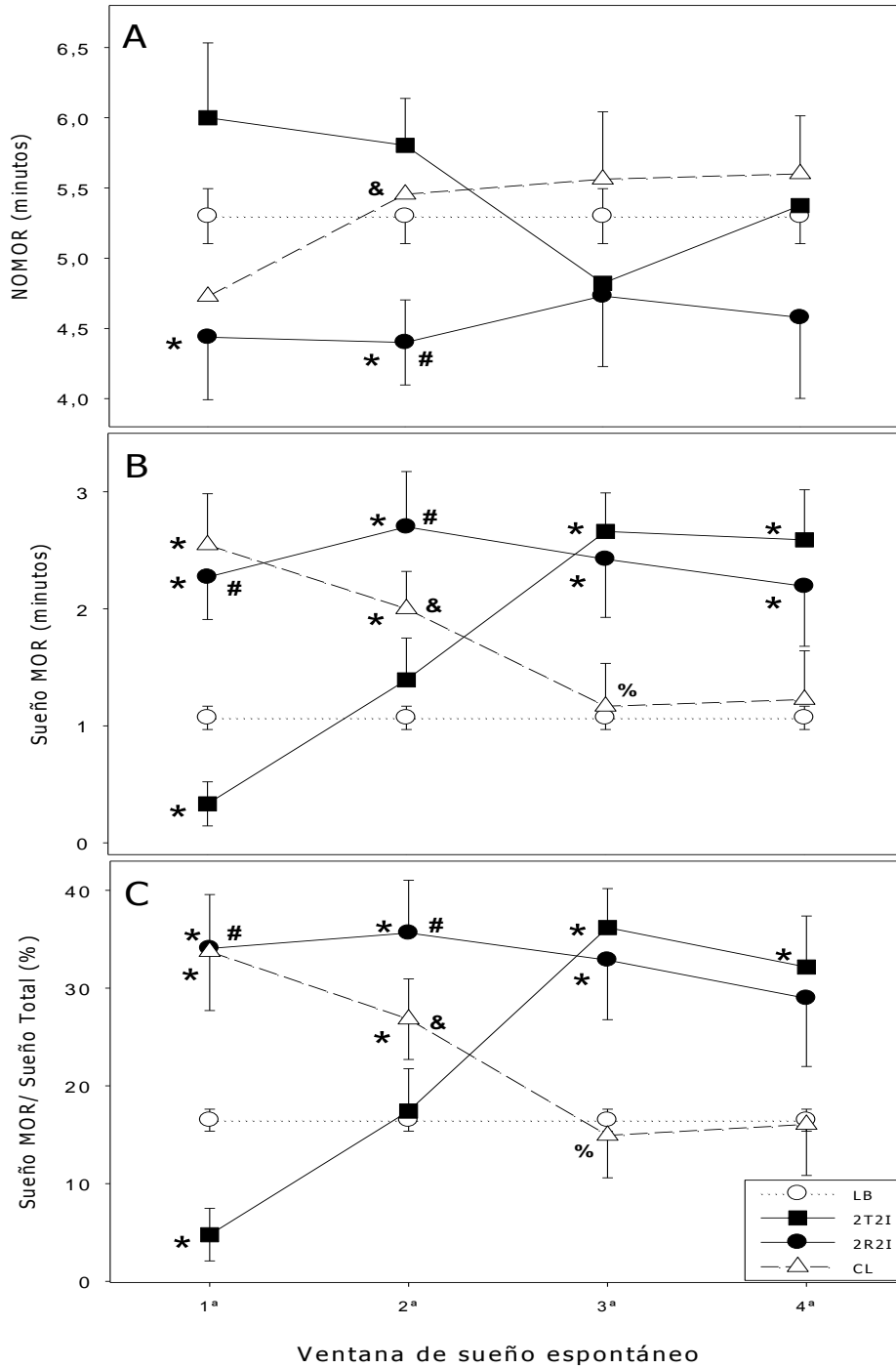


Figura 13. Expresión de los estados sueño MOR (figura A), sueño NMOR (figura B) expresados en minutos y la relación Sueño MOR/Sueño total (figura C), durante las cuatro ventanas de 10 minutos de sueño espontáneo de la privación intermitente en las horas 6 y 7 de los protocolos 2T2I y 2R2I y control. Los datos fueron obtenidos en 15 animales (promedios \pm error estándar). Diferencias significativas (test de Student pareado, $p < 0.05$): * respecto de LB; # 2R2I respecto a 2T2I; & 2R2I respecto a control (CI); % señala tendencia ($0.1 > p > 0.05$) en la diferencia de 2R2I respecto a CI.

3.1 Respuesta del sueño NMOR

El modelo general de ANOVA de 2 vías (factores protocolo y ventana e interacción de ventana * protocolo) no resultó estadísticamente significativo ($F=1.52$; $p=0.09$; grados de libertad =15). El factor *protocolo* alcanza la significatividad estadística ($F=4.65$; $p=0.004$; grados de libertad =3). El test de student para factor *protocolo* demuestra que la cantidad de sueño NMOR obtenidos en las 2 primeras ventanas de sueño espontáneo del protocolo 2R2I es significativamente menor que el de los demás protocolos.

3.2 Respuesta del sueño MOR

El ANOVA de 2 vías resultó estadísticamente significativo ($F=5.29$; $p<0.001$; grados de libertad= 15), obteniéndose para la interacción de *ventana * protocolo* un $F=4.76$ ($p<0.001$, con 9 grados de libertad). En la condición 2T2I se observa que en la primera ventana hay una disminución del sueño MOR respecto del esperado según la LB, para posteriormente aumentar y alcanzar valores superiores a esta referencia en las ventanas 3 y 4. Por su parte 2R2I muestra valores mayores en 2 veces al de línea de base en todas las ventanas. La condición control (CL) exhibe un patrón inverso a 2T2I, con aumento del sueño MOR en las ventanas 1 y 2 que luego alcanza los de línea de base en las 3 y 4. El sueño MOR de 2T2I es significativamente menor que el de 2R2I en las ventanas 1 y 2. Respecto a CL, 2R2I es mayor en las ventana 2 y tiende a ser mayor en la 3 ($p=0.052$).

3.3 Respuesta de MOR/TST

La fracción del sueño total que es ocupada por el sueño MOR es una variable de alto interés por cuanto representa directamente la presión homeostática al sueño MOR. El ANOVA de 2 vías resultó estadísticamente significativo para esta variable ($F=5.44$; $p<0.001$; grados de libertad= 15), obteniéndose para la interacción de *ventana * protocolo* un $F=5.26$ ($p<0.001$, con 9 grados de libertad), lo que podría interpretarse como si la presión al sueño MOR observada en los protocolos 2T2I y 2R2I fuese diferente al final de la fase de privación continua. Lo anterior es consistente con las comparaciones entre protocolos obtenidas para cada ventana (ver figura 13), donde se observa que en la primera ventana espontánea, la probabilidad de ocurrencia de sueño MOR es menor en el protocolo 2T2I que el protocolo 2R2I y que LB. Posteriormente, a partir de la ventana 3, el valor observado en 2T2I alcanza un valor semejante a 2R2I y significativamente mayor que LB, mientras que el valor observado de 2R2I es significativamente mayor con respecto a LB de manera sostenida durante las 4 ventanas de sueño espontáneo excepto en la ventana 4, donde la diferencia tiende a ser mayor que LB ($t=1.9$; $n=15$; $0.05 < p < 0.1$). La curva que describe el control muestra una caída entre las ventanas 1 y 2 para luego aproximarse a los valores de LB.

4. Estimación de la presión homeostática del sueño NMOR

El poder espectral de las ondas delta del EEG, obtenido a través de la transformada rápida de Fourier, es un confiable estimador de la presión homeostática del sueño NMOR. En la figura 14 se muestra el poder espectral de las ondas delta (PEOD) durante el sueño NMOR, durante las 12 horas de luz de los protocolos 2T2I y 2R2I y LB. Los valores fueron normalizados para hacerlos comparables entre las diferentes condiciones de registro (ver

materiales y métodos). La serie de tiempo de los días no perturbados (LB) muestra el típico decaimiento del PEOD en el curso de la fase de reposo de la rata.

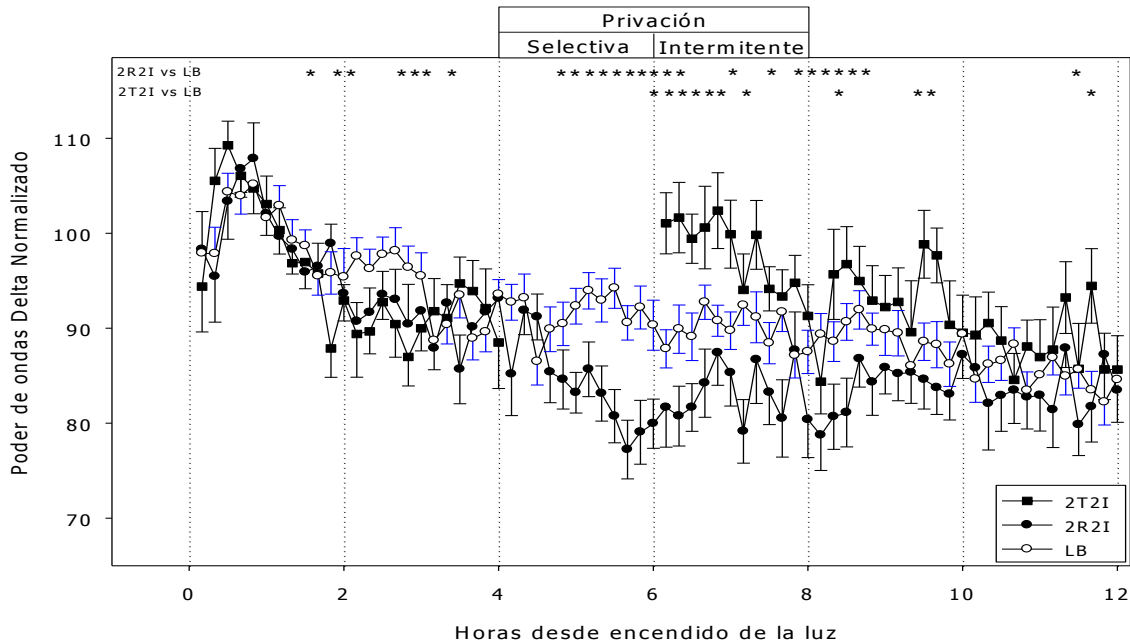


Figura 14. Curso temporal de Poder espectral de ondas delta (PEOD) del EEG del sueño NMOR normalizado en las condiciones LB, 2T2I y 2R2I, obtenidos en 15 animales (promedios \pm error estándar), presentados con una resolución temporal de 10 minutos. El valor 100% de la ordenada corresponde al promedio obtenido en el sueño NMOR de las 2 primeras horas de registro en cada condición. Los asteriscos bajo la abscisa superior indican diferencias significativas respecto a LB para los protocolos 2T2I y 2R2I ($*=p<0.05$, test de Student pareado).

Durante la privación continua se observa un decaimiento sostenido del PEOD en la condición 2R2I respecto a LB que se hace diferente de LB en la segunda hora de privación continua. Este decaimiento se revierte durante la primera media hora de privación intermitente. En la primera hora de rebote, el PEOD del protocolo 2R2I vuelve a hacerse significativamente inferior al observado en LB. Por su parte, el PEOD obtenido en los primeros minutos posteriores a la fase continua del protocolo 2T2I muestran un esperable aumento por sobre los valores de la LB que tiende a retornar a niveles de LB en la segunda hora de privación intermitente. Finalmente, en las 2 últimas horas de la fase de reposo (2 horas post-privación) los valores convergen con la línea de base.

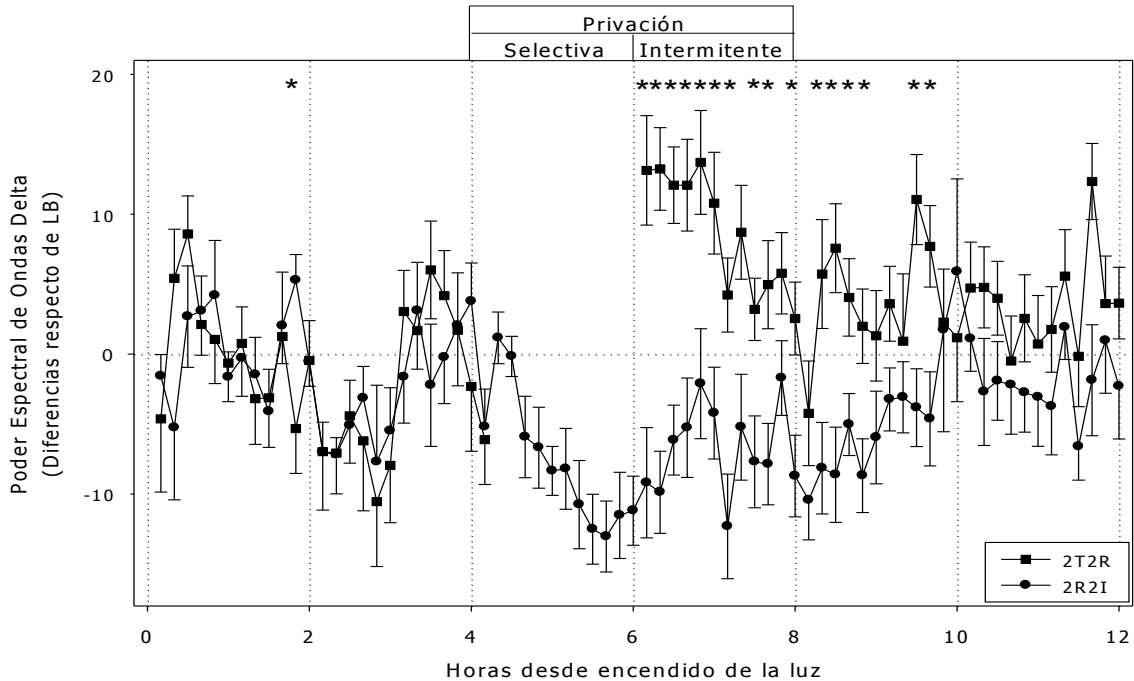


Figura 15. Curso temporal del PEOD del EEG del sueño NMOR obtenido en los protocolos 2T2I y 2R2I respecto de línea de base durante la fase de reposo. Los valores corresponden al promedio (\pm error estándar) de las diferencias aritméticas entre cada protocolo y la condición LB en cada intervalo de 10 minutos ($n=15$). Los asteriscos bajo la abscisa superior indican diferencias significativas entre los protocolos 2T2I y 2R2I ($*=p<0.05$, test de Student pareado).

La figura 15 instala el foco en el curso temporal divergente que experimenta el PEOD durante la fase continua de la privación en ambos protocolos. Expresado el valor de PEOD como diferencia respecto de LB, resulta evidente que la privación selectiva continua de sueño MOR (protocolo 2R2I) interfiere disminuyendo la expresión de ondas delta del sueño NMOR. Por su parte, en el protocolo 2T2I se observa que al iniciarse la privación intermitente (después de 2 horas en el que el animal ha debido permanecer forzosamente en vigilia) el PEOD que se obtiene es cercano al valor obtenido en las 2 primeras horas de la fase de reposo (100% aproximadamente, ver figura 14). La divergencia que se instala durante la privación continua es revertida parcialmente durante la privación intermitente, hasta que finalmente los valores convergen e torno a la línea de base, en las últimas dos horas de la fase de reposo.

5 Estimación de la presión homeostática del sueño MOR

Para acercarse a la cuantificación de la presión homeostática del sueño MOR durante los protocolos de privación de sueño, se estudió el índice de transiciones al sueño MOR (IT), el rebote del sueño MOR y el Sueño MOR acumulado, en función de cada protocolo.

5.1 Índice de transiciones

El índice de transiciones ha sido empleado como un estimador de la presión homeostática del sueño MOR (ver materiales y métodos). En la figura 16 se muestra el índice de transiciones con resolución temporal de media hora (bloque de privación) en las fases continua (sólo protocolo 2R2I) e intermitente de privación selectiva de sueño MOR (protocolos 2R2I y 2T2I).

El valor de IT inicial del protocolo 2R2I fue de 1.91 transiciones/10 minutos de sueño NMOR y en el curso de la privación continua presenta un aumento monotónico de la tasa de transiciones hasta el 4º bloque, donde alcanza el valor de 6.25. Los bloques 2, 3 y 4, resultaron ser mayores que el bloque 1, y el bloque 4 resultó mayor que los bloques 1 y 2. Durante la privación intermitente del protocolo 2R2I, los valores de IT se mantienen en un rango intermedio al obtenido durante la privación continua, donde los bloques 5, 6 y 8 presentan un IT mayor que el bloque 1 ($p < 0.05$), el bloque 7 es menor que el bloque 4 ($p < 0.05$), y los bloques 5 y 8 tienden a ser menores que el bloque 4 ($0.05 < p < 0.09$).

La privación intermitente del protocolo 2T2I se inicia con un valor de 1.59 en el bloque 5, para ascender rápidamente en el sexto bloque y mantenerse en valores cercanos al

observado en el protocolo 2R2I en los bloques correspondientes. El valor de IT en el bloque 5 es diferente del observado en los bloques 7 y 8 ($p < 0.05$) del protocolo 2T2I.

El análisis de varianza de 2 vías (factores protocolo y bloque de privación intermitente) demostró significatividad sólo para el factor protocolo ($F=5.25$, $p=0.023$). La comparación pareada entre los bloques de privación intermitente de los protocolos 2T2I y 2R2I demostró diferencias sólo en el bloque 5, donde el protocolo 2T2I presenta una tasa inferior a la correspondiente de 2R2I (ver figura16).

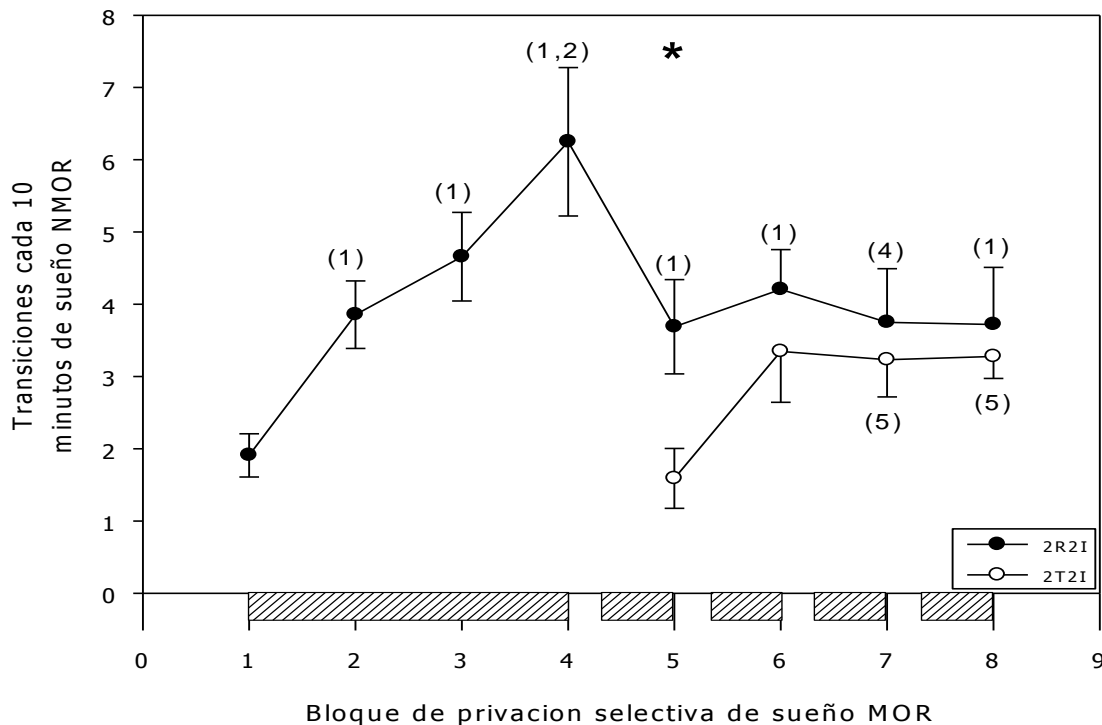


Figura 16. Índice de transiciones durante los protocolos 2T2I y 2R2I presentados con resolución temporal de media hora. Los bloques de privación intermitente (5 a 8) corresponden a los bloques de 20 minutos. Las diferencias significativas (test de Student pareado, $p < 0.05$) obtenidas en la comparación pareadas al interior de cada protocolo se indican con los números, el cual identifica al bloque de cual difieren. El asterisco identifica la comparación pareada entre protocolos (test de Student pareado, $p < 0.05$).

5.1.2 Índice de transiciones al interior de la privación intermitente

La figura 17 muestra el índice de transiciones al interior de cada bloque de privación intermitente de veinte minutos.

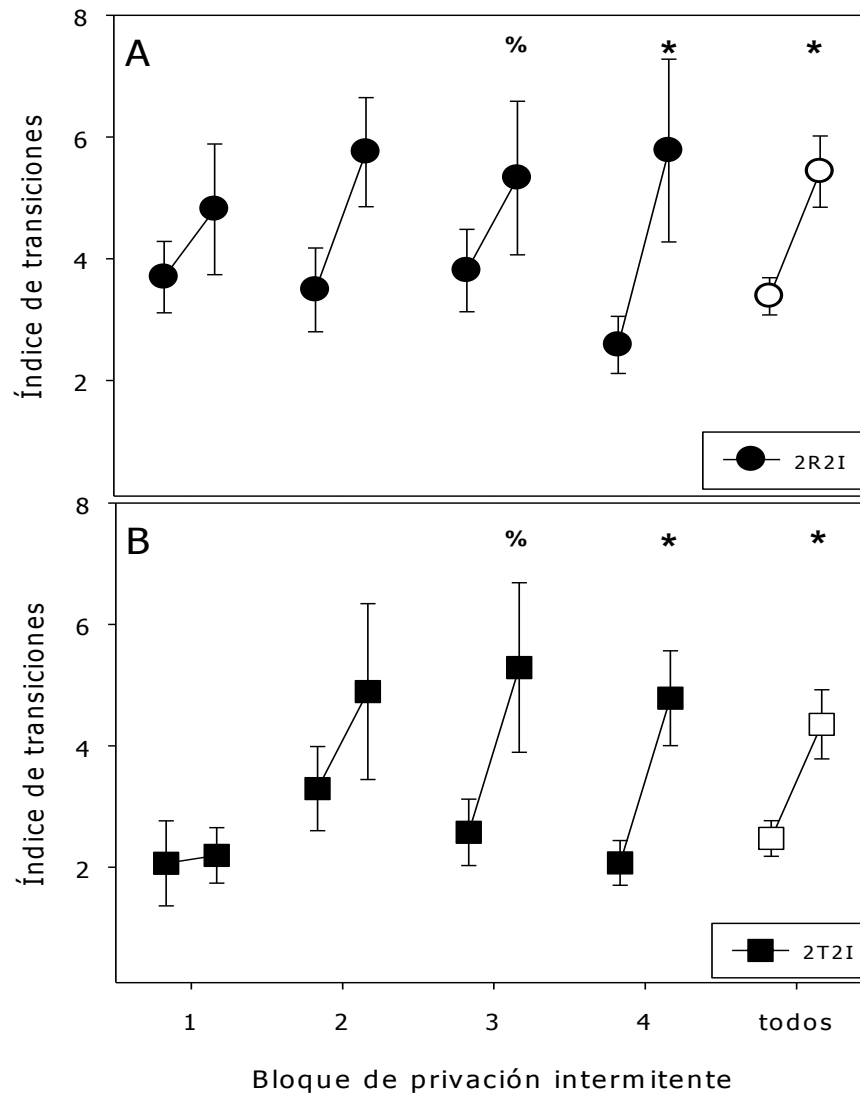


Figura 17. La figura 17.A corresponde al índice de transiciones durante el protocolo 2R2I y la 17.B al protocolo 2T2I, al interior de los bloques de privación intermitente. Los símbolos llenos corresponden a cada bloque individual y los símbolos abiertos al pool de cada protocolo. Cada bloque está representado por 2 puntos que muestran los valores de la primera y segunda mitad de cada bloque. Las diferencias estimadas mediante test de Student pareado al interior de cada bloque o del pool de cada protocolo se indican con asterisco ($p < 0.05$). % indica una tendencia ($0.05 < p < 0.1$).

Tomando como pool el conjunto de bloques de cada protocolo, se evidencia que el índice de transiciones aumenta de manera significativa al interior de los 20 minutos de privación. Se observa además que este efecto es más notorio en las dos últimos bloques privación intermitente de cada protocolo.

5.2 Rebote de Sueño MOR

Para apreciar el rebote de Sueño MOR es necesario fijar la atención en 3 parámetros conjuntamente, el número de episodios, la tasa de consolidación y la duración de los episodios de sueño MOR.

5.2.1 Número de episodios

La privación de sueño tiene un efecto inmediato en el número de episodios de sueño MOR, definidos como intervalos continuos de sueño MOR que duran más de 1 minuto (ver figura 18). Durante la fase de privación intermitente (horas 6 y 7) se observa un aumento del número de episodios cercano al 100% en el protocolo 2R2I y de 75% aprox. en el protocolo 2T2I respecto de línea de base. Llamativamente, en la condición control, entre las horas 4 y 5 se observa una caída a la mitad en el número de episodios de sueño MOR de más de un minuto de duración respecto de la línea de base. Al finalizar la privación se observa un aumento de la variable en las dos primeras horas de recuperación (ver figura 18).

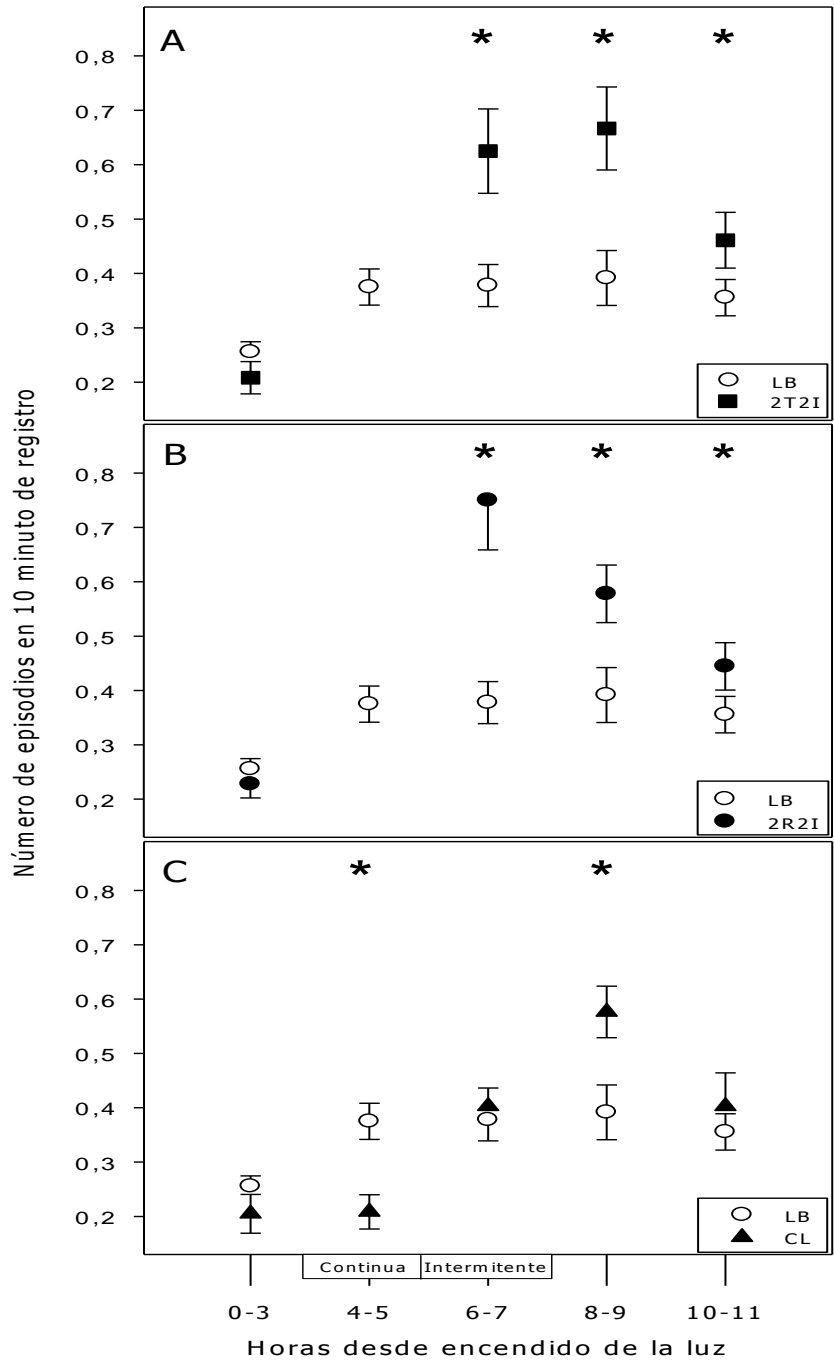


Figura 18. Número de episodios de sueño MOR en 10 minutos de registro, a través de las 12 horas desde el encendido de la luz. Las figuras A, B y C comparan las condiciones 2T2I, 2R2I y CL con LB respectivamente. Las horas antes de la privación total (0-3), durante la privación continua (4-5), durante la privación intermitente (6-7) y las horas de recuperación (8-9 y 10-11) se colapsaron en un valor promedio. Las diferencias estimadas mediante test de Student pareado para cada protocolo vs LB se indican con un asterisco ($p < 0.05$).

5.2.2 Tasa de consolidación

La tasa de consolidación indica el número de transiciones que se transformaron en episodios de sueño MOR de más de un minuto. La figura 19 muestra la tasa de consolidación durante la fase de luz. Las horas 0, 1, 2 y 3 corresponden a la fase anterior a la privación y fueron colapsadas en un solo valor promedio. En ese horario no se observan diferencias entre las condiciones experimentales. Durante la privación continua (horas 4 y 5) la consolidación de los episodios de sueño MOR en el protocolo control es menor que la línea de base. En el curso de la primera hora de privación intermitente (hora 6), sólo las transiciones de sueño MOR ocurridas en las ventanas de sueño espontáneo del protocolo 2R2I muestran un aumento en su tasa de consolidación, que es de aproximadamente un 50% respecto al valor de línea de base. A pesar que el valor de la tasa se mantiene alto en la hora 7, este no alcanza a ser estadísticamente diferente de la línea de base (test de Student pareado, $0.05 < p < 0.1$).

En la segunda hora de privación intermitente se observa un aumento en la tasa de consolidación en el protocolo 2T2I, el que persiste durante las dos primeras horas post-privación. Finalmente, los valores de los tres protocolos experimentales convergen en las últimas dos horas con la línea de base.

Consistente con la caída del número de episodios de sueño MOR observado entre las horas 4 y 5 en protocolo control, se observa que la tasa de consolidación en esas horas disminuye.

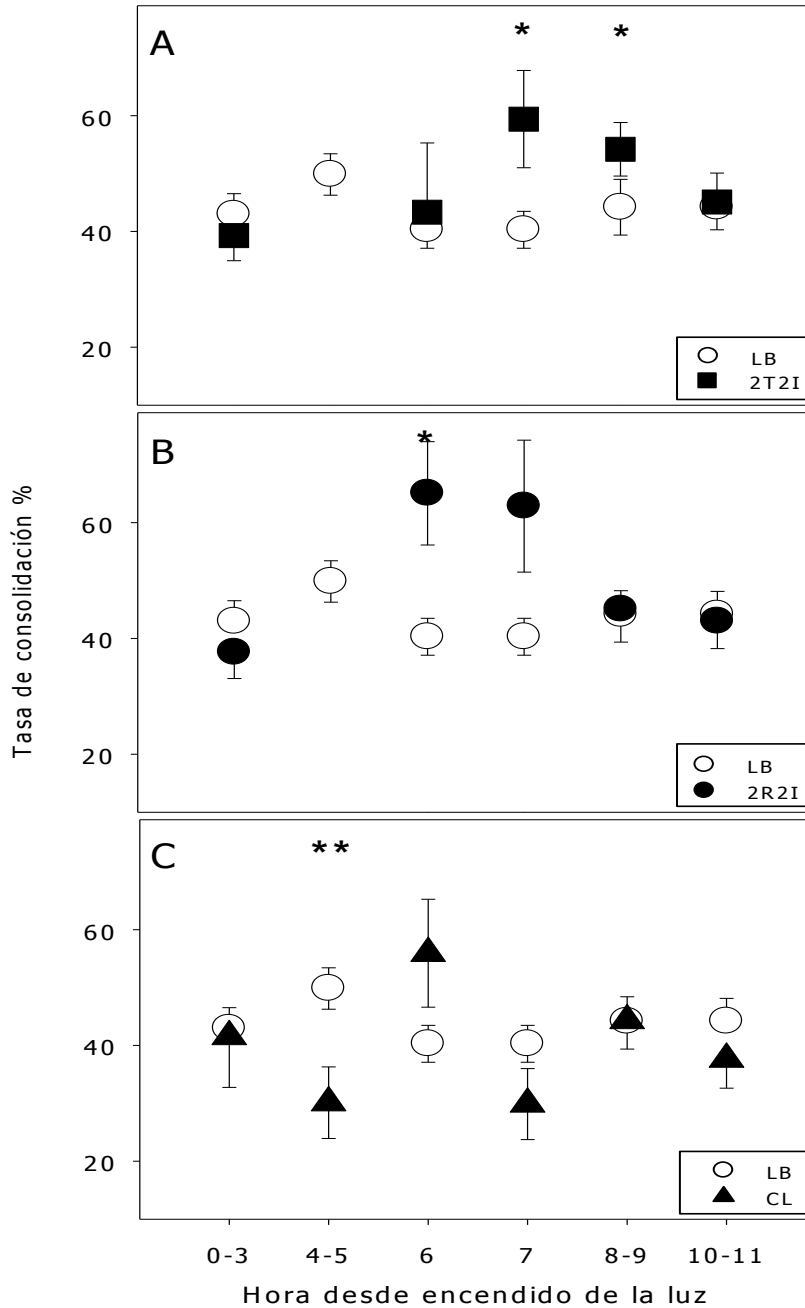


Figura 19. Tasa de consolidación (%) de los episodios de sueño MOR, a través de las 12 horas desde el encendido de la luz. Las figuras A, B y C comparan las condiciones 2T2I, 2R2I y CL con LB respectivamente. Las horas antes de la privación total (0-3), durante la privación continua (4-5), y las horas de recuperación (8-9 y 10-11) se colapsaron en un valor promedio. Las diferencias estimadas mediante test de Student pareado para cada protocolo vs. LB se indican con un asterisco ($p < 0.05$). ** ($p < 0.01$).

5.2.3 Duración de los episodios de Sueño MOR

En la figura 20 se muestra la duración promedio de los episodios de Sueño MOR de más de un minuto de duración.

Se puede apreciar como antes de la privación total de sueño (horas 0-3) los valores de las duraciones son indistinguibles entre los diferentes protocolos y la LB. Luego de la privación total, en la primera hora de privación intermitente y selectiva de Sueño MOR (hora 6), no hay un aumento significativo en las duraciones en el protocolo 2T2I. En la segunda hora de privación intermitente del mismo protocolo, se aprecia un aumento en la duración de los episodios de Sueño MOR ($p < 0.001$). En la primera hora de recuperación no hay diferencia entre ambas condiciones, pero en la hora 9 vuelve a existir un aumento en la duración de los episodios ($p < 0.05$). La figura 18.B muestra cómo inmediatamente terminada la privación continua de Sueño MOR, en la hora 6, ocurre un aumento en la duración de los episodios en las ratas del protocolo 2R2I ($p < 0.005$) que se sostiene en la hora siguiente y en la primera hora de recuperación. La duración de los episodios de sueño MOR durante el protocolo Control, no se diferencian significativamente de las de LB.

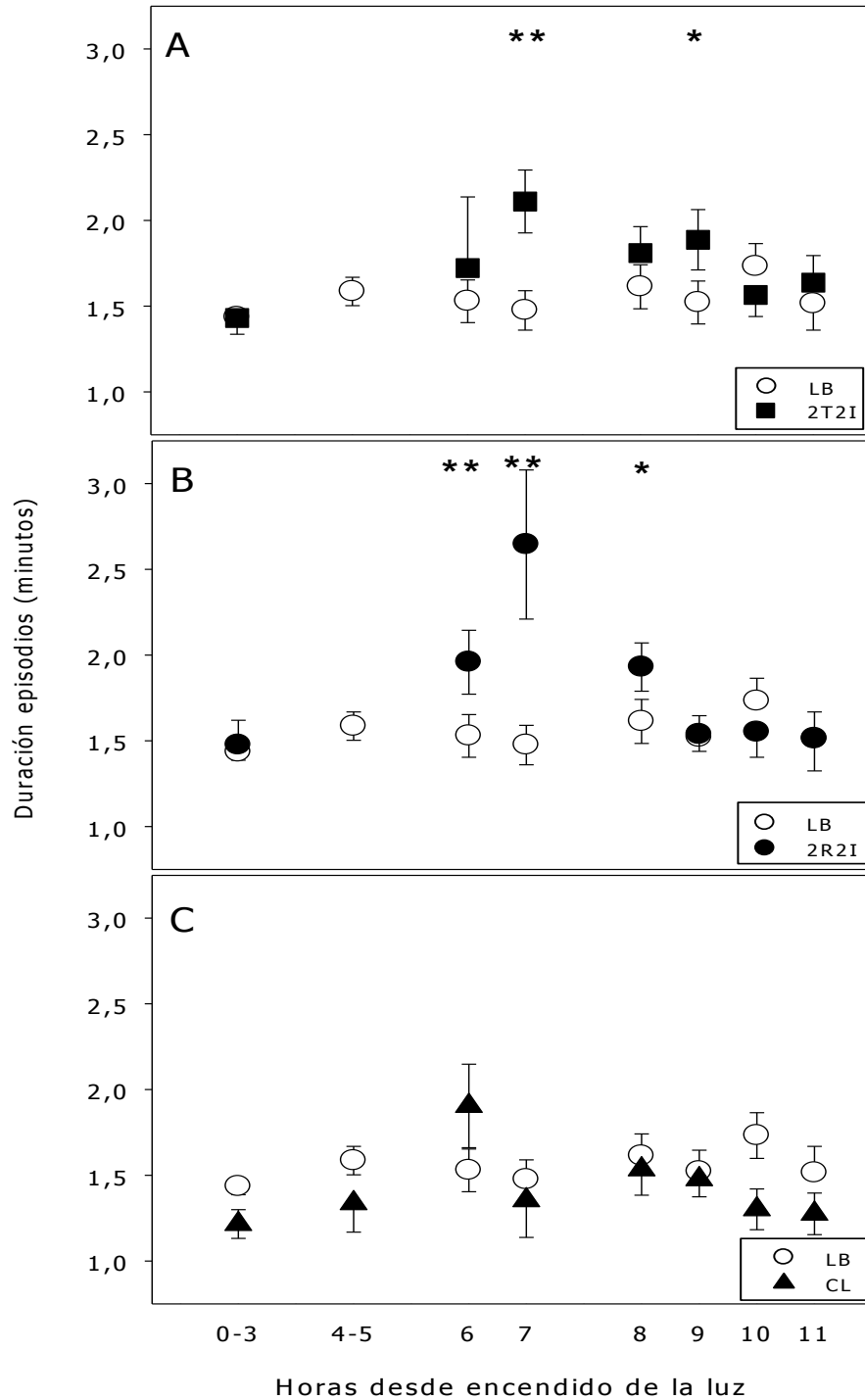


Figura 20. Duración de los episodios de sueño MOR mayores de 1 minuto, a través de las 12 horas desde el encendido de la luz. Las figuras A, B y C comparan las condiciones 2T2I, 2R2I y CL con LB respectivamente. Las horas antes de la privación total (0-3) y durante la privación continua (4-5) se colapsaron en un valor promedio. Las diferencias estimadas mediante test de Student pareado para cada protocolo vs. LB se indican con un asterisco ($p < 0.05$). ** ($p < 0.01$).

5.3 Acumulación del Sueño MOR

Para determinar como afectó cada protocolo, cuantitativamente la expresión del Sueño MOR se analizó la acumulación y deuda del Sueño MOR en función de cada protocolo.

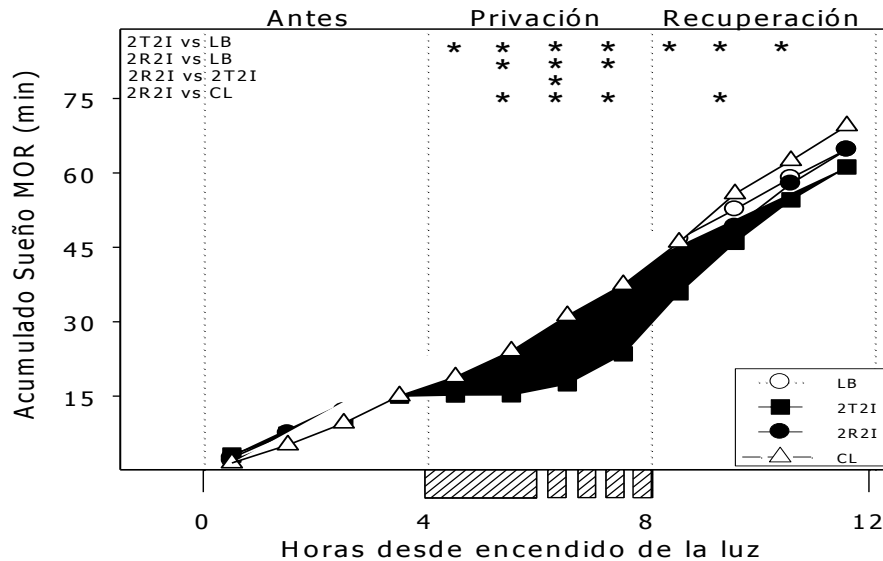


Figura 21 Acumulación de sueño MOR en minutos a través de las 12 horas desde el encendido de la luz, en las condiciones LB, 2T2I, 2R2I y CL. Los datos fueron obtenidos en 15 animales (promedios), presentados con una resolución temporal de 1 hora. Las barras achuradas en la abscisa representan los intervalos de privaciones total o selectivo. Las diferencias estimadas mediante test de Student pareado para las comparaciones entre 2T2I y 2R2I vs. LB, 2T2I vs. 2R2I y 2R2I vs. CL se indican con un asterisco ($p < 0.05$).

Antes de la privación total de sueño (horas 0-3) los valores acumulados de sueño MOR son indistinguibles entre los diferentes protocolos y la LB. Durante la privación continua en los protocolos 2T2I y 2R2I se aprecia una detención en el aumento del valor acumulado de sueño MOR, el cual diverge respecto de los valores esperados según la LB. Se observa que el valor del protocolo 2R2I se diferencia del valor de la condición CL, el cual está muy cerca del valor de LB. Durante la privación intermitente (horas 6 y 7) los minutos acumulados de sueño MOR de los protocolos 2T2I y 2R2I son menores que los de LB. Consistente con lo observado en la figura 11, el sueño MOR acumulado en la primera hora de privación intermitente 2R2I es mayor que el correspondiente en 2T2I, diferencia que

desaparece en la segunda hora de privación intermitente. Los valores de 2R2I son significativamente más bajos que los valores del CL. En el curso de las horas de recuperación, 2T2I y 2R2I se aproximan gradualmente a la línea de base y a los valores control, convergiendo con ellos primero el protocolo 2R2I y horas más tarde el protocolo 2T2I.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta memoria es caracterizar la interferencia de la homeostasis del sueño NMOR en la respuesta homeostática del sueño MOR. Para lograr este objetivo fue necesario obtener dos escenarios de alta presión homeostática para el sueño MOR; uno con alta presión homeostática para el sueño NMOR y otro con baja presión homeostática para el sueño NMOR.

El diseño experimental

El experimento consistió de protocolos de privación selectiva de sueño MOR y total de sueño de corta duración. La corta duración de los protocolos permite suponer que los mecanismos homeostáticos desplegados por los animales corresponden a procesos que operan en la escala temporal de los procesos fisiológicos de la especie. En ese sentido, los protocolos empleados se diferencian de otros esquemas de privación de largo plazo (12, 24, o 48 horas de privación de sueño), donde la respuesta de los estados de sueño puede estar afectada por procesos de naturaleza diferente a los puramente homeostáticos del dormir, tales como, balance metabólico, balance térmico, estrés, etc. (Rechtschaffen *et al.*, 1999; Franken, 2002; Ocampo-Garcés y Vivaldi, 2002). El procedimiento de privación de sueño empleado fue el de "agitación suave" ("gentle shaking", Ocampo-Garcés *et al.*, 2000). El método tiene dos ventajas fundamentales. La primera es que permite el registro ininterrumpido polisomnográfico del animal, con escasa interferencia en la señal electrofisiológica, a diferencia de lo que ocurre con el método del "florero invertido" donde habitualmente los animales no son registrados durante la privación, y por lo tanto no se tiene acceso al diagnóstico de estado del animal en una fase crítica del experimento. La segunda es que al ser realizado mediante la presencia directa del experimentador, la

privación no está sujeta a algoritmos diagnósticos automatizados que habitualmente sub o sobre diagnostican, y consecuentemente sub o sobre estimulan a los animales (Benington *et al.*, 1994).

Para obtener un aumento de la presión homeostática al sueño MOR de manera exclusiva, se practicaron privaciones selectivas de sueño MOR. Para obtener un aumento simultáneo de la presión homeostática al sueño MOR y al sueño NMOR se practicaron privaciones totales de sueño. En nuestro experimento se buscó obtener un alza significativa en la presión homeostática del sueño MOR en el menor intervalo posible. En la rata, está descrito que el mínimo intervalo capaz de desencadenar un rebote homeostático de sueño MOR es de 2 horas de privación selectiva y continua de sueño MOR (Benington *et al.*, 1994; Endo *et al.*, 1997). Es además aceptado el que 2 horas de privación total de sueño desencadena una respuesta homeostática consistente de sueño MOR (Ocampo-Garcés *et al.*, 2000). Con esta información en mente se establecieron los protocolos que consistieron de una fase inicial de 2 horas de privación continua de sueño total (protocolo 2T2I), y privación selectiva continua de sueño MOR (protocolo 2R2I).

Una vez obtenido un aumento significativo de la presión homeostática de sueño MOR después de 2 horas de privación continua total o selectiva, supusimos que el animal desplegaría el rebote compensatorio de sueño MOR. La predicción subyacente es que la duración del rebote de sueño MOR es función inversa de la eficiencia del animal para desplegar sueño MOR. Es decir, el rebote se completará antes en un animal que obtiene más sueño MOR por unidad de tiempo. Para evaluar la eficiencia del rebote en las 2 horas posteriores a la fase de privación continua, se le ofreció al animal 4 ventanas de 10

minutos de sueño no perturbado (30% del tiempo total), separadas por bloques de 20 minutos de privación selectiva de sueño MOR. Este procedimiento de "privación selectiva intermitente" (Ocampo-Garcés y Vivaldi, 2002) permite caracterizar el curso temporal del rebote en 2 dimensiones, por una parte informa de la capacidad del animal de desplegar sueño MOR durante el sueño espontáneo, y por otra, informa acerca del curso temporal de presión homeostática durante los bloque de privación.

Por último, el horario escogido para realizar los experimentos es un elemento crítico para el éxito de protocolos de privación de corto plazo como el nuestro. Centramos los protocolos en torno a la mitad de la fase de luz puesto que la expresión espontánea de sueño MOR llega a su máximo entre las horas 4 y 8 desde el encendido de la luz (Vivaldi *et al.*, 1994^b).

Efectividad y especificidad de las privaciones de sueño

Durante el protocolo 2R2I interesaba suprimir la expresión de sueño MOR, durante las 2 horas de privación continua y selectiva de sueño MOR (2R), sin afectar la expresión de sueño NMOR. En ese sentido el procedimiento fue exitoso ya que la expresión promedio de sueño NMOR durante estas 2 horas en LB fue de 31 minutos y en 2R2I fue de 29 minutos (ver figura 10). En contraste, en ese mismo intervalo la expresión de sueño MOR cayó desde 5,5 minutos en LB a 1 minuto en 2R2I, representando una pérdida de 82% (ver figura 11). EL protocolo 2T2I fue efectivo en suprimir la expresión de sueño NMOR y de sueño MOR durante las 2 horas de privación continua y total de sueño (2T) ya que ambas expresiones comparadas con LB, cayeron desde 31 minutos (promedio de 2T) a 2,5 minutos y desde 5,5 minutos a 0,4 minutos respectivamente (ver figuras 10 y 11).

Respuesta homeostática del sueño MOR ante la privación selectiva de sueño MOR (2R2I)

Las transiciones NMOR-MOR.

El índice de transiciones de sueño NMOR a MOR ha sido empleado como una medida objetiva de la presión homeostática de sueño MOR en modelos animales y en humanos (Endo *et al.*, 1998; Franken, 2002). Esta variable es una aproximación a la probabilidad de que un animal estando en sueño NMOR transite espontáneamente a sueño MOR. En la rata ha sido descrito que el valor de este índice aumenta monotónicamente en el curso de las dos primeras horas de la privación selectiva, hasta alcanzar un *plateau* (Benington *et al.*, 1994). En la figura 16 resulta evidente que esta conducta es reproducible en nuestro modelo, donde el valor alcanzado en el último bloque de 30 minutos de las 2 horas de privación selectiva continua es mayor que el obtenido durante la primera hora. De manera evidente, la figura 16 muestra que la presión disminuye y se mantiene en un nivel intermedio en la serie de bloques de privación intermitente, lo que sugiere que esta presión disminuye producto de la ocurrencia del sueño MOR en las ventanas de sueño espontáneo adyacentes. Existen evidencias de que la ocurrencia de un episodio de sueño MOR tiene un efecto inmediato en la presión homeostática del estado, proceso conocido como la homeostasis del corto plazo de sueño MOR (Vivaldi *et al.*, 1994^a; Ocampo-Garcés y Vivaldi, 2002). El efecto transitorio de la ocurrencia del sueño MOR sobre la presión homeostática del sueño MOR puede evidenciarse en la figura 17, donde la segunda mitad de los bloques de privación intermitente presentan una fuerte tendencia a una mayor presión homeostática medida como índice de transiciones.

Rebote de sueño MOR

La expresión más directa del rebote compensatorio del estado es el exceso de tiempo en el estado por unidad de tiempo respecto a su nivel de referencia (línea de base). De las figuras 12 y 13 se desprende que el animal sometido a 2 horas de privación continua selectiva de sueño MOR despliega un rebote compensatorio. En la figura 12, el sueño MOR acumulado en la primera hora de privación intermitente, con un 30% de sueño espontáneo permitido, alcanza valores comparables al alcanzado en 1 hora de la línea de base. Visto con mayor resolución, en la figura 13 el sueño MOR obtenido en los 10 minutos de sueño espontáneo duplica el valor esperado según su referencia. Esto sugiere que el animal aprovecha de manera eficiente el tiempo de sueño espontáneo. Una evidencia más específica es el aumento de la razón sueño MOR/tiempo de sueño total, por cuanto descarta el "efecto de arrastre" del sueño, es decir, el aumento del sueño MOR no se explica por un simple aumento del tiempo total de sueño. Consistentemente, en la figura 12 la razón sueño MOR/TST alcanza niveles de línea de base en la primera hora de privación intermitente. En la figura 13 se observa que la razón alcanza valores superiores al 30% durante las ventanas de sueño espontáneo, siendo superiores al 18% observado en la línea de base en las horas correspondientes.

Dinámica de los episodios del sueño MOR durante el rebote compensatorio

El rebote de sueño MOR observado durante la privación intermitente del protocolo 2R2I se explica mediante diversos mecanismos. (i) Aumento en la consolidación del sueño MOR: en condiciones de línea de base menos de la mitad de las transiciones del sueño NMOR al sueño MOR se convierten en episodios de más de un minuto de duración, en cambio en las ventanas de sueño espontáneo de 2R2I este valor se aproxima al 60% (ver figura 19).

(ii) Un aumento relativo del número de episodios: comparado a la línea de base, en las ventanas de 10 minutos de sueño espontáneo, la probabilidad de obtener un episodio es de aproximadamente 0.7 en la condición 2R2I, mientras que en la línea de base es cercana a 0.4 (ver figura 18). (iii) Aumento en la duración de los episodios: los episodios de sueño MOR en la condición 2R2I en las ventanas de sueño espontáneo son más largos que los observados en la rata imperturbada en la hora correspondiente (ver figura 20).

En conjunto estos resultados demuestran que en las horas 6 y 7, correspondientes al período de privación intermitente, existe un rebote compensatorio de sueño MOR gatillado por la privación continua de las horas 4 y 5 (desde encendido de la luz). Cada uno de estos parámetros ha sido demostradamente asociado a mecanismos compensatorios del sueño MOR (Franken, 2002; Ocampo-Garcés y Vivaldi 2002).

Comparación entre la respuesta homeostática del sueño MOR posterior al protocolo 2R2I y a la condición Control.

Mediante el protocolo control intentamos replicar las condiciones de privación selectiva aplicadas en el protocolo 2R2I. Del total de 15 animales estudiados, por razones técnicas sólo logramos completar el protocolo de control en 11 ratas. Las intervenciones fueron aplicadas independientes del estado del CSV del animal en intervalos regulares hasta completar el número total de intervenciones aplicadas en el animal correspondiente durante 2R2I. Comparado con 2R2I, el protocolo control presentó cerca de 100% más de sueño MOR durante la fase de privación (ver Tabla I, sextante 1). Consistentemente, en la fase de recuperación (ver Tabla I, sextante 2) en el protocolo 2R2I se observó significativamente más MOR que en el control. Durante la fase de privación intermitente el

sueño MOR de la primera ventana alcanza valores similares en los protocolos 2R2I y control en la primera. A partir de la segunda ventana los valores entre ambos protocolos se distancian, siendo significativamente mayor la cantidad de sueño MOR en 2R2I en la segunda y con una fuerte tendencia en la tercera ventana (ver figura 13).

La aplicación del protocolo control entre las horas 4 y 7 no afectó la expresión del sueño MOR en términos de tiempo en estado comparado con la línea de base (ver Tabla I y figuras 11 y 12). De manera complementaria, la figura 21 muestra que la curva de acumulación de sueño MOR del control describe una trayectoria paralela a la de la línea de base, descartando la ocurrencia de déficit de sueño MOR en las horas de intervención. En contraste, la aplicación aleatoria de las intervenciones durante las sesiones control afectó profundamente la arquitectura del ciclo sueño-vigilia durante el protocolo control. En las horas de control de la privación continua (horas 4 y 5) ocurre una disminución del 50% del número de episodios de sueño MOR respecto a línea de base (ver figura 18). La fragmentación del sueño MOR en las horas 4 y 5 queda objetivada en la disminución significativa de la tasa de consolidación de episodios de sueño MOR (ver figura 19). En las 2 primeras ventanas de sueño espontáneo (hora 6) del protocolo control, el sueño MOR y de la relación MOR/TST despliegan un alza cuantitativa respecto a línea de base, que decae durante las ventanas 3 y 4 de la hora 7, (ver figura 13). En las horas de recuperación (ver Tabla I, sextante 2) se observa un aumento significativo de la expresión de sueño MOR respecto a línea de base, particularmente en las horas 8 y 9. Lo anterior sugiere que el protocolo control no resultó completamente neutro en la expresión de sueño MOR, porque en las ventanas de sueño espontáneo y en las horas de recuperación

diversos parámetros de sueño MOR resultaron significativamente diferentes de la línea de base.

Los resultados obligan a interpretar con cautela el rebote de sueño MOR de los protocolos 2T2I y 2R2I en términos de manifestación puramente homeostática. Dijimos que durante el protocolo control no se afectó la cantidad de sueño MOR y que en las horas posteriores se observó un aumento del sueño MOR. ¿Cómo se explica un aumento de sueño MOR sin tener una deuda de sueño MOR acumulada? Existe la posibilidad que la estimulación mediante *agitación suave* por sí misma sea capaz de gatillar un aumento inespecífico de sueño MOR. Existen antecedentes en la literatura de procedimientos que por sí mismos gatillan aumentos transitorios de sueño MOR no explicables homeostáticamente, tales como pulsos de oscuridad, estímulos auditivos, restricción de movimiento y otros (Rechtschaffen *et al.*, 1999). Alternativamente, existe la posibilidad de que la fuerte intervención realizada durante el protocolo control afecte algún aspecto de la arquitectura del sueño, tal como la continuidad de los episodios de sueño NMOR, que genere por sí misma una presión homeostática al sueño MOR. En ese sentido el aumento en la fragmentación del sueño NMOR durante el protocolo control, asociado a la disminución de la expresión de sueño NMOR en el sextante 1 (ver Tabla I) y el consiguiente aumento de la vigilia intercurrente modifiquen la propensión al sueño MOR y expliquen el aumento de sueño MOR.

Interferencia de la homeostasis del sueño NMOR con la homeostasis del sueño MOR

El poder espectral de las ondas delta y curso temporal del sueño MOR

La privación total de sueño durante el protocolo 2T2I origina un aumento en la intensidad del PEOD terminada la privación continua de sueño (ver figura 14). El alza del PEOD después de las 2 horas de privación total (hora 6) alcanza aproximadamente el 100% del observado al inicio de la fase de reposo (momento de máxima expresión de PEOD del día).

El resultado más relevante obtenido es que se evidencia que mientras el poder espectral de ondas delta se mantiene elevado, intervalo que se extiende durante la primera hora de privación intermitente, la respuesta homeostática de sueño MOR permanece suprimida. Comparada con el curso temporal del sueño MOR observado en el protocolo 2R2I (cantidad de estado, duración de episodios, razón sueño MOR/TST), el rebote se retarda en aproximadamente 1 hora, iniciándose durante la hora 7 y extendiéndose hasta las 2 primeras horas de recuperación.

Tasa de consolidación y duración de los episodios de sueño MOR

Es evidente la interferencia que ejerce en la homeostasis del sueño MOR una alta presión homeostática de sueño NMOR, manifestada por el aumento de la intensidad del PEOD. Al fijar la atención en la figura 19.A, se aprecia como la Tasa de consolidación de los episodios de sueño MOR, resultantes del protocolo 2T2I, en la primera hora de privación intermitente (hora 6) se mantiene muy cerca de los valores de línea de base. Luego a la segunda hora de privación intermitente (hora 7) se manifiesta un aumento en la Tasa de consolidación que se mantiene durante las primeras horas de recuperación. La respuesta a

este retraso en el aumento de la tasa de consolidación post-privación total, está determinado por el aumento del PEOD durante la hora 6 y a su descenso en la hora 7.

En la figura 19.B el aumento en la Tasa de consolidación se manifiesta inmediatamente terminada la privación continua, en la primera hora de privación intermitente (hora 6) para luego disminuir en las horas siguientes. Similar situación ocurre con las duraciones de los episodios de sueño MOR (ver figura 20). Al comparar las figuras 20.A y 20.B resalta que las duraciones posteriores a la aplicación del protocolo 2T2I, manifiestan un retraso en el aumento compensatorio, mientras que las duraciones posteriores a la aplicación del protocolo 2R2I, comienzan a aumentar inmediatamente terminada la privación total y selectiva de sueño MOR. La explicación del aumento inmediato de la Tasa de consolidación y de las duraciones de los episodios de sueño MOR posterior a la aplicación del protocolo 2R2I es que este protocolo no produce un aumento del PEOD, por lo tanto no aumenta la presión homeostática del sueño NMOR.

Acumulación del sueño MOR

En la figura 21 se aprecia claramente el efecto de los diferentes protocolos en la cantidad de tiempo acumulado de sueño MOR. El protocolo que mas afecta la expresión de sueño MOR es el protocolo 2T2I. Durante las horas de privación intermitente la acumulación de sueño MOR como resultado del protocolo 2T2I, esta por debajo de la acumulación producto del protocolo 2R2I. Existe un anticipo en la recuperación de sueño MOR cuando las ratas fueron sometidas al protocolo 2R2I, y un retraso cuando fueron sometidas al protocolo 2T2I. Finalmente en las últimas horas de la recuperación los protocolos convergen a los valores de LB.

CONCLUSIONES

- La presión homeostática al sueño MOR se acumula durante la ausencia de este.
- Posterior a una privación total de sueño se observa un marcado aumento en el poder espectral de las ondas Delta, relacionadas con el sueño NMOR.
- El aumento del poder espectral de las ondas Delta, retrasa la ocurrencia del rebote compensatorio del sueño MOR, el cual se expresa una vez que disminuye la presión homeostática del sueño NMOR.
- Frente a una elevada presión homeostática tanto de sueño MOR, como de sueño NMOR, existe prioridad para descargar dicha presión de los mecanismos homeostáticos del sueño NMOR frente a los del sueño MOR.

BIBLIOGRAFÍA

- **ACHERMANN, P.** 2004. The two-process model of sleep regulation revisited. *Aviat Space environ Med.* Volumen 75, N° 3, section II: 37-43.

- **BARBATO, G., AND WEHR, T.A.** 1998. Homeostatic regulation of REM sleep in humans during extended sleep. *Sleep.* Volumen 21: 267-276.

- **BENINGTON, J.H.; WOUDEBERG, M.C.; HELLER, H.C.** 1994. REM-sleep propensity accumulates during 2-h REM-sleep deprivation in the rest period in rats. *N. Letters.* Volumen 180: 76-80.

- **BENINGTON, J.H.** 2002. Debating how REM sleep is regulated (and by what). *J Sleep Res.* Volumen 1: 29-31; discussion 31-33.

- **BORBÉLY, A.** 1982. A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiol.* Volumen 1: 195-204.

- **BORBÉLY, A. AND ACHERMANN, P.** 1999. Sleep homeostasis and models of sleep regulations. *J of Bio Rhythms.* Volumen 14: 557-568.

- **BRUNNER, D.P.; DIJK, D.J.; TOBLER, I.; BORBÉLY, A.A.** 1990. Effect of partial sleep deprivation on sleep stages and EEG power spectra: evidence for non-REMS and REMS homeostasis. *Electroenphalogr. Clinic Neurophy.* Volumen 75: 492-499.

- **CERRI, M.; OCAMPO-GARCES, A.; AMICI, R.; BARACCHI, F.; CAPITANI, P.; JONES, C.A.; LUPPI, M.; PEREZ, E.; PARMEGGIANI, P.L.; ZAMBONI, G.** 2005. Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram. *Sleep.* Volumen 6:694-705.

- **DAAN, S.; BEERSMA, D.G.; BORBELY, A.** 1984. Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol.* Volumen 246: 161-183.

- **DIJK, D.J.; BRUNNER, D.P.; BORBÉLY, A.** 1990. Time course of EEG power density during long sleep in humans. *Am J Physiol.* Volumen 258: 650-661.

- **DIJK, D.J. AND CZEISLER, C.A.** 1994. Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans. *Neuros letters.* Volumen 166: 63-68.

- **ENDO, T.; SCHAWIERIN, B.; BORBÉLY, A.; TOBLER, I.** 1997. Selective and total sleep deprivation: Effect on the sleep EEG in the rat. *Psychiat Res.* Volumen 66: 97-110.

- **ENDO, T.; ROTH, C.; LANDOLT, H.P.; WERTH, E.; AESCHBACH, D.; ACHERMANN, P.; BORBÉLY, A.** 1998. Selective REM sleep deprivation in humans: effects on sleep and sleep EEG. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* Volumen 274: 1186-1194.

- **FRANKEN, P.; TOBLER, I.; BORBÉLY, A.** 1991. Sleep homeostasis in the rat: Simulation of the time course of EEG slow-wave activity. *Neuros Letters.* Volumen 130: 141-144.

- **FRANKEN, P.** 2002. Long-term vs. Short-term processes regulating REM sleep. *J. Sleep Res.* Volumen 11: 17-28.

- **GREEN, D.J. AND GILLETTE, R.** 1982. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* Volumen 245: 198-200.

- **GROSS, G. AND HENDRIKS, J.** 1982. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neuros Letters.* Volumen 34: 283-288.

- **GVILIA, I.; TURNER, A.; MCGINTY, D.; SZYMUSIAK, R.** 2006. Preoptic area neurons and the homeostatic regulation of rapid eye movement sleep. *J of Neuros.* Volumen 26: 3037-3044.

- **HASTINGS, M.H.; REDDY, A.B.; MAYWOOD, E.S.** 2003. A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev.* Volumen 4: 649-661.

- **IBUKA, N. AND KAWAMURA, H.** 1975. Loss of circadian rhythms in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res.* Volumen 96: 75-81.

- **KLEITMAN, N.; ASERINSKY, E.** 1953. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science.* Volumen 118; 273-274.

- **MISTLBERGER, R.E.; BERGMANN, B.M.; WALDENAR, W.; RECHTSCHAFFEN, A.** 1983. Recovery sleep following sleep deprivation in intact and suprachiasmatic nuclei-lesioned rats. *Sleep.* Volumen 6: 217-233.

- **MOORE, R.Y.; LENN, N.J.** 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal Comp. Neur.* Volumen 146:1-14.

- **MOORE, R.Y.** 2007. Suprachiasmatic nucleus in sleep-wake regulation. *Sleep Med.* Volumen 8: 27-33.

- **OCAMPO-GARCÉS, A.; MOLINA, E.; RODRÍGUEZ, A.; VIVALDI, E.A.** 2000. Homeostasis of REM sleep after total and selective sleep deprivation in the rat. *J Neurophysiol.* Volumen 84: 2699-2702.

- **OCAMPO-GARCÉS 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.* Volumen 11: 81-89.

- **PARMEGGIANI, P.; ZAMBONI, G.; CIANCI, T.; CALASSO, M.** 1977. Absence of thermoregulatory vasomotor responses during fast wave sleep in cats. *Electro Clinic Neurophy.* Volumen 42: 372-380.

- **RALPH, M.R.; FOSTER, R.G.; DAVIS, F.C.; MENAKER, M.** 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian periods. *Science*. Volumen 247: 975-978.

- **RECHTSCHAFFEN, A.; BERGMANN, B.M.; GILLILAND, M.A.; BAUER, K.A.** 1999. Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep*. Volumen 22: 11-31.

- **RICHTER, C.P.; THOMAS, CH.C.** 1965. Biological clocks in medicine and psychiatry. *J of Psycho Res*. Volumen 9:405-410.

- **ROTH, C.; ACHERMANN, P.; BORBÉLY, A.** 1999. Alpha activity in the human REM sleep EEG: Topography and effect of REM sleep deprivation. *Clinic Neurophy*. Volumen 110: 632-635.

- **SIEGEL, J.M.** 2005. REM Sleep. **In:** M. Kryger, T. Roth y W. C. Dement (Eds.). *Principles and practice of Sleep Medicine*. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA: 120-135.

- **SMALE, L.; LEE, T.; NUNEZ, A.A.** 2003. Mammalian diurnality: some facts and gaps. *J of Bio Rhyt*. Volumen 18: 356-366.

- **STEPHAN, F.K.; ZUCKER, I.** 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Volumen 69 Num. 6:1583-1586.

- **STERIADE, M.** 2005. Brain electrical activity and sensory processing during waking and sleep states. **In:** M. Kryger, T. Roth y W. C. Dement (Eds.). *Principles and practice of Sleep Medicine*. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA: 101-119.

- **VAN ESSEVELDT, L.E.; LEHMAN, M.N.; BOER, G.J.** 2000. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping systems revisited. *Brain Res Rev*. Volumen 33: 34-77.

- **VIVALDI, E.A.; OCAMPO, A.; WYNEKEN, U.; RONCAGLIOLO, M.; ZAPATA, A.M.** 1994(a). Short-Term Homeostasis of active sleep and the Architecture of Sleep in the Rat. J. Neurophysiol. Volumen 72: 1745-1755.

- **VIVALDI, E.A.; OCAMPO, A.; WYNEKEN, U.; RONCAGLIOLO, M.; ZAPATA, A.M.** 1994(b). Measures of Location and Dispersion of Sleep State Distributions Within the Circular Frame of a 12:12 Light: Dark Schedule in the Rat. Sleep. Volumen 17: 208-219.

- **VIVALDI, E.A.** 2002. El ciclo sueño vigilia, **In:** Cronobiología Humana, Editorial Universidad de Quilmes, Buenos Aires. Pp: 207-219.

- **VIVALDI, E.A.; OCAMPO-GARCÉS A.; VILLEGAS, R.** 2005. Short-term homeostasis of REM sleep throughout a 12:12 light:dark schedule in the rat. Sleep. Volumen 8: 931-943.

- **WERTH, E.; DIJK, D.J.; ACHERMAN, P.; BORBÉLY, A.** 1996. Dynamics of the sleep EEG after an early evening nap: experimental data and simulations. Am J. Of Physiol. Volumen 271: 501-510.

- **ZORICK, F.; ROEHRS, T.; WITTIG, R.; LAMPHERE, J.; SICKLESTEEL, J.; ROTH, T.** 1986. Sleep-wake abnormalities in narcolepsy. Sleep. Volumen 9: 189-193.

- **ZEPELIN, H.** 1994. Mammalian sleep. **In:** M. Kryger, T. Roth y W. C. Dement (Eds.). Principles and practice of Sleep Medicine. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA: 69-80.

- **ZEPELIN, H.** 2005. Mammalian sleep. **In:** M. Kryger, T. Roth y W. C. Dement (Eds.). Principles and practice of Sleep Medicine. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA: 91-100.