

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**PRIVACIÓN SELECTIVA DE SUEÑO REM EN RATAS: RECUPERACIÓN ESPONTÁNEA VERSUS
ENMASCARAMIENTO. UN ESTUDIO DE HOMEOSTASIS DE SUEÑO REM**

NORMA BARRERA DEL PINO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN NEUROCIENCIAS**

Director de Tesis: Prof. Dr. Adrián Ocampo-Garcés

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

NORMA BARRERA DEL PINO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Neurociencias en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de septiembre de 2017.

**Prof. Dr. Adrián Ocampo-Garcés
Director de Tesis
Santiago, Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Pablo Gaspar

Prof. Dr. Pablo Henny

Prof. Dr. Paul Délano

**Prof. Dr. Miguel Concha Nordemann
Presidente Comisión**

Dedicatoria

A mi Padre Celestial, por poner frente a mis ojos la posibilidad de escoger este camino de la investigación, elección que cambió mi vida de manera tal que le dio aliento nuevo a mi carrera profesional y a mi propio sentido del valor individual.

A mis padres, por siempre creer que era capaz de lograr mi máximo potencial, por darme la calma cuando a mí me faltó, por apoyarme tanto física como emocionalmente y darme aliento para seguir adelante.

A mis hermanos y cuñados, a mis sobrinos y al resto de mis familiares que siempre estuvieron pendientes de mi progreso y que me dieron aliento deseándome lo mejor.

A todos aquellos que de alguna forma u otra tuvieron confianza en mí y me dieron una palabra de aliento para seguir adelante.

A todos ellos les dedico esta tesis, fruto de mi esfuerzo y el de muchos otros indispensables.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer al programa de Magíster en Neurociencias de la Universidad de Chile por otorgarme la oportunidad de acceder a este curso de post-grado y poner de manera tan clara y oportuna toda la información necesaria.

En segundo lugar, agradezco a mi director de Tesis, dr Adrián Ocampo-Garcés, por guiarme paso a paso a través de lo que era desconocido para mí, por darme el empujón necesario cuando la investigación parecía estancarse y muy en especial, por soportar con paciencia y con el mejor de los ánimos los contratiempos que tuvimos que enfrentar.

Agradezco a todo el equipo del laboratorio de Cronobiología, en especial a Jorge Estrada, por enseñarme tanto y con tanta calma; a Christian López, por su increíble positividad, por estar presente cuando más se le necesitaba; a Danay Espinoza, por ser la voz de la experiencia y entregar una mano amiga de ayuda; a Ingrid Buller, por darme ánimo y compartirme su amistad; a Maga Bórquez, por su amabilidad, su sonrisa y la disposición que mostró al momento de enseñarme, a Juan Amaro por las extremadamente interesantes conversaciones y a Carola Manterello por consolarme cuando fue necesario.

Gracias a todos los profesores y encargados que dieron de su tiempo para guiarnos a nosotros, los alumnos, en este fascinante mundo de la neurociencia.

A mis empleadores, por ser tan flexibles y comprensivos cada vez que necesitaba tiempo extra para dedicar a mi investigación.

Y muy especialmente, agradezco a mis ratas, animales silenciosos que con pasividad entregaron sus vidas para que esta tesis pudiera ser completada.

Índice

		Página
1	Resumen	6
2	Abstract	7
3	Introducción	8
4	Hipótesis y objetivos	20
5	Materiales y Método	21
6	Resultados	28
7	Discusión	38
8	Conclusión	48
9	Bibliografía	49

1. Resumen

La homeostasis de sueño REM refiere el proceso mediante el cual la cantidad de tiempo en este estado se mantiene dentro de límites mínimos aceptables; sin embargo existen reportes contradictorios respecto a si el sueño REM posee efectivamente este tipo de regulación.

Utilizando la herramienta de Estimulación Fóptica provocamos un exceso de sueño REM. Aplicando Pulsos de Oscuridad (PO) durante el periodo de luz, se logra con alta probabilidad y corta latencia una transición de sueño NREM a sueño REM en ratas albinas. De esta manera provocamos un exceso del estado y evaluamos la respuesta posterior.

Se implementaron tres protocolos: (1) 4R, privación selectiva de sueño REM durante 4 horas (Zeitgeber time 4-7); (2) 10d, aplicación de Pulsos de Oscuridad de 10 minutos, alternados con 20 minutos de luz durante 2 horas (Zeitgeber time 8-9) y por último (3) 4R10d, que involucra la combinación de ambas condiciones experimentales.

Los protocolos 4R y 4R10d mostraron una respuesta homeostática de rebote significativa posterior a la privación. Durante el periodo de Estimulación Fóptica se observó un importante incremento del tiempo en sueño REM en 4R10d en relación a BL y 4R que se extendió incluso durante el periodo de actividad de la rata.

En el protocolo 10d se observó un incremento del tiempo en sueño REM equivalente al rebote post-privación obtenido en 4R, y el incremento ocurrido en 4R10d constituye la sumatoria del sueño REM obtenido producto de la privación más la acción de los Pulsos de Oscuridad.

En conclusión, la recuperación post-privación mostró características homeostáticas, sin embargo no consideró el exceso de sueño REM obtenido mediante Estimulación Fóptica.

2. Abstract

There is a homeostatic mechanism that preserves the daily REM sleep quota. To be truly homeostatic, the underlying REM sleep hourglass process that keeps track of the cumulated REM sleep time should promote REM sleep in response to REM sleep deficits, as occurs after selective REM sleep deprivation (RD) in humans and rodent models, and postpone REM sleep occurrence when challenged by REM sleep excesses. In the albino rat, short dark pulses (DP) transiently increase REM sleep amount by shortening the latency of NREM to REM sleep transitions, phenomenon known as photic masking. Photic masking provides a useful strategy to explore the REM sleep hourglass process in response to REM sleep excess. Male albino rats were subjected to 4 hours of RD during the rest phase (zeitgeber time, ZT, 4-7; light:dark cycle= 12:12). It was compared the subsequent REM sleep rebound when occurring in the presence or absence of 10-minute DP given in the ZT 8-9 interval. REM sleep rebound in the ZT 8-11 interval after RD was 10.9 minutes and when occurring in the presence of DP was 22.2 minutes. Whereas REM sleep rebound after RD alone fully compensated REM sleep debt within 6 hours, REM sleep rebound with DP provoked a sustained REM sleep excess that was present after 16 hours of recordings. The additive effect of photic masking suggest that REM sleep hourglass process is insensitive to the activation of REM-on neurons targeted by retinofugal projections.

Supported by Guillermo Puelma Foundation.

3. Introducción

3.1 El Ciclo sueño-vigilia

Corresponde a la sucesión de tres estados conductuales excluyentes y obligatorios: Vigilia, sueño NREM y sueño REM (Figura 1). A pesar de que pasamos un tercio de nuestras vidas durmiendo el sueño todavía es un estado que no es comprendido completamente e incluso es difícil de definir (1,2).

A través del estudio polisomnográfico es posible diferenciar los estados del Ciclo Sueño-Vigilia (CSV). Este método de estudio involucra la medición de la actividad cerebral a través del electroencefalograma (EEG), movimientos oculares registrados con un electro-oculograma (EOG) y la medición del tono muscular a través de una electromiografía (EMG).

3.2 Arquitectura del sueño

Cada etapa del CSV posee características polisomnográficas bien definidas que permiten diferenciar los estados entre sí.

La Vigilia se caracteriza por presentar actividad en el EEG de bajo voltaje y alta frecuencia, mientras que el EMG muestra voltaje elevado y variable. El sueño NREM se distingue por un EEG de amplitud elevada, con ondas de baja frecuencia (“desincronizado”), caracterizado por la presencia de ondas delta y husos de sueño, mientras el EMG muestra actividad muscular baja a moderada. Por su parte el sueño REM posee un EEG con ondas de baja amplitud y prominentes ondas theta, junto con EMG de muy baja amplitud (atonía). Durante esta etapa del sueño, la regulación de la temperatura está en un punto bajo (3).

Gracias a la información otorgada por la Polisomnografía es posible configurar un hipnograma, que grafica la sucesión de los estados en función del tiempo.

Los estados del Ciclo Sueño-Vigilia se suceden en orden. El sueño NREM y REM se alternan cíclicamente con una periodicidad de 90-100 minutos en el humano (4). En condiciones fisiológicas las transiciones de vigilia a sueño NREM y de sueño NREM a REM son reversibles; sin embargo la transición de vigilia a sueño REM ocurre siempre a través de sueño NREM y nunca directamente (Figura 1).

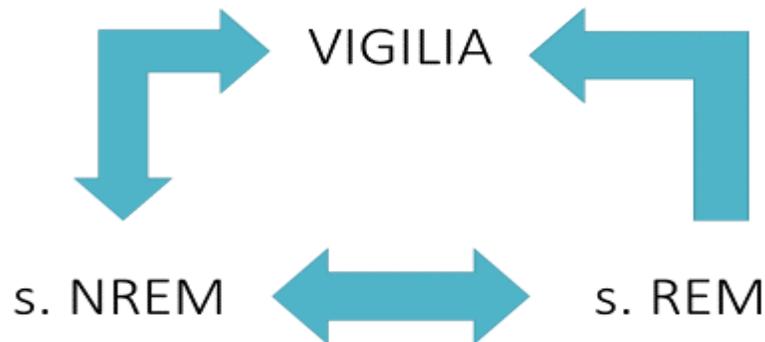


Figura 1. Transición de los estados del Ciclo Sueño-Vigilia. Mientras que la transición de Vigilia a sueño NREM y de sueño NREM a REM son reversibles, la transición de Vigilia a sueño REM no ocurre de manera fisiológica.

3.3 El Modelo de los dos procesos

La duración y distribución temporal de las distintas fases del CSV durante las 24 horas del día pueden explicarse mediante el Modelo del Doble Proceso, propuesto por Borbely en 1982 (5) (Figura 2).

El modelo propone que la mantención dentro de cada uno de los estados del ciclo dependerá de la acción coordinada de dos procesos: Circadiano (Proceso C) y Homeostático (Proceso S). En conjunto determinan el momento en que la “presión o propensión de sueño”, es decir, la probabilidad de pasar de un estado de vigilia a uno de sueño, se modula en una u otra dirección.

Al inicio del día la presión de sueño es pequeña y por lo tanto débil, con un nivel de alerta es alto y déficit del sueño bajo. El proceso Circadiano empuja el estado hacia un estado de vigilia. Al transcurrir el tiempo nuestra deuda de sueño aumenta con lo que nuestro nivel de alerta comienza a debilitarse, el proceso Homeostático se acumula. Esto resulta en un incremento de la presión de sueño y una disminución de la acción del proceso circadiano. Dormir una noche completa disipa la deuda de sueño, y el proceso empieza otra vez. (5)

La acción conjunta y coordinada de estos dos procesos determina el horario de preferencia para la vigilia y el cronotipo (diurno, nocturno, crepuscular) de cada especie. (5, 6, 7).

3.4 Proceso C: Circadiano

La mayor parte de los seres vivos se ha adaptado evolutivamente al movimiento de rotación de la Tierra, gracias a la actividad de un reloj interno (circadiano) que determina variaciones dentro de aproximadamente 24 horas. Tales relojes son ubicuos y se hallan en organismos con varios niveles de organización y complejidad; desde bacterias, hongos, anfibios y reptiles hasta en mamíferos, inclusive en el humano, así también como en plantas (8).

La principal pista temporal para encarrillar el reloj circadiano es la luz del sol (Zeitgeber, del alemán “temporizador”). La sincronización circadiana del ciclo sueño-vigilia con el ciclo día-noche se logra gracias a un pequeño número de células retinales ganglionares (CRG) que responden directamente a la luz y proyectan al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (9).

El ritmo circadiano determina la distribución de la vigilia, del sueño REM y del sueño NREM a lo largo de las 24 horas del día. En la ausencia de control circadiano, por ejemplo después de una lesión del Núcleo Supraquiasmático, el sueño se fragmenta y se distribuye a lo largo del día (10, 11), pero esto no altera la generación del sueño y la vigilia.

De esta manera, gracias a la acción del reloj interno, las diferentes etapas del Ciclo Sueño Vigilia se distribuyen de manera diferencial a lo largo del día, con la vigilia predominando en la etapa de actividad (diurna o nocturna según el cronotipo del animal), sueño NREM en la primera mitad de la etapa de sueño y sueño REM en la segunda mitad de la fase de reposo (12).

3.5 Proceso S: Homeostático

Debido a la acción conjunta del proceso C (circadiano) y el proceso S (homeostático), la “deuda de sueño” se encuentra en un nivel mínimo luego de una noche de sueño, es decir, este déficit se disipa.

En la mañana nuestro nivel de alerta está al máximo y con el paso del tiempo el déficit de sueño aumenta lentamente. Con ello la probabilidad (propensión) de pasar de un estado de vigilia a uno de sueño aumenta.

Mientras que el proceso C persiste relativamente inalterable a lo largo del día sin importar la cantidad de sueño o vigilia del organismo, el proceso S continúa acumulándose a medida que el tiempo de vigilia se prolonga en una curva ascendente saturante (Figura 2).

Estudios de privación de sueño han mostrado una respuesta de intensificación más que de prolongación del sueño NREM (13) determinada a través de la medición del poder espectral de las ondas Delta (14). Esto se interpreta como un signo de profundidad de sueño. La intensidad de las ondas lentas disminuye a medida que transcurren las horas de sueño.

Si luego de una privación a los sujetos experimentales se les permite tomar una siesta la intensidad de las ondas Delta será mayor durante la siesta que durante la noche del mismo día (15, 16). Estos hallazgos se interpretan como una disminución de la propensión, proporcional a la duración e intensidad del sueño.

En un estudio de desincronización forzada en humanos, Dijk et al (2009) demostraron que la presencia de ondas lentas dependía más bien de la historia previa de sueño y vigilia, mientras que el sueño REM era regulado por la acción combinada de los procesos C y S (17).

En resumen, el proceso S defiende los requerimientos diarios de sueño para mantenerlo dentro de un límite mínimo y aceptable (7).

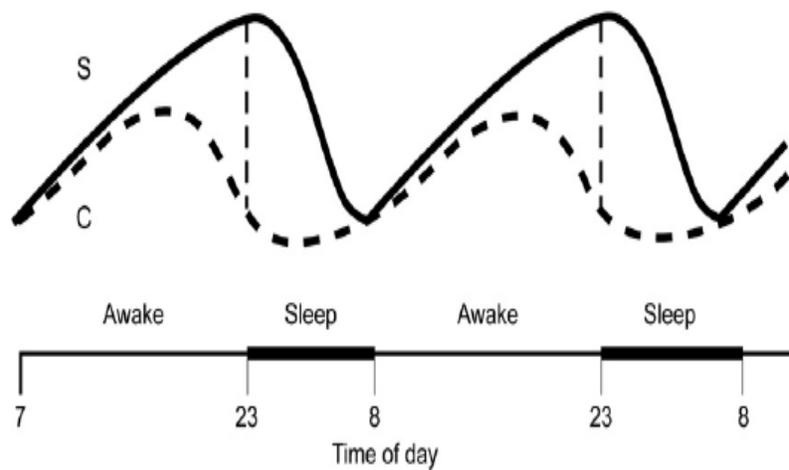


Figura 2. Modelo del Doble Proceso. (Borbely, 1982). Estos dos procesos funcionan simultánea y paralelamente para influenciar el momento y la cantidad diaria de sueño durante el periodo de 24 horas. Para un sueño óptimo ambos procesos deben estar sincronizados.

3.6 Homeostasis del Sueño REM:

Se postula que la homeostasis de sueño REM se comportaría de manera similar a un reloj de arena: la propensión al sueño REM se acumula en el curso de un intervalo sin el estado y se disipa durante el siguiente episodio (18, 19, 20, 21). Si un episodio REM es más largo, la propensión se disipará, por lo que tomará más tiempo obtener la presión suficiente para provocar un nuevo episodio.

Si bien la evaluación homeostática del Proceso S se realiza en función de la intensidad de ondas lentas de sueño NREM, existen varios indicios que apuntan a que el sueño REM también posee una regulación homeostática.

3.6.1: Aumento de la Propensión:

Un estudio de privación selectiva de sueño REM realizado durante tres noches consecutivas, evidenció el aumento de la propensión, interpretado como número de intervenciones necesarias para prevenir la transición de sueño NREM a REM. Este estudio realizado en humanos mostró que a medida que aumentaban las horas de privación se verificó un aumento sostenido de intervenciones. Esto ocurrió también durante los días siguientes, de manera que las intervenciones realizadas durante la tercera noche fueron superiores a la segunda y las de la segunda a la primera (13).

3.6.2: Índice de Transiciones:

La transición de NREM a REM no ocurre abruptamente (14, 22). En las ratas, los episodios de sueño REM siempre son precedidos por un corto periodo denominado de transición que dura de 30-60 segundos. Es caracterizado por un patrón específico de EEG, donde ocurre una caída en la actividad de ondas delta asociado a un aumento de la actividad sigma y theta (18, 23). Sin embargo, en algunos casos, la transición no conduce a REM sino que es seguida por vigilia.

La probabilidad de una transición exitosa a sueño REM ha mostrado estar relacionada cuantitativamente con la presencia de un EEG específico y a patrones autonómicos durante su ocurrencia (18,24).

Estudios de privación selectiva realizados en ratas mostraron un incremento de la transición de NREM a REM durante la recuperación, índice que se incrementa a medida que se prolonga el periodo de privación (25).

3.6.3 Rebote Post-Privación

Se refiere a un incremento en el tiempo en sueño REM posterior a una privación respecto a niveles Baseline, tal como ha sido evidenciado a través de estudios de privación selectiva realizados tanto en ratas, gatos como en humanos, al punto en que el rebote muestra una duración proporcional a la privación precedente. (18, 21, 25, 26, 27)

3.6.4 Tasa de Consolidación:

El estudio realizado por Franken (2002) mostró un incremento de la Tasa de Éxito o de Consolidación luego de una privación total realizada en ratas albinas durante 12 horas. Se interpretó Consolidación como una transición de sueño NREM a REM con una duración del episodio de sueño REM mayor a 30 segundos. A medida que inicia el periodo de recuperación se aprecia una disminución de esta tasa hasta regresar a niveles basales durante la segunda noche de recuperación (7).

Esto significa que posterior a una privación se evidenció un incremento en la duración de los episodios de sueño REM en relación a niveles basales.

3.6.5 Pago de la Deuda

Durante una privación selectiva de sueño REM el tiempo en el estado disminuye progresivamente con niveles negativos respecto a Baseline. Una vez finalizada la privación se aprecia un incremento sostenido del sueño REM hasta regresar a niveles basales, tal como lo demuestra el estudio realizado por Amici (2008). En este caso posterior a una privación selectiva en ratas que duró 24 horas, la deuda obtenida durante el periodo sin sueño REM se recuperó lentamente durante el espacio de cuatro días hasta regresar a niveles basales. A este proceso se le llama el Pago de la Deuda. (28)

Según el concepto de homeostasis, el déficit debe recuperarse en la misma medida en que se produjo la privación para así cumplir con la cuota diaria de sueño REM.

Todos estos hallazgos apuntan a que el sueño REM posee una fuerte regulación homeostática.

3.7 Mecanismo de Producción de Sueño REM

No se conoce el proceso exacto mediante el cual el sueño REM se inicia y mantiene, sin embargo se han planteado varios modelos en base a los conocimientos actuales que intentan explicarlo.

Durante el sueño REM, un grupo de neuronas aumentan su tasa de disparo, mientras que otras disminuyen su actividad. A estas se les llama neuronas REM-on y REM-off respectivamente. La interacción entre estos dos grupos regula el sueño REM. (29, 30).

Dentro de las células REM-on se hallan las neuronas colinérgicas tegmentales pedúnculo pontinas (PP) y Latero-Dorsales (LD) (29, 31), las cuales muestran actividad comparable a la vigilia durante sueño REM. Otro grupo de neuronas REM-on son las del hipotálamo lateral (MHC/GABA) las que estarían también involucradas en el inicio del sueño REM; estas células inhibirían al inicio y durante REM a las neuronas REM-off de los núcleos vIPAG (porción ventrolateral de la sustancia gris periacueductal) y dDpMe (porción adyacente dorsal del Núcleo mesencefálico profundo).

Las neuronas ascendentes glutamatérgicas REM-on del núcleo Sublaterodorsal inducen activación cortical a través de sus proyecciones hacia neuronas de relevo talámicas intralaminares en conjunto con neuronas glutamatérgicas del LD y PP que son REM-on y Vigilia-on, núcleos reticulares mesencefálico y pontino. (32)

Neuronas descendentes REM-ON del núcleo Sublaterodorsal inducirían atonía muscular a través de proyecciones excitatorias hacia pre-motoneuronas GABA/glicenérgicas. Estas células son las responsables de los componentes fásicos y tónicos de sueño REM (33).

Su contraparte son las células REM-off, pertenecientes a núcleos serotoninérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos y presumiblemente histaminérgicos, pertenecientes al Sistema Ascendente Activante (SAA).

Del mismo modo las neuronas del núcleo ventrolateral pre-óptico (VLPO) que se caracterizan por sus proyecciones inhibitorias (GABA/galanina) hacia todos los núcleos del SAA (34), es conocido por ser un núcleo NREM-on, pues su activación determina el paso de Vigilia a Sueño NREM. La actividad de la subpoblación del VLPO extendido, se relaciona con la expresión de sueño REM en ratas (35) y puede jugar un rol en la generación de sueño REM.

Los núcleos REM-on y REM-off interactúan de tal manera que a medida que aumenta el tiempo en sueño REM la estimulación colinérgica de los núcleos pretectales (LTD y PP) hacia los núcleos REM-off se incrementa, determinando la salida del estado hacia sueño NREM. Del mismo modo, mientras se prolonga el tiempo en sueño NREM la auto-inhibición que ejercen los núcleos REM-off (Dorsal del Rafe (DR) y Locus Coeruleus) favorece la transición hacia sueño REM (36).

Estudios recientes sugieren que los mecanismos de control del sueño REM no son tan simples como el encendido o apagado de un interruptor, sino que se encuentran bajo un control temporal dinámico (37).

Varios comportamientos que ocurren durante sueño REM exhiben cambios temporales: twitches musculares, tasa de movimientos oculares rápidos, ondas pontogeniculo-occipitales (PGO) se incrementan progresivamente su frecuencia durante un episodio de sueño REM (37, 38), así como los niveles de actividad muscular en el oído medio y respiratoria (39, 40).

Esto sugiere que el aumento de los niveles fásicos de REM es mediado por una combinación de inhibición que decae y excitación que se incrementa, y que no es un estado homogéneo que se apaga o enciende de manera simple.

3.8 Neuroanatomía Visual

En la capa celular ganglionar, la capa más profunda de la retina, se encuentran las células ganglionares retinales intrínsecamente fotorreactivas. Estas neuronas poseen actividad intrínseca independiente de la acción de Conos/Bastones que ocurre gracias al pigmento melanopsina que poseen (41).

Las células ganglionares retinales (CGR) envían información relacionada con la luz ambiental hacia áreas del cerebro involucradas en tareas no visuales como el encarrilamiento del reloj circadiano, reflejos pupilares y la síntesis de melatonina. Así también se comunica con áreas del Sistema Nervioso Central (SNC) relacionadas con la regulación del sueño (9, 41).

La mayoría de las células retinales ganglionares proyectan al Núcleo Supraquiasmático (NSQ); en menor medida lo hacen hacia la zona subparaventricular ventral (vSPZ), núcleo Vento-lateral Pre-óptico (VLPO), Área Pretectal (PTA) el área intergeniculada (IGL), núcleo geniculado lateral (LGN) y colículo superior (41, 42).

3.9 La Luz y el Efecto Flip-Flop del Ciclo Sueño-Vigilia

Se piensa que la acción de la luz en el Ciclo Sueño Vigilia ocurriría gracias a la acción de un “interruptor” con acciones opuestas según el cronotipo del animal. En animales nocturnos la luz favorecería sueño, mientras que en animales diurnos favorecería vigilia. La presencia de oscuridad generaría el efecto contrario respectivo.

Esta acción opuesta puede deberse a la actividad recíproca entre VLPO, región promotora de sueño y regiones del cerebro promotoras de vigilia.

En el caso de animales nocturnos, la luz activaría las neuronas GABAérgicas y galaninérgicas del VLPO que inhibirían el Sistema Ascendente Activante mediado por aminas. En oscuridad, la falta de activación del VLPO desinhibiría las regiones promotoras de alerta, inclinando el interruptor hacia vigilia. (43)

3.10 Enmascaramiento Fótico

El efecto de enmascaramiento se define como un cambio en el ritmo normal de un animal debido a cambios que ocurren en el ambiente (43). En el caso del Enmascaramiento Fótico el estímulo ambiental sería un cambio lumínico (luz durante la fase de oscuridad u oscuridad durante la fase de luz) y el cambio ocurriría en uno de los estados de comportamiento del Ciclo Sueño-Vigilia.

En 1966 Lisk y Sawyer mostraron que el sueño REM podía ser inducido con una alta probabilidad y corta latencia en la rata albina cuando la luz se apagaba de manera repentina durante sueño NREM. Este efecto de inducción del sueño REM mediante Pulsos de Oscuridad (PO) se observó inicialmente en ratas como las Wistar (44) y las Sprague-Dawley (45,46), pero ha fracasado al intentarlo en ratas pigmentadas (47), por lo que se ha teorizado que está relacionado con componentes del sistema visual afectados por el albinismo (48).

Este efecto de Enmascaramiento Fótico con PO se asocia a las células retinales ganglionares (CRG) intrínsecamente fotorreceptivas que contienen el pigmento melanopsina. No se sabe precisamente qué estructura del sistema nervioso central es responsable de este efecto, pero se piensa que el área pretectal es crucial (49). A pesar de esto, la inducción de sueño REM que ocurre por PO no aumenta la cantidad diaria de sueño REM debido a una disminución compensatoria en los periodos con luz. Esto sugiere que el efecto de enmascaramiento fótico puede estar mediado por el mismo mecanismo que regula el inicio del REM espontáneo (50).

Una vez iniciado el PO, el sueño REM aumenta inmediatamente, lográndose efectos máximos en ciclos de luz-oscuridad de 10 minutos (51).

La consistencia del enmascaramiento y el incremento importante de sueño REM que provoca en la rata albina, convierte a estos animales en un modelo útil para el estudio de la regulación del sueño REM y los efectos de la luz y oscuridad en los sistemas de alerta de manera predecible y mínimamente invasiva (49, 52).

3.11 *El Problema*

El mecanismo detrás del control de sueño REM provoca una respuesta compensatoria (rebote) cuando la vigilia se prolonga debido a una alteración externa (privación). Para ser considerado un verdadero homeostato, la magnitud del rebote de sueño debería ser directamente proporcional al estímulo privación, con un límite determinado por la capacidad máxima compensatoria del sistema.

Varios estudios de privación selectiva del sueño REM, realizados tanto en animales como en humanos, muestran aspectos contradictorios respecto a la homeostasis de este estado, dejando el tópico abierto a discusión (7, 53, 54, 55).

Amici, Ocampo-Garcés y cols realizaron una privación selectiva del sueño REM de ratas al exponerlas a baja temperatura, y observaron un rebote con recuperación completa luego de 3 días (28); sin embargo Zamboni, utilizando el mismo mecanismo de exposición al frío, obtuvo un rebote excesivo al mantener a las ratas en oscuridad continua (56).

Experimentos de privación total de sueño realizados en Tupaya, un mamífero diurno que presenta sueño REM sólo durante la noche, mostraron que el animal recuperó sueño NREM de manera inconsistente (total o parcial según el tiempo de privación), mientras que sólo recuperó una pequeña porción del sueño REM post-privación. (57)

Así también el estrés por inmovilización aplicado en ratas durante 30, 60, 120 o 240 minutos provocó un incremento posterior de sueño REM variable, con estrés leve y severo causando un incremento leve, mientras que el estrés moderado produjo un aumento importante del sueño REM. Esto ocurrió sin necesidad de privación (58). Otro estudio en ratas, en el cual se realizó una inmovilización de 4 horas, mostró nulo incremento posterior de sueño REM (59).

Por lo tanto, hay hallazgos mixtos que no permiten declarar de manera categórica que la regulación del sueño REM es homeostática consistentemente.

4. Hipótesis y Objetivos

Estos antecedentes dan pie a las siguientes interrogantes:

¿Dentro de qué límites es posible manipular la homeostasis de sueño REM?

¿Cómo responderá el rebote post-privación ante la presencia de Enmascaramiento Fótico?

Mientras la mayor parte de los estudios de homeostasis de sueño se enfocan en la Privación y la Recuperación subsiguiente, no se ha explorado suficientemente la estimulación de sueño REM y cómo esto afectaría el sistema homeostático.

La hipótesis planteada es la siguiente:

“La recuperación frente a la privación selectiva de sueño REM mostrará una respuesta homeostática con o sin la presencia de Pulsos de Oscuridad”.

Para corroborar este enunciado, exploramos la respuesta de sueño REM ante una condición de privación selectiva seguida de una estimulación del estado a través de Pulsos de Oscuridad.

Si la hipótesis es verdadera según los antecedentes anteriormente expuestos, entonces la respuesta de recuperación frente a la privación selectiva de sueño REM será homeostática tanto en el rebote espontáneo como frente a la exposición a PO.

4.1 *Objetivos*

Objetivo General

Explorar la homeostasis de sueño REM tanto en una condición de privación selectiva del estado como en una condición de exceso provocado por PO en ratas albinas.

Objetivos Específicos

1. Obtener un registro polisomnográfico continuo en los sujetos experimentales.
2. Realizar una privación selectiva de sueño REM.
3. Registrar la respuesta de recuperación en dos circunstancias (4R: espontánea y 4R10d: enmascaramiento de 10 minutos) para caracterizar el rebote de sueño REM.
4. Registrar la respuesta durante Enmascaramiento Fótico sin privación de sueño REM (Protocolo 10d)
5. Analizar los datos obtenidos y determinar las diferencias en los distintos protocolos.

5. Materiales y Métodos

5.1 Animales experimentales

Se utilizaron 9 ratas adultas Sprague Dawley de sexo masculino adquiridas en el bioterio de la Universidad de Chile, peso 300 gramos aproximados. Fueron mantenidas en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas respectivamente (12:12), con acceso a agua y comida ad libitum durante todo el estudio, y bajo condiciones de temperatura ambiental de 21-24°C. La autorización para la realización de los procedimientos fue otorgada por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) (CBA 0879).

5.2 Etapa quirúrgica

Luego de inducción anestésica, se realizó en cada una de las ratas una incisión superficial de la piel en sentido rostro-dorsal sobre la calota desde anterior hasta 1 cm de terminado el hueso cefálico.

5.2.1 Inserción de electrodos para registro EEG

Dos electrodos corticales laterales permitieron la detección de actividad sigma y delta, mientras que dos electrodos mediales permiten la detección de actividad theta.

Para detección de actividad electromiográfica se insertaron cuatro electrodos en los músculos de la nuca, dos a cada lado de la línea media (Figura 3). En total se implantaron ocho electrodos, fijados con acrílico dental al cráneo.

Se administró terapia antibiótica y antiinflamatoria según protocolo.

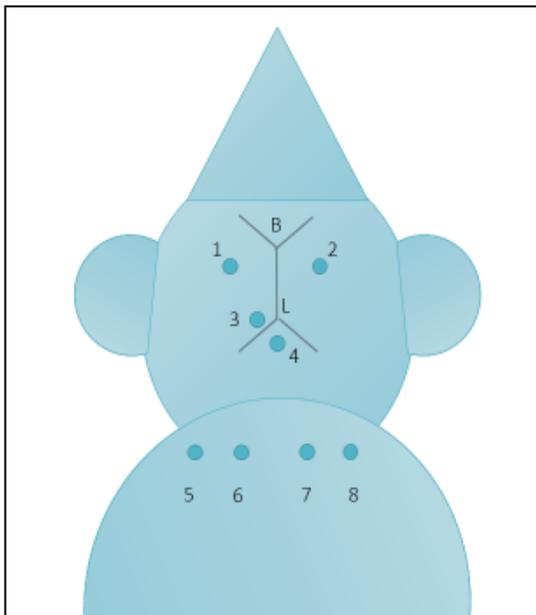


Figura 3. Esquema del procedimiento quirúrgico: 1-4: electrodos corticales y su ubicación. 5-8: electrodos musculares y su ubicación. B: bregma, L: lambda.

5.3 Registro y adquisición de datos

Luego de la cirugía, los animales iniciaron su recuperación sometidos a las condiciones ya mencionadas por una semana antes de ser conectados. Esto se realizó a través de un cable flexible hecho a medida de 50 cms de largo que se unía al implante de manera

reversible. Durante el tiempo de registro de los datos, las ratas pudieron moverse libremente dentro de una jaula 60x60x70 cms, ubicada al interior de una cámara de aislamiento.

El programa de adquisición de datos registró 3 canales de actividad electroencefalográfica y un canal de actividad muscular muestreados a 250 Hz. Cada uno identificó los siguientes elementos relevantes: señal filtrada según bandpass en Delta (Δ , 0,5-30 Hz.), Theta (θ , 3-30 Hz.) y Sigma (Σ , 10-15 Hz.); actividad muscular fue obtenida con bandpass de 70 a 90 Hz.

La cualificación manual del registro se realizó mediante análisis visual off-line a través del software Igor Pro 6.22-A, asignando a cada época de 15 segundos el estado Vigilia, sueño REM o NREM, siempre y cuando el estado ocuparan más del 50% de cada una de estas épocas.

Para tales efectos, se consideran las características ya descritas de cada estado: se asignaría Vigilia frente a la presencia de actividad muscular elevada y desincronización del EEG; sueño NREM cuando se detectara señal con sincronización cortical de amplitud elevada y baja frecuencia, y tono muscular disminuido; por último, se asignó sueño REM cuando el registro EEG mostrara disminución de amplitud y aumento de la frecuencia del asociado a atonía muscular (60).

5.4 Protocolos Experimentales

Luego de la conexión de las ratas, los primeros dos días se destinaron a aclimatación, el tercer y cuarto día a Baseline (BL) e inmediatamente después se dio inicio a los protocolos experimentales, los que fueron realizados de manera aleatoria para cada rata (Figura 4).

Los protocolos implementados fueron los siguientes (Figura 5):

- 4R: Privación Selectiva de Sueño REM durante 4 horas, seguida por recuperación espontánea. (n=9)
- 4R10d: Privación Selectiva de Sueño REM durante 4 horas, seguida por Pulsos de Oscuridad (PO). (n=9)
- 10d: Aplicación de Pulsos de Oscuridad sin Privación. (n=4)

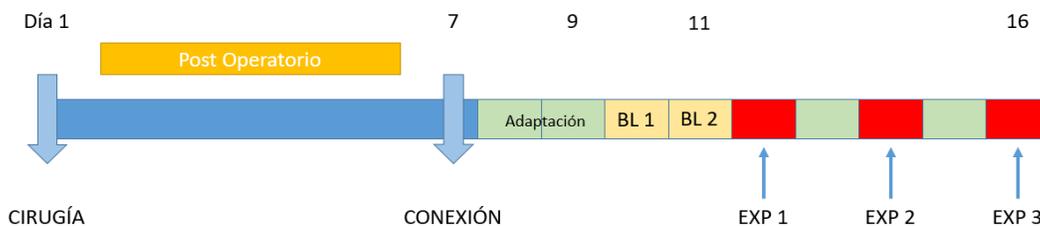


Figura 4. Cronograma de los Protocolos Experimentales.

5.5 Privación Selectiva de Sueño REM

Ya que estudios anteriores han demostrado que una privación de 4 horas continuas es capaz de lograr un aumento importante de la deuda de sueño REM (18, 60, 61), se decidió implementar una privación selectiva de 4 horas. Debido a que la mayor incidencia de sueño REM ocurre durante la segunda mitad de la fase de luz (12), se decidió realizar la privación selectiva en el tercio medio de la fase de reposo, es decir, el intervalo Zeitgeber Time (ZT) 4 a 7, siendo ZT 0 el momento del encendido de luces y por lo tanto, el inicio del día. Combinar estos dos factores nos asegurará generar la mayor propensión posible durante la recuperación.

Bajo atento seguimiento del monitoreo polisomnográfico en tiempo real, apenas aparecen los signos de transición de sueño NREM a sueño REM (disminución

progresiva de los husos de sueño, disminución de la amplitud del EEG, trenes de actividad theta y atonía muscular) (25), se realizó una suave sacudida de la jaula (*gentle shaking*) para sacar a la rata del estado. Esto se realizó a través de un sistema de palanca que se encuentra fuera de la caja de aislamiento.

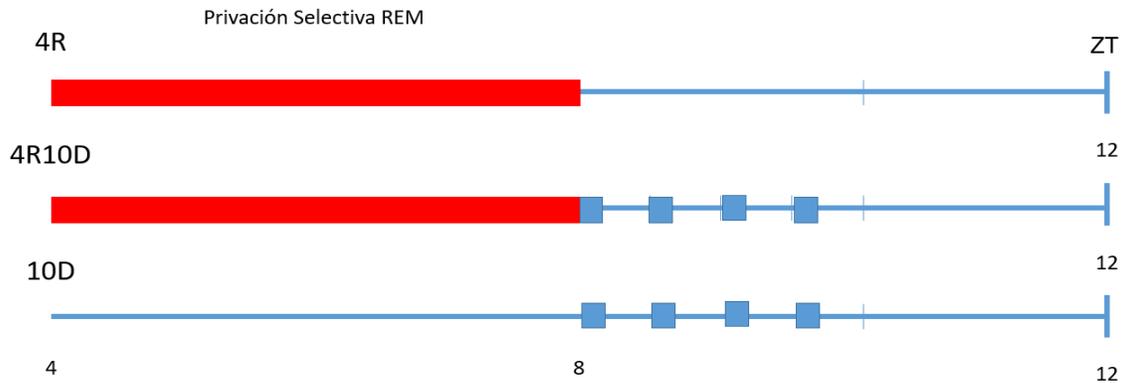


Figura 5. Visión panorámica de los tres protocolos experimentales. Bloque rojo corresponde a las 4 horas de privación. Los cuadrados azules representan los pulsos de oscuridad. Línea horizontal representa tiempo con las horas Zeitgeber (ZT) indicada por los números en la abscisa.

5.6 Enmascaramiento Fótico

En los protocolos 4R10d y 10d se procedió a la administración de Pulsos de Oscuridad (PO) de 10 minutos de duración alternados con 20 minutos de luz. El proceso se repitió en 4 oportunidades hasta abarcar un periodo de 2 horas, ocupando específicamente el intervalo ZT 8-9. El primer PO se administró siempre a la hora ZT 8, es decir, en el caso del protocolo 4R10d, inmediatamente después de finalizada la Privación Selectiva. El protocolo 10d recibió los PO a la misma hora (Figura 5)

5.7 Análisis estadístico

Una vez finalizados los protocolos experimentales y obtenida la información a través del diagnóstico de estado, se realizó el análisis estadístico de los días Baseline (BL) y

los protocolos experimentales. Ya que se contaba con dos días Baseline, los resultados fueron promediados para obtener un solo valor. De las nueve ratas utilizadas en el experimentos, todas fueron sometidas a los protocolos 4R y 4R10d (n=9); sin embargo sólo a cuatro de las nueve se les sometió además al protocolo 10d (n=4).

La cantidad de Vigilia, sueño REM y sueño NREM fueron comparados mediante ANOVA de medidas repetidas (rANOVA) considerando los factores ZT (Zeitgeber u hora del día), Protocolo (BL, 4R, 4R10d, 10d) y la interacción entre ambos factores (ZT x Protocolo). Se consideró un valor estadísticamente significativo aquel con un $p < 0,05$ (corrección de Huynh – Feldt).

Se realizó también un análisis post-hoc mediante test de Student pareado, considerándose significativo un valor de $p < 0,05$.

Todos estos análisis se realizaron a través del programa Stata 10.0 y Excel.

Las variables a evaluar son las siguientes:

5.7.1 Cantidad (en minutos) de vigilia, sueño NREM y REM.

5.7.2 Análisis de Homeostasis de sueño REM:

5.7.2.1 REM / Tiempo de Sueño Total (TST)

Este parámetro se obtiene al considerar el porcentaje que ocupa el sueño REM dentro del tiempo de sueño total (TST), es decir:

$$\text{REM}/(\text{REM} + \text{NREM}) * 100.$$

5.7.2.2 Tasa de Consolidación de los episodios de sueño REM

Se considerará como episodio consolidado aquel que se encuentra por encima del percentil 66 de duración de sueño REM para cada rata en un día BL. La Tasa de Consolidación se calcula a través de la fórmula:

$$(\text{n}^\circ \text{ de episodios consolidados} / \text{n}^\circ \text{ de transiciones}) \times 100.$$

Esta es una medida de homeostasis de largo plazo (7).

5.7.2.3 Tasa de Transiciones

Estima la relación entre transiciones (el paso de sueño NREM a REM) que ocurre en 10 minutos de sueño NREM. Esta es una evaluación de homeostasis de corto plazo (25), y se considera siempre y cuando el sueño NREM supere el 10% del tiempo de registro en la ventana a evaluar.

Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{n}^\circ \text{ transiciones REM} / \text{bines NREM} + \text{bines REM} \times 40.$$

La cantidad de bins que dan cuenta de 10 minutos de registro es 40.

Estas mediciones corresponden al análisis realizado previamente en estudios de sueño y de homeostasis de sueño REM (7, 52, 62).

6. Resultados

6.1 Privación Selectiva de sueño REM: Intervalo ZT 4-7

A medida que progresan las horas de privación, las intervenciones para mantener a la rata fuera del estado sueño REM se incrementaron progresivamente. Durante la privación 4R las diferencias significativas entre intervenciones ocurrieron entre las horas 2-1, 3-1, 4-1 y 3-2 de privación. En 4R10d, la diferencia entre intervenciones ocurrió entre las horas 4-1 (test de t pareado, $p < 0.05$, datos no mostrados).

Durante este periodo hubo un incremento significativo de la vigilia en 4R y en 4R10d (19.6 y 27.9 minutos respectivamente; test de t-pareado, $p < 0.05$). El sueño NREM no fue significativamente afectado durante en este intervalo. (Figura 6)

Por su parte la cantidad de sueño REM en relación a BL disminuyó en un 72 y 78.9% respectivamente, lo que corresponde a una pérdida de 17.6 y 19.3 minutos para cada protocolo (test de t pareado, $p < 0.0001$). Esta diferencia de sueño REM entre 4R y 4R10d no fue estadísticamente importante (test de t pareado: $p = 0.188$).

La Tasa de Transiciones experimentó un incremento sostenido, equivalente al número de intervenciones. Colapsadas en bloques de dos horas, la tasa exhibió valores superiores en los protocolos 4R y 4R10d respecto a BL (test de t pareado: $p < 0.05$). No hubo diferencias entre 4R y 4R10d (Figura 7).

El REM/TST, correspondiente al porcentaje de sueño REM en relación al tiempo de sueño total, mostró una disminución importante durante la privación tanto en el protocolo 4R como en 4R10d respecto a BL (4.4. y 3.71% vs. 15.5 respectivamente; test de t pareado: $p < 0.0001$) (Figura 8).

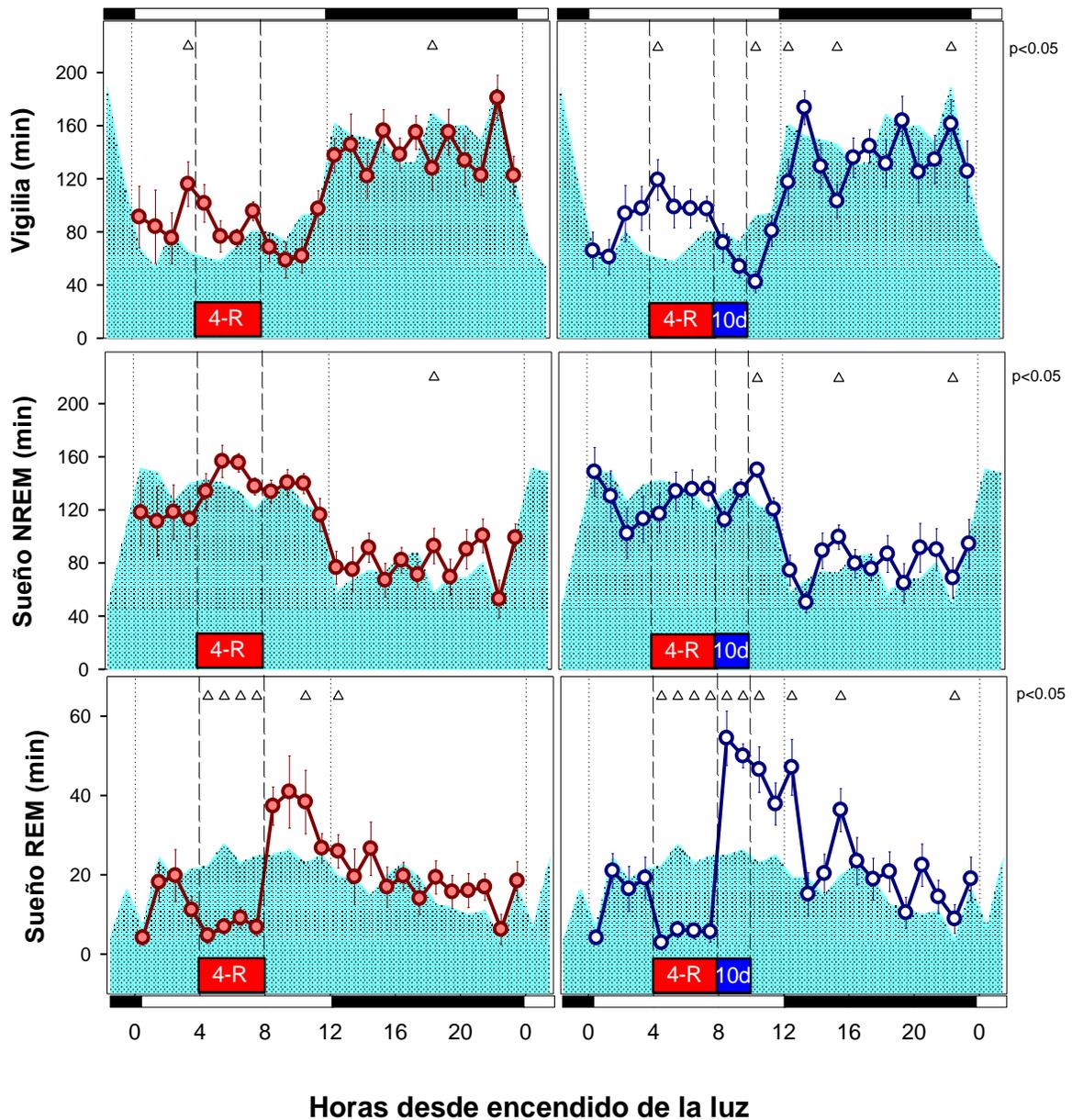


Figura 6. 24 horas de registro electroencefalográfico en tres condiciones: BL (área achurada), 4R (línea roja) y 4R10d (línea azul). Valores por hora (+/- SEM). El cuadro rojo representa el periodo de privación, el cuadro azul el periodo de PO. De arriba hacia abajo se ilustran Vigilia, sueño NREM y sueño REM, duración en minutos. La barra blanca ubicada en el eje de las abscisas muestra el periodo de luz, la barra negra contigua el periodo de oscuridad. Los triángulos marcan horas en que el análisis pareado mostró diferencia significativa en relación a BL ($p < 0,05$). N=9.

A medida que progresaba el tiempo en privación se observó un incremento de la deuda de sueño REM. Este es representado como una diferencia negativa que se incrementa progresivamente, implicando que durante la privación hubo cada vez menos sueño REM en relación a BL (Figura 9). Llegando a la hora ZT 5, la segunda hora de privación, la diferencia de sueño REM entre protocolo experimental y BL se convirtió en significativa (dato no mostrado). La diferencia fue máxima en la hora ZT 7 (cuarta hora de privación).

Ambos protocolos exhibieron un perfil de acumulación de deuda similar con una pérdida total de 22.2 y 22.0 minutos de sueño REM en 4R y 4R10d respectivamente.

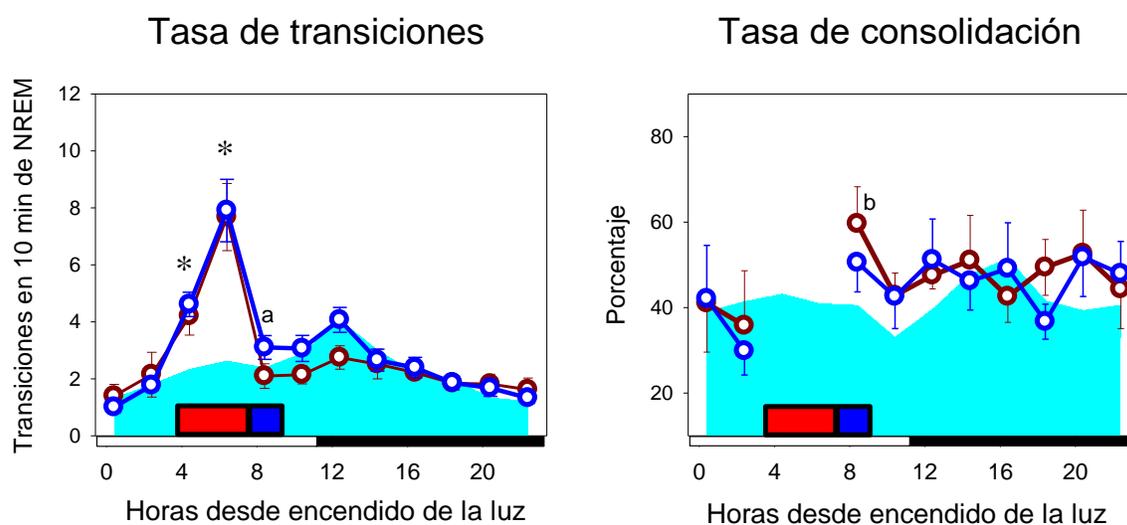


Figura 7. Tasa de transiciones y de consolidación. Cada círculo representa los valores promedios de dos horas (\pm Error Estándar, N=9) Línea azul, protocolo 4R10d; línea roja, protocolo 4R. Área calipso representa los valores de BL. El cuadro rojo sobre la abscisa muestra el tiempo de privación, cuadro azul el periodo de PO. Izquierda: Tasa de Transición durante 24 horas ZT, expresada en cantidad ocurrida en 10 minutos. Cada valor corresponde a 2 horas de registro. Asterisco (*) muestra una tasa significativamente superior a BL en ambos protocolos (test de t pareado: $p < 0.009$). Letra (a) marca las dos horas posteriores a la privación, donde el índice fue superior en 4R10d respecto a 4R (test de t pareado: $p = 0.035$). Derecha: Tasa de consolidación expresada en porcentaje de episodios consolidados. Letra (b) marca la tendencia de 4R a obtener una tasa mayor en relación a BL (test de t pareado: $p = 0.064$).

6.2 Recuperación de la deuda y Rebote de sueño REM: ZT 8-11

El análisis del intervalo ZT 8-11 detalla las 4 horas posteriores a la privación, correspondientes a las últimas horas del periodo de reposo, previas al apagado de luces.

El la cantidad de sueño REM se incrementó en ambos protocolos, 4R y 4R10d, respecto a BL en 10.9 minutos ($p=0.039$, test de t pareado) y 22.3 minutos ($p=0.002$, test de t pareado) respectivamente. El incremento de sueño REM en 4R10d fue superior al de 4R ($p=0.025$, test de t pareado) (Figura 6).

Si se considera sólo el intervalo ZT 8-9, momento en el que se administraron los pulsos de oscuridad, el incremento del tiempo en sueño REM del protocolo 4R10d fue significativamente superior al del protocolo 4R, específicamente 6.6 minutos mayor ($p=0.040$, test de t pareado).

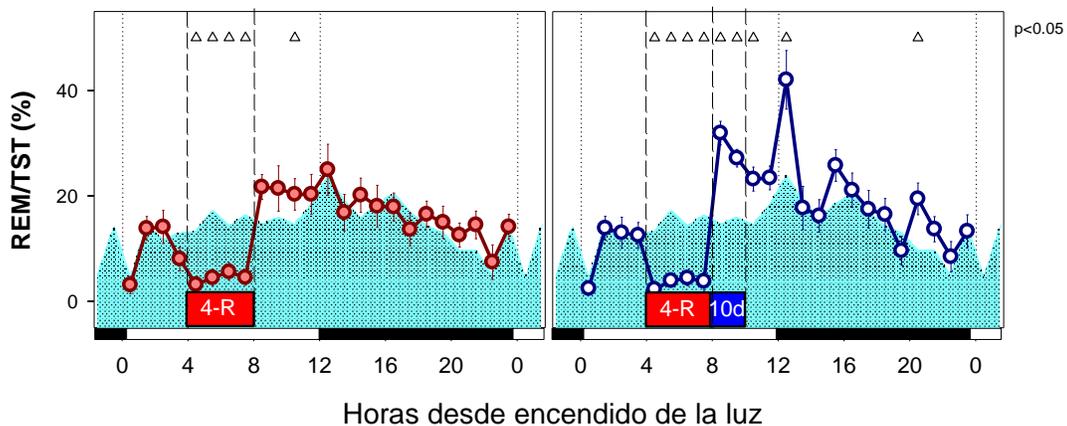


Figura 8. En el eje de las ordenadas se muestra el REM/TST, en las abscisas horas desde el encendido de luces. Valores por hora (+/- SEM). Barra inferior blanca ilustra el periodo de luz, barra negra el periodo de oscuridad. Área achurada corresponde a niveles BL, líneas superpuestas: roja equivale a protocolo 4R, azul a protocolo 4R10d. Cuadro inferior rojo muestra el periodo de privación, cuadro azul el periodo de PO. Triángulos blancos marcan horas en que hubo diferencia significativa entre protocolos de privación en comparación a BL.

El protocolo 4R10d mostró una Tasa de Transición mayor a la de 4R ($p=0,035$) durante este periodo. Considerando sólo el intervalo ZT 8-9, momento de administración de los Pulsos de Oscuridad, 4R10d fue significativamente superior a 4R (Figura 7).

La Tasa de Consolidación del protocolo 4R exhibió un incremento de 38% (test de t pareado: $p=0.053$) durante el bloque ZT 8-11, aumentando de 36.0 en BL a 50.1. Por su parte el protocolo 4R10d no mostró tendencia al incremento. (Figura 7).

Durante el intervalo ZT 8-11 el porcentaje de REM/TST en Baseline fue de 16,1%. En el mismo periodo ambos protocolos mostraron un incremento de este porcentaje, siendo de 20,8% en 4R mientras que en 4R10d fue de 26,3%.

Comparando este parámetro en el análisis pareado, el incremento de REM/TST durante el intervalo ZT 8-11 de 4R fue estadísticamente superior al de BL ($p=0,02$). Por su parte el incremento experimentado en 4R10d fue superior a BL ($p=0,002$) y a 4R ($p=0,013$).

Durante este periodo la deuda del protocolo 4R mostró una recuperación continua en el tiempo hasta regresar a valores cercanos a los de BL. En contraste, el protocolo 4R10d exhibió una pendiente de recuperación mucho más marcada, que superó incluso los niveles BL (Figura 9).

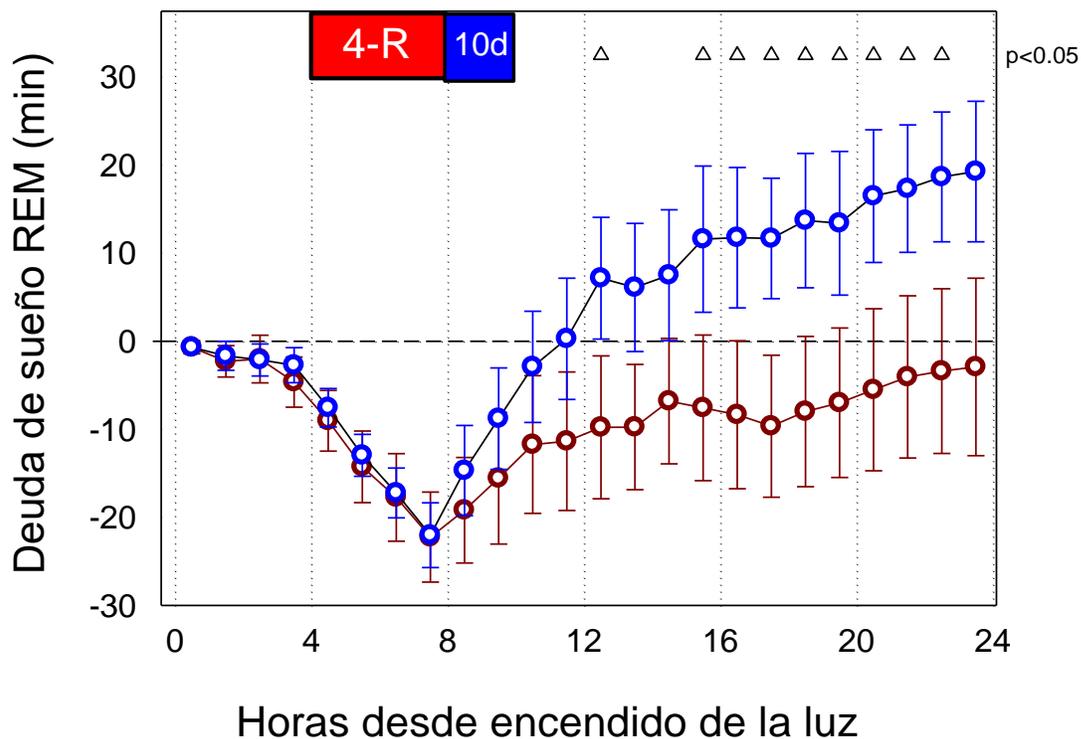


Figura 9. Deuda de sueño REM calculada como tiempo en REM acumulado durante la privación respecto a BL. Línea punteada ilustra niveles BL. Línea roja representa protocolo 4R; línea azul representa protocolo 4R10d. El cuadro rojo bajo abscisa superior indica el periodo de privación, y el cuadro azul el periodo de aplicación de PO. Los triángulos indican diferencia significativa de protocolo 4R10d respecto a 4R.

Considerando sólo el intervalo ZT 8-9, correspondiente al momento de administración de los pulsos de oscuridad, en el protocolo 4R10d se obtuvo un valor de 29.4% para REM/TST, muy superior al observado en BL (15.7%, test de t pareado: $p=0.001$) y a 4R (21.6%, test de t pareado: $p=0.026$).

El REM/TST del protocolo 4R mostró además un incremento significativo en la hora ZT 10 (tres horas post-privación); mientras que el protocolo 4R10d mostró incremento respecto a BL durante las horas ZT 8, 9 y 10 (test de t pareado: $p<0.025$) (Figura 8).

En la figura 10 se puede apreciar cómo los pulsos de oscuridad se asociaron a incremento del tiempo en sueño REM en el protocolo 4R10d. Aun sin la necesidad de privación de sueño, los PO por sí mismos provocaron un incremento de sueño REM en el protocolo 10d (Figura 11).

Se realizó un análisis de ANOVA de una vía para los 40 minutos equivalentes al momento de aplicación de PO (Pulsos de 10 minutos repetidos cuatro veces). Se comparó este periodo en las condiciones BL, 4R, 4R10d y 10d, siempre y cuando la cantidad de sueño NREM superara el 10% del registro.

El efecto de *enmascaramiento* generó un incremento del sueño REM tanto en el protocolo 10d como en 4R10d. En el caso de 10d, la cantidad de sueño REM obtenido producto de los Pulsos de Oscuridad fue superior al del mismo periodo en BL por 1.5 minutos ($p=0.01$, test de t no pareado). Por su parte 4R10d obtuvo un incremento de sueño REM que fue superior a 4R por 1.7 minutos ($p<0.001$, test de t no pareado) (Figura 11).

El incremento experimentado en 10d respecto a BL (1.5 minutos) y el de 4R10d respecto a 4R (1.7 minutos) fue estadísticamente igual (Figura 11).

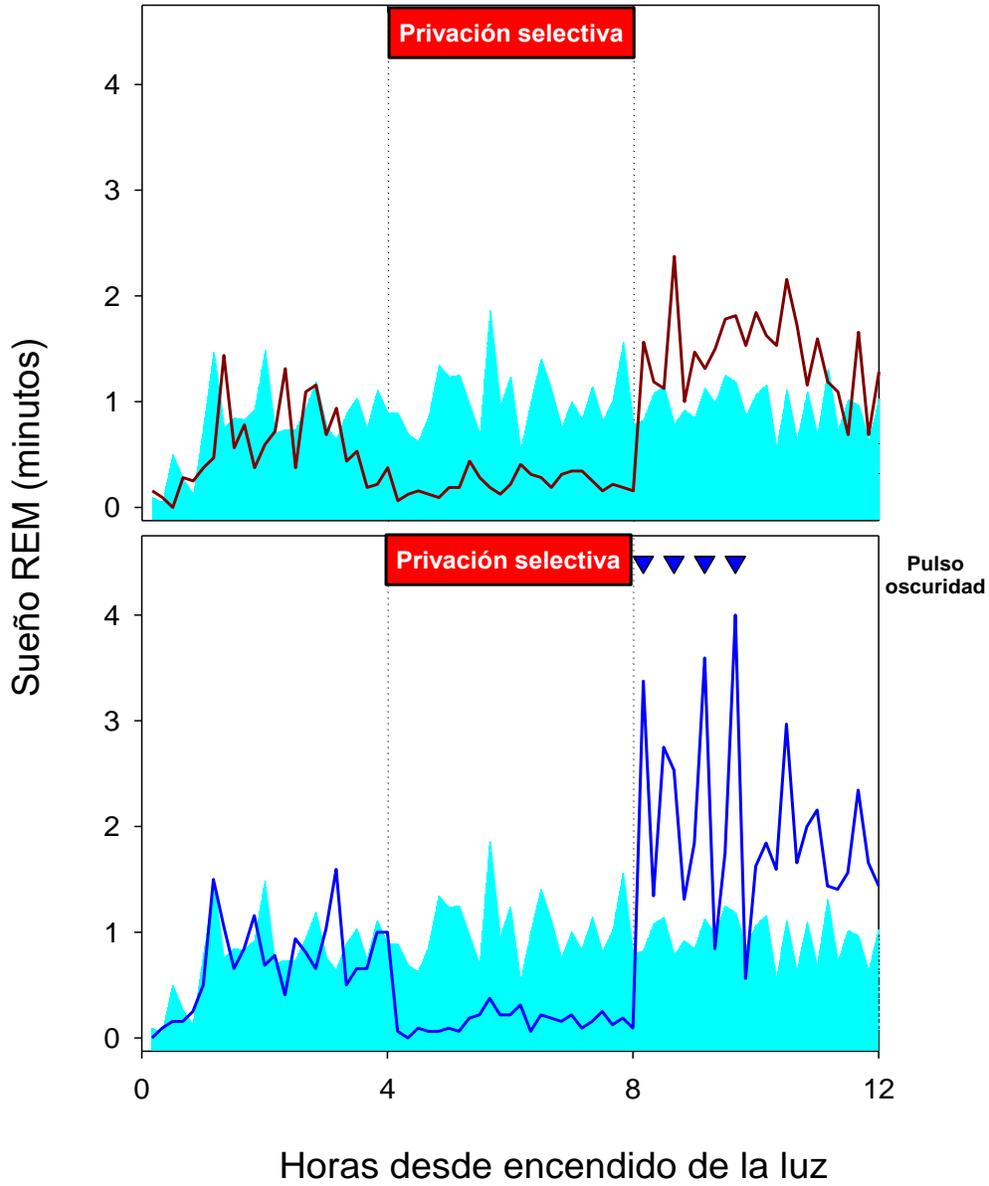


Figura 10. Sueño REM en las condiciones BL (área azul), 4R (n=9, línea roja en el gráfico superior) y 4R10d (n=9, línea azul en el gráfico inferior) presentados mediante resolución temporal de 10 minutos. Triángulos azules ilustran la aplicación de PO de 10 minutos. Cuadro rojo corresponde al tiempo de privación.

6.3 Recuperación durante el periodo de actividad: ZT 12 a 24.

La hora ZT 12 representa el momento del apagado de luces y el inicio del periodo de reposo de la rata. En esta hora se registró un incremento significativo de sueño REM en los protocolos 4R y 4R10d. El análisis pareado mostró que el sueño REM en ZT 12 de 4R y 4R10d fue mayor al del mismo periodo en BL ($p=0,011$ y $p=0,006$ respectivamente). El incremento apreciado en 4R10d fue superior al de 4R ($p=0,021$) (Figura 6).

El análisis pareado de REM/TST mostró que el parámetro en ZT 12 fue significativamente superior en 4R10d al comparársele con BL ($p=0,014$), pero no en 4R. (Figura 8)

Durante el resto del periodo de actividad observamos que siguiendo con la tendencia descrita en el periodo de recuperación ZT 8-11, el incremento de sueño REM experimentado durante 4R10d fue superior tanto respecto a BL (horas ZT 15 y 22) como a 4R (hora ZT 15) (Figura 6).

Durante ZT 12-24 la deuda de sueño REM del protocolo 4R no mostró una diferencia significativa en relación a BL, sin embargo en el protocolo 4R10d sí hubo una variación importante. La recuperación de la deuda de 4R10d fue superior a los valores BL durante las horas ZT 21, 22 y 23 ($p<0.05$). Si se compara la deuda de sueño REM de 4R10d con 4R la diferencia es incluso mayor, con valores significativamente superiores durante la hora ZT 12 y desde la hora 15 hasta la 22 ($p<0.05$). (Figura 9).

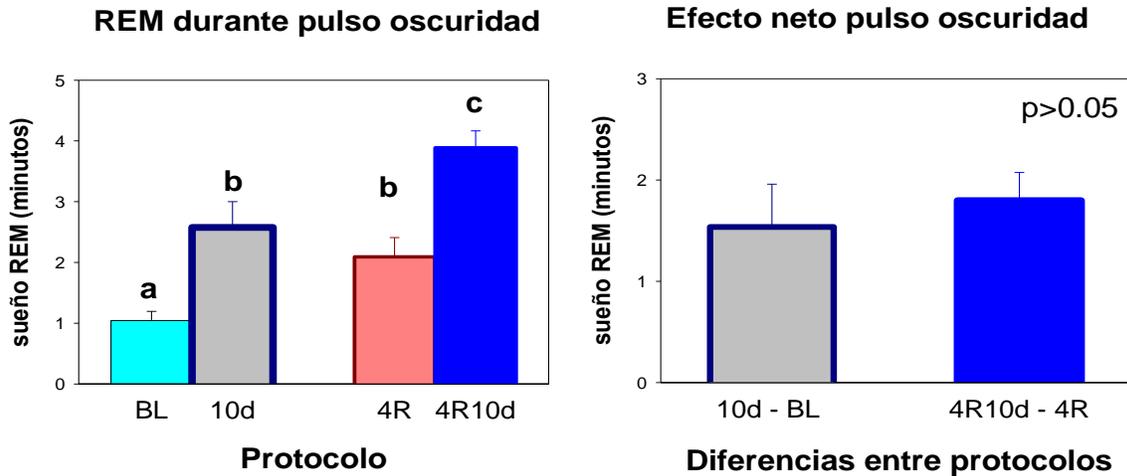


Figura 11. Izquierda: Comparación de la cantidad de sueño REM en minutos durante los cuatro pulsos de oscuridad de 10 minutos. Las letras minúsculas indican cantidad de sueño REM obtenido durante los 40 minutos de Enmascaramiento Fótico. $a < b < c$. La cantidad de sueño REM en el periodo equivalente a la administración del pulso de oscuridad en BL (a) fue menor a 10d y a 4R (b); letra b indica que la cantidad de sueño REM de 10d=4R. La letra c (4R10d) indica que en ese periodo se obtuvo la mayor cantidad de sueño REM ($p < 0.05$, test de student no pareado con corrección de Bonferroni). Derecha: Efecto neto del PO. La barra de la izquierda muestra la diferencia entre la cantidad de sueño REM obtenido en el protocolo 10d menos el sueño REM del mismo periodo en BL. La barra de la derecha muestra la sustracción entre 4R10d y 4R. Ambos valores reflejan el efecto neto del Pulso de Oscuridad. No hay diferencias entre ambas barras ($p = \text{no significativo}$).

7. Discusión

7.1 Privación y homeostasis.

A medida que el tiempo de privación aumentó fue evidente que los intentos por transitar de sueño NREM a REM se incrementaron y en consecuencia las intervenciones para prevenir la transición también.

Esto muestra un aumento de la propensión producto de la acumulación de la deuda de sueño REM durante la privación (Figura 9) (13, 18, 61). Como consecuencia se anuló significativamente la Tasa de Consolidación, mientras que la Tasa de Transiciones se elevó por encima de niveles basales durante el mismo periodo.

La privación logró suprimir efectivamente el sueño REM, lo cual es evidenciado por una disminución importante del tiempo en sueño REM y del REM/TST durante el periodo; mientras que la cantidad de sueño NREM no fue afectada en comparación a BL.

Es preciso mencionar que sí hubo un incremento significativo del tiempo en vigilia durante ambos protocolos de privación respecto al BL atribuible a las intervenciones. Este hecho no debería alterar los resultados posteriores.

7.2 Rebote post-privación

Una vez finalizadas las 4 horas de privación, se observó un efecto de rebote en el cual la deuda provocada fue saldada con un incremento significativo de tiempo en sueño REM, efecto apreciado en ambos protocolos de privación con respecto al BL.

En el caso del protocolo 4R, la deuda fue saldada a lo largo de las horas hasta regresar a niveles basales al final del día, resultado que apoya la teoría de una regulación homeostática de sueño REM con un sistema que tiene por fin mantener los niveles de este dentro de límites finitos (24, 25, 26, 29).

Estudios de privación total mostraron una recuperación de sueño REM de 70% luego de 12 horas de recuperación y 84% luego de 24 horas (7), por lo que nuestros hallazgos están en línea con resultados anteriores.

Sin embargo, mientras que en el protocolo 4R el sueño REM regresó a niveles cercanos a los basales, en el protocolo 4R10d experimentó un rebote significativamente superior a BL y a 4R. El incremento no sólo ocurrió durante las horas inmediatamente posteriores a la privación, sino que se extendió incluso durante el periodo de actividad de la rata.

El REM/TST mostró un incremento significativo respecto a BL durante el rebote en ambos protocolos de privación. En el caso del intervalo ZT 8-11 el parámetro fue superior en el protocolo 4R respecto a BL, mientras que en el mismo periodo los valores de 4R10d superaron tanto a 4R como a BL. Particularmente durante el intervalo ZT 8-9, momento en que se administraron los pulsos de oscuridad, 4R10d mostró incremento significativo del parámetro. Esto demuestra que a pesar que la privación provocó un aumento en la cantidad de sueño REM durante el rebote este no ocurrió a expensas de un aumento de sueño NREM, sino por un aumento de la presión homeostática al sueño REM, propensión que en el caso del protocolo 4R10d fue categóricamente superior a 4R.

Durante las dos horas de administración de los PO (intervalo ZT 8-9) hubo un incremento significativo de la Tasa de Transiciones en el protocolo 4R10d en comparación con 4R. Sin embargo la Tasa de Consolidación de los protocolos 4R y 4R10d no mostró diferencias respecto a BL durante el rebote.

En estudios previos la activación optogenética de los núcleos colinérgicos pretectales REM-on (TPP, TLD) aumentó el número de transiciones de sueño NREM a REM, sin modificar la duración éstos (63). Esto nos permite inferir que el Enmascaramiento Fótico posiblemente actuó activando estos núcleos REM-on, lo que provocó un

incremento en las transiciones de NREM a REM durante ese periodo, aumentando la Tasa de Transición, pero no la Tasa de Consolidación.

Este resultado se contrapone a los hallazgos realizados en investigaciones anteriores (7), quienes encontraron un aumento sustancial de la Tasa de Consolidación y de la Tasa de Transición de sueño REM después de una privación total o selectiva.

7.3 Enmascaramiento Fótico

Durante el protocolo 4R10d se apreció un incremento del tiempo en sueño REM y del REM/TST durante el intervalo de administración de los PO (ZT 8-9) que superó los valores mostrados por BL y 4R. El incremento fue persistente, mostrándose un incremento del estado que se prolongó incluso durante la fase de actividad de la rata.

Este efecto de Enmascaramiento Fótico ocurre gracias a la activación de las CGR, las cuales envían aferencias a numerosos núcleos del sistema nervioso central relacionados con efectos no visuales de la luz encargados de la regulación circadiana, la atención y el comportamiento (9, 41). Algunas de las aferencias de las CGR que pudieran estar relacionadas con el ciclo Sueño Vigilia y el efecto del Pulso de Oscuridad son el hipotálamo lateral, la sustancia gris periacueductal, el núcleo del Rafe Dorsal, la Lámina intergeniculada y el VLPO (42).

Es posible que el efecto de enmascaramiento tenga su origen en núcleos troncales que inhiben el Sistema Ascendente Activante. Por ejemplo es sabido que el VLPO extendido tiene una acción inhibitoria de los núcleos responsables de mantener la vigilia a través de proyecciones de GABA y galanina (34) y estudios en ratas le atribuyen un rol en la expresión de sueño REM (35, 64). Así también esta área recibe aferencias de las CGR que podrían explicar el efecto de enmascaramiento e incremento de sueño REM (41).

El área pretectal también parece ser crucial en el fenómeno de Enmascaramiento fótico (49). Esta área tiene proyecciones directas hacia núcleos colinérgicos REM-on:

el núcleo Tegmental Laterodorsal (TLD) y el núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino (TPP) (65, 66), por lo que se piensa que el efecto de Enmascaramiento actúa directamente en el área troncal de control de sueño REM. Lesiones del área pretectal eliminaron de manera casi completa la respuesta aguda frente a PO (49, 67).

Así también se ha visto una proyección directa desde la retina a los Núcleos del Rafe Dorsal (68), un núcleo monoaminérgico REM-off que a través de la liberación de serotonina inhibe núcleos colinérgicos REM-on (69) y que se sugiere realizan sinapsis directa con neuronas del núcleo TLD (70). Por lo tanto se piensa que podría jugar un rol en la respuesta de Enmascaramiento Fótico.

Algunas estructuras subcorticales también pueden estar involucradas, específicamente la Lámina Intergeniculada del Núcleo Genuculado Lateral que se conecta de manera bidireccional con los núcleos tegmentales LD y el PP (71).

Aunque el mecanismo exacto por el cual se produce el Enmascaramiento es desconocido, de alguna manera el cambio brusco de la condición lumínica estimula en la rata albina un conjunto de núcleos relacionados con el control del sueño REM favoreciendo la transición de sueño NREM a este estado (Figura 12).

Ya que la transición provocada por los Pulsos de Oscuridad es idéntica a la que ocurre en condiciones basales desde un punto de vista electroencefalográfico y autonómico (24) se ha sugerido que el efecto Enmascaramiento puede estar mediado por el mismo mecanismo que regula el inicio del sueño REM (50).

El efecto de la luz y oscuridad no se limita sólo a la transición a sueño REM ni afecta exclusivamente a la rata albina, sino que modula de manera importante el ciclo Sueño Vigilia de todas las especies de mamíferos al punto en que algunos autores han planteado añadir un tercer proceso a los dos propuestos por Borbely (5), un tercer proceso modulado por la luz, que actúa a través de las células ganglionares retinales intrínsecamente fotorreactivas y los conos/bastones (43).

La fase de luz y oscuridad determinan efectos diferenciales de manera que durante el periodo de luz el input fótico es mediado principalmente por conos/bastones y en menor medida por melanopsina (CGR), mientras que por la noche es la melanopsina el pigmento responsable de los efectos en el sistema nervioso central (43). Esta alternancia de luz y oscuridad determina el nivel de alerta, la calidad del sueño y el momento en que estamos dormidos o despiertos. Esta acción ocurre en conjunto con los procesos C (Circadiano) y S (homeostático).

7.4 Alteraciones de la rata albina

En 1965 Lund describió las diferencias de la vía visual de la rata albina. Mientras que los animales pigmentados poseen un nervio óptico cuyas fibras decusan en el quiasma óptico en un 50%, un 90-99% de las fibras de la rata pigmentada cruzan para realizar sinapsis en áreas contralaterales del cerebro (48).

Estudios más recientes en retinas de ratón albino y la comparación con su contraparte pigmentada muestran diferencias en las células ganglionares retinales de ambas. En el animal albino, las CGR poseen un soma de mayor tamaño y también son más numerosas, sin embargo si se considera únicamente a las CGR intrínsecamente fotorreactivas, la cantidad en ambos tipos de animales es la misma. Sí existe una diferencia en la distribución de las células que poseen melanopsina, siendo más abundantes en la porción superior de la retina del ratón albino. (72).

En ratas albinas se aprecia un incremento de la proyección a la Lámina Intergeniculada contralateral en comparación con animales pigmentados (73). Esto reafirma la hipótesis de que el efecto de los PO está relacionado con componentes del sistema visual afectados por el albinismo.

Sin embargo si estas diferencias citadas contribuyen al efecto de enmascaramiento y cómo esto ocurre exactamente, es desconocido.

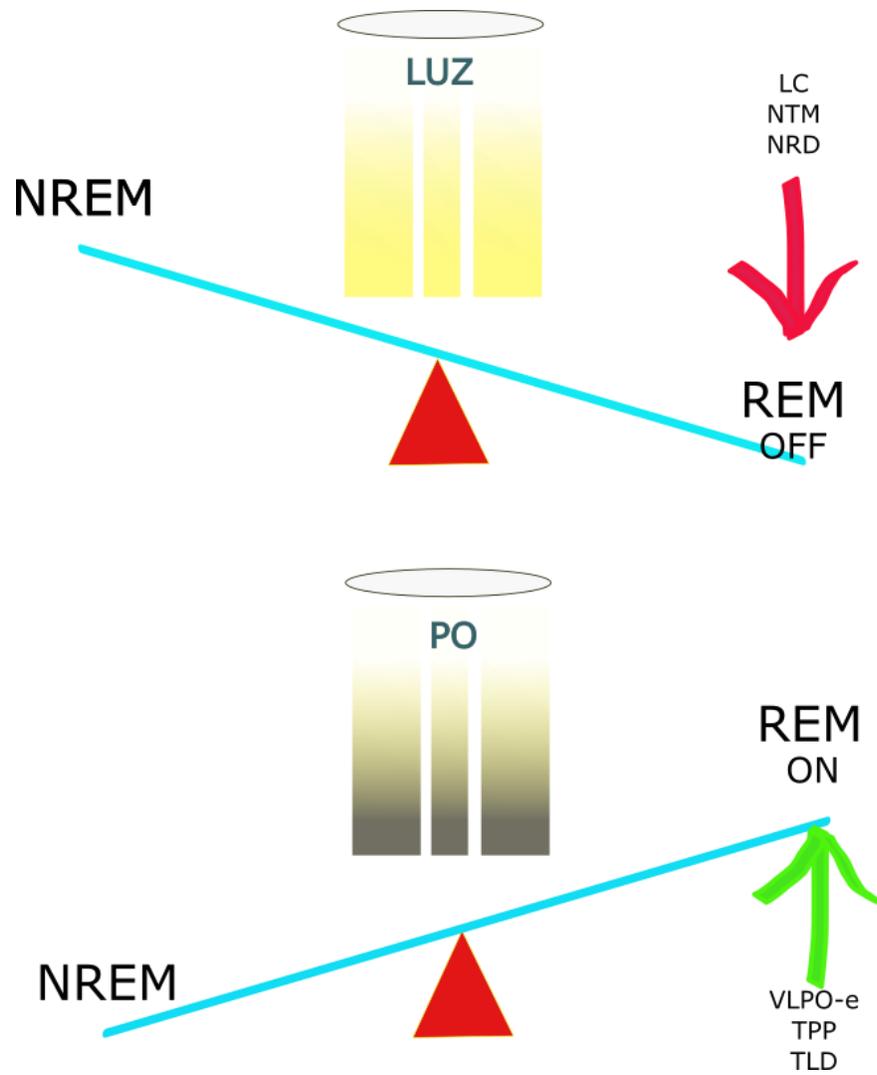


Figura 13. Efecto hipotético de los PO en los núcleos involucrados en la transición de sueño NREM a REM. LC, Locus Coeruleus; NTM, Núcleo Túbromamilar; NRD, Núcleos del Rafe dorsal; PO, Pulso de Oscuridad; VLPO-e, Núcleo ventro-lateral pre-óptico extendido; TPP, Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino; TLD, Núcleo Tegmental Latero-dorsal.

7.5 Rol de la luz en el comportamiento humano

La acción de las CGR también regula la conducta humana a través de efectos no visuales, modulando el rendimiento cognitivo, el alerta y el bienestar (74, 75).

Este efecto de la luz en la conducta dependerá de la intensidad, la duración y el momento del día en que ocurra la exposición a la luz (76). El largo de onda, equivalente al color de la luz, también determinará una mayor o menor activación de la célula retinal ganglionar, cuya máxima actividad ocurre frente a la exposición a la luz azul (longitud de onda 460-480 nm) (77) lo cual produce supresión de los niveles nocturnos de la hormona pineal melatonina (78).

Esta regulación fótica del alerta depende de manera crítica de la composición de la luz, con luz azul como un estímulo poderoso del alerta, contrario a la luz verde, que es menos poderoso para despertar a un sujeto del sueño. (76).

La exposición a luz azul por la noche ha mostrado aumentar el alerta y mejorar el rendimiento en tareas con tiempo de reacción, probablemente como resultado de la supresión de la elevación nocturna de melatonina, lo que conduce a una fase de retraso circadiano (76, 79).

Ya que las estructuras neurales que responden a luz tienen un efecto importante en el comportamiento humano y los mamíferos en general, es importante comprender qué estructuras están involucradas en estas respuestas fóticas.

7.6 Resultados esperados versus Resultados obtenidos

Si se estimula el sueño REM mediante Pulsos de Oscuridad, se esperaría que un sistema de control registrara el exceso y con el fin de mantener los niveles de sueño REM dentro de límites establecidos, disminuyera la cantidad del estado posterior como una reacción compensatoria al enmascaramiento.

Esto fue lo que ocurrió en una investigación realizada por Baracchi (2008) donde apreciaron una reacción de disminución de sueño REM posterior a la administración de Pulsos de Oscuridad (24).

Este antecedente aunado a estudios de privación selectiva de sueño REM (18, 21, 25, 26, 28) nos permiten predecir el comportamiento de cada protocolo. En el caso de 4R se espera una acumulación de la deuda durante la privación y el pago de la misma en la recuperación hasta volver a niveles basales; en el caso del protocolo 10d se espera un incremento de sueño REM producto del enmascaramiento con una disminución compensatoria posterior; y por último en el protocolo 4R10d se esperaba una respuesta combinada de ambas condiciones: un incremento de la deuda durante la privación y una recuperación post-privación que regresara a niveles basales con una pendiente más pronunciada durante el tiempo de administración de Pulsos de Oscuridad, alcanzando antes que 4R los niveles de sueño REM del baseline, pero sin superarlos (Figura 13).

Sin embargo los resultados obtenidos fueron muy diferentes. En el caso de 4R, la privación y la recuperación se comportaron como se había esperado, sin embargo en 4R10d se produjo un incremento del tiempo en sueño REM y del REM/TST que sobrepasó a BL y a 4R sin una reacción compensatoria. Esto nos hace predecir que 10d no mostrará la disminución compensatoria descrita previamente y que el efecto del Pulso de Oscuridad se sumará al sueño REM controlado homeostáticamente.

Si comparamos el análisis de los 40 minutos en que se realizó el Enmascaramiento Fótico, equivalente a cuatro periodos de 10 minutos de Pulsos de Oscuridad durante ZT 8-9, y los comparamos con el periodo equivalente en BL y 4R, la cantidad de sueño REM obtenida en el protocolo 4R10d fue equivalente a la sumatoria del sueño REM obtenido en 4R y 10d.

Esto permite deducir que el incremento de sueño REM en 4R10d se debió a la combinación de los factores privación selectiva y Pulsos de Oscuridad. Mientras que

la privación y la recuperación del protocolo 4R permaneció dentro de un límite finito sometido a la regulación de un sistema estricto, el sueño REM extra obtenido mediante el Enmascaramiento Fótico en el protocolo 4R10d no fue considerado por el sistema homeostático, sino que más bien fue superpuesto al proceso de recuperación post-privación.

7.7 Análisis Futuros

No conocemos al momento cómo se comportará el sueño REM el día posterior a los protocolos experimentales 4R y 4R10d, si la cantidad de estado regresará a un estado basal, si se mantendrá el incremento o si se realizará un ajuste con disminución compensatoria.

En el caso del protocolo 10d será interesante confirmar si los Pulsos de Oscuridad provocan un incremento sumatorio de sueño REM equivalente al obtenido en el protocolo 4R o si este incremento se limitará a los 40 minutos de Enmascaramiento para volver después a niveles BL. (Figura 13)

Otra consecuencia probable sería observar una disminución compensatoria posterior al incremento de sueño REM provocada por los PO, de manera similar a los resultados obtenidos por Baracchi (24). Si así ocurriera, luego de finalizado el Enmascaramiento Fótico se observaría una menor cantidad de sueño REM en comparación con BL. De este modo no habría variación global al comparar los resultados de 10d con BL, pues el sistema, reaccionando homeostáticamente frente a la estimulación artificial de sueño REM, lo compensaría con una inhibición (Figura 13).

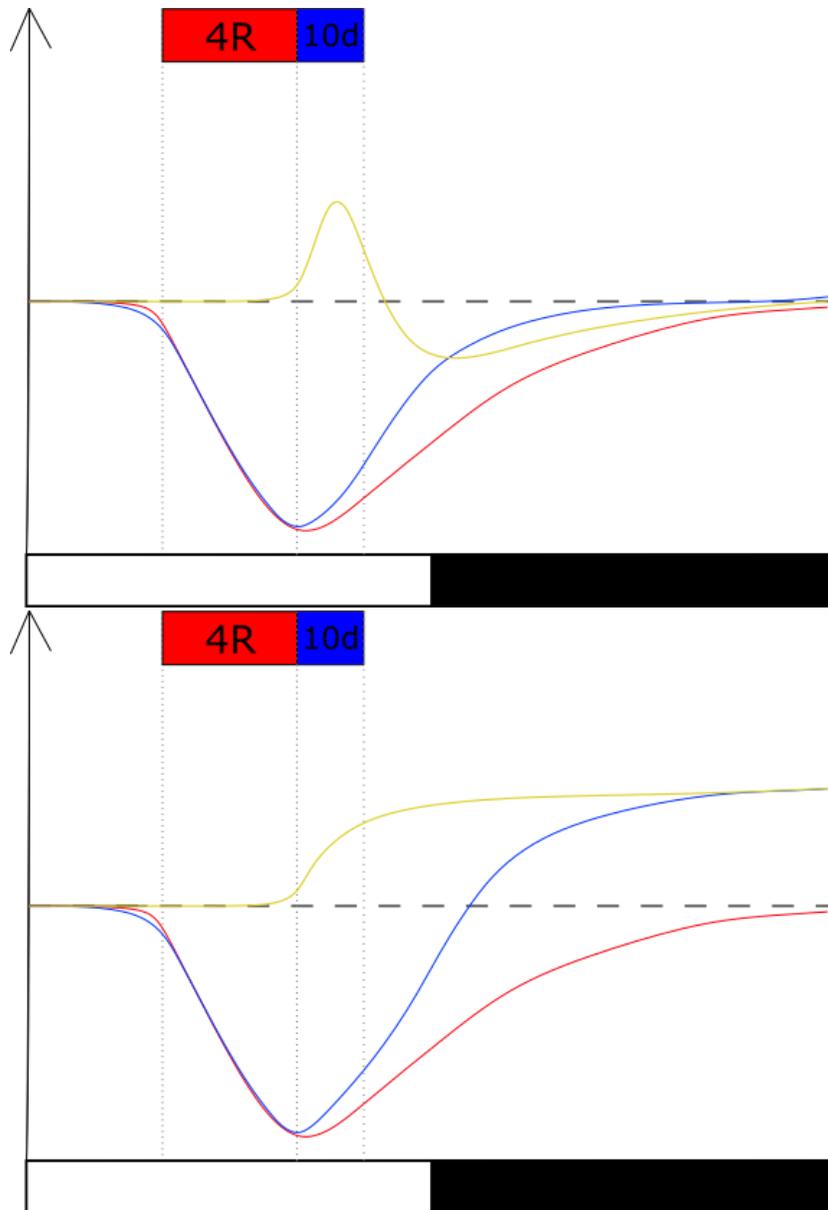


Figura 13. Predicción del *overshoot* producto del Enmascaramiento fótico en un esquema de deuda de sueño. Línea azul, protocolo 4R; línea roja, protocolo 4R10d; línea amarilla, predicción de la trayectoria de cantidad de sueño REM de protocolo 10d en relación a BL. Cuadro rojo, horas de privación; cuadro azul, horas con PO. A. PO incrementan la cantidad de sueño REM a valores similares a los obtenidos en 4R10d. B. Sueño REM se incrementa durante 10d para compensar el exceso con una disminución posterior.

8. Conclusiones

Posterior a una privación selectiva de sueño REM de 4 horas (4R y 4R10d) pudimos observar una respuesta homeostática de rebote significativa, sin embargo al estimular el paso de sueño NREM a REM mediante Estimulación Fótica, vimos un importante incremento del tiempo en sueño REM en 4R10d, que fue significativamente superior a BL y a 4R.

El incremento de sueño REM obtenido en el protocolo 4R10d fue equivalente a la suma del sueño REM obtenido mediante Pulsos de Oscuridad (10d) y el rebote post-privación (4R). Esto nos indica que el sueño REM extra obtenido vía Enmascaramiento Fótico se sobrepuso al fenómeno de recuperación post-privación, recuperación que se mantuvo dentro de límites homeostáticos.

En resumen, mientras que la privación selectiva de sueño REM de 4 horas y la recuperación subsecuente se comportaron homeostáticamente, el exceso del estado obtenido mediante Enmascaramiento, no fue considerado por el sistema de control y se añadió al rebote de sueño REM post-privación.

9. Bibliografía

1. Deboer T. 2013. Behavioral and electrophysiological correlates of sleep and sleep homeostasis. *Curr Top Behav Neurosci* Oct 19.
2. Vyazovskiy VV, Harris KD. 2013. Sleep and the single neuron: the role of global slow oscillations in individual cell rest. *Nat Rev Neurosci* 14(6):443–51.
3. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. 1953. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2003 Fall;15(4):454-5.
4. Dement, W., and N. Kleitman. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 9: 673–690, 1957
5. Borbély AA. A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol.* 1982;1(3):195-204.
6. Borbely, A. A., P. Achermann. Concepts and models of sleep regulation, an overview. *J. Sleep Res.* 1: 63–79, 1992.
7. Franken P., Long-term vs. short-term processes regulating REM sleep. *J Sleep Res.* 2002 Mar; 11 (1):17-28.
8. Sharma V. K., Paranjpe D. A. Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms* 2005, 3:7 doi:10.1186/1740-3391-3-7
9. Berson, D.M. (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.*, 26, 314–320.
10. Mislberger RE, Bergmann BM, Waldenar W, Rechtschaffen A. Recovery sleep following sleep deprivation in intact and suprachiasmatic nuclei-lesioned rats. *Sleep.* 1983;6(3):217-33.
11. Tobler I, Borbély AA, Groos G. The effect of sleep deprivation on sleep in rats with suprachiasmatic lesions. *Neurosci Lett.* 1983 Nov 21;42(1):49-54.
12. Castro-Faúndez J., PhD; Díaz J.; Ocampo-Garcés A., MD, PhD Temporal Organization of the Sleep-Wake Cycle under Food Entrainment in the Rat.
13. Endo, T., Roth, C., Landolt, H. P., Werth, E., Aeschbach, D., Achermann, P. and Borbély, A. A. Selective REMS deprivation in humans effects on sleep and sleep EEG. *Am. J. Physiol.*, 1998a, 274: R1186±R1189.
14. Gottesmann, C. The transition from slow-wave sleep to paradoxical sleep: evolving facts and concepts of the neurophysiological processes underlying the intermediate stage of sleep. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1996, 20: 367–387.
15. Feinberg, I., T. Maloney, and J. D. March. Precise conservation of NREM Period 1 (NREMP1) delta across naps and nocturnal sleep: implications for REM latency and NREM/REM alternation. *Sleep* 15: 400–403, 1992
16. Werth, E., D. J. Dijk, P. Achermann, and A. A. Borbély. Dynamics of the sleep EEG after an early evening nap: experimental data and simulations. *Am. J. Physiol.* 271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40): R501–R510, 1996
17. Dijk, D. J., and C. A. Czeisler. Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves and sleep spindle activity in humans. *J. Neurosci.* 15: 3526–3538, 1995

18. Benington, J. H. and Heller, H. C. REMS timing is controlled homeostatically by accumulation of REMS propensity in non-REMS. *Am. J. Physiol.*, 1994a, 266: R1992±R2000.
19. Barbato, G. and Wehr, T. A. Homeostatic regulation of REMS in humans during extended sleep. *Sleep*, 1998, 21: 267±276.
20. Endo, T., Roth, C., Landolt, H. P., Werth, E., Aeschbach, D., Achermann, P. and Borbély, A. A. Effect of frequent brief awakenings from nonREMS on the nonREM±REMS cycle. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 1998b, 52: 129±130.
21. Vivaldi, E. A., Ocampo, A., Wyneken, U., Roncagliolo, M. and Zapata, A. M. Short-term homeostasis of active sleep and the architecture of sleep in the rat. *J. Neurophysiol.*, 1994, 72: 1745±1755.
22. McCarley, R. W. and Hobson, J. A. Cortical unit activity in desynchronized sleep. *Science*, 1970, 167: 901–903.
23. Trachsel, L., Edgar, D. M., Seidel, W. F., Heller, H. C. and Dement, W. Sleep homeostasis in suprachiasmatic nuclei-lesioned rats: effects of sleep deprivation and triazolam administration. *Brain Res.*, 1992, 589: 253±261.
24. Baracchi F, Zamboni G, Cerri M, Del Sindaco E, Dentico D, Jones CA, Luppi M, Perez E, Amici R. Cold exposure impairs dark-pulse capacity to induce REM sleep in the albino rat. *J Sleep Res.* 2008 Jun;17(2):166-79. doi: 10.1111/j.1365-2869.2008.00658.x.
25. Ocampo-Garcés A, Vivaldi EA. Short-term homeostasis of REM sleep assessed in an intermittent REM sleep deprivation protocol in the rat. *J Sleep Res.* 2002 Mar;11(1):81-9. PubMed PMID: 11869431.
26. Amici, R., Zamboni, G., Perez, E., Jones, C. A., Toni, I., Culin, F. and Parmeggiani, P. L. Pattern of desynchronized sleep during deprivation and recovery induced in the rat by changes in ambient temperature. *J. Sleep Res.*, 1994, 3: 250±256.
27. Ocampo, A., Wyneken, U. and Vivaldi, E. A. Active sleep and homeostatic regulation of sleep±wake cycle. *Arch. Biol. Med. Exp.*, 1990, 23 (Suppl. 2): R218.
28. Amici R, Cerri M, Ocampo-Garcés A, Baracchi F, Dentico D, Jones CA, Luppi M, Perez E, Parmeggiani PL, Zamboni G. Cold exposure and sleep in the rat: REM sleep homeostasis and body size. *Sleep* 2008 May;31(5):708-15.
29. Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189:55–58.
30. Mallick BN, Singh A, Khanday MA (2012) Activation of inactivation process initiates rapid eye movement sleep. *Prog Neurobiol* 97: 259–276.
31. Luppi Pierre-Hervé, Clément Olivier, Valencia Garcia Sara, Brischoux Frédéric, Fort Patrice. New aspects in the pathophysiology of rapid eye movement sleep behavior disorder: the potential role of glutamate, gamma-aminobutyric acid, and glycine. PII: S1389-9457(13)00069-5 doi: 10.1016/j.sleep.2013.02.004 © 2013 Elsevier B.V.
32. Luppi Pierre-Hervé, Clément Olivier, Fort Patrice. Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Curr Opin Neurobiol.* 2013 Oct;23 (5):786-92. doi: 10.1016/j.conb.2013.02.006. Epub 2013 Mar 13.
33. Siegel, J.M. (2011). "REM sleep" in *Principles and Practices of Sleep Medicine*, eds M. H. Kryger, T. Roth, and W. C. Dement (Philadelphia: Elsevier-Saunders), 92–111.
34. Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E. The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:283-313. Epub 2002 Mar 20.

35. Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB. Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci.* 2002 Jun 1;22(11):4568-76.
36. Ritchie E. Brown, Radhika Basheer, James T. McKenna, Robert E. Strecker, and Robert W. McCarley. Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev.* 2012 Jul; 92(3): 1087–1187.
37. Brooks PL, Peever J. A Temporally Controlled Inhibitory Drive Coordinates Twitch Movements during REM Sleep. *Curr Biol.* 2016 May 9;26(9):1177-82. doi: 10.1016/j.cub.2016.03.013. Epub 2016 Mar 31.
38. Aserinsky, E. (1971). Rapid eye movement density and pattern in the sleep of normal young adults. *Psychophysiology* 8, 361–375.
39. Benson, K., and Zarcone, V.P., Jr. (1979). Phasic events of REM sleep: phenomenology of middle ear muscle activity and periorbital integrated potentials in the same normal population. *Sleep* 2, 199–213.
40. Rukhadze, I., Kamani, H., and Kubin, L. (2011). Quantitative differences among EMG activities of muscles innervated by subpopulations of hypoglossal and upper spinal motoneurons during non-REM sleep - REM sleep transitions: a window on neural processes in the sleeping brain. *Arch. Ital. Biol.* 149, 499–515.
41. Gooley, J.J., Lu, J., Fischer, D. & Saper, C.B. (2003) A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J. Neurosci.*, 23, 7093–7106.
42. Pickard GE, Sollars PJ. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2012;162:59-90. doi: 10.1007/112_2011_4.
43. Hubbard J, Ruppert E, Gropp CM, Bourgin P. Non-circadian direct effects of light on sleep and alertness: lessons from transgenic mouse models. *Sleep Med Rev.* 2013 Dec;17(6):445-52. doi: 10.1016/j.smrv.2012.12.004. Epub 2013 Apr 17.
44. Beuckmann CT, Sinton CM, Williams SC et al. Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J. Neurosci.*, 2004, 24: 4469–4477.
45. Zhang S, Lin L, Kaur S. et al. The development of hypocretin (orexin) deficiency in hypocretin/ataxin-3 transgenic rats. *Neuroscience*, 2007a, 148: 34–43.
46. Benca RM, Bergmann BM, Leung C, Nummy D, Rechtschaffen A. Rat strain differences in response to dark pulse triggering of paradoxical sleep. *Physiology and Behavior* 1991; 49, 83-87.
47. Benca, R.M., Obermeyer, W.H., Bergmann, B.M., Lendvai, N. & Gilliland, M.A. (1993) Failure to induce rapid eye movement sleep by dark pulses in pigmented inbred rat strains. *Physiol. Behav.*, 54, 1211–1214.
48. Lund, R. D. Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science*, 1965, 149: 1506–1507.
49. Miller AM, Miller RB, Obermeyer WH, Behan M, Benca RM. The pretectum mediates rapid eye movement sleep regulation by light. *Behav Neurosci.* 1999 Aug; 113 (4):755-65.
50. Rechtschaffen, A., Dates, R., Tobias, M. and Whitehead, I. The effects of lights-off stimulation on the distribution of paradoxical sleep in the rat. *Commun. Behav. Biol.*, 1969, 3: 93–99.
51. Borbely, A.A. Sleep and motor activity of the rat during ultra-short light-dark cycles. *Brain Res.*, 114:305-317 (1976).
52. Ocampo-Garcés A, Ibáñez F, Perdomo G, Torrealba F. Orexin-B-saporin lesions in the lateral hypothalamus enhance photic masking of rapid eye movement sleep in the albino rat. *J Sleep Res.* 2011 Mar; 20(1 Pt 1):3-11.

53. Rechtschaffen A, Bergmann BM, Gilliland MA, Bauer K. Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep* 1999;22:11-31.
54. Borbély AA, Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. In: Kryger MH, Roth T, Dement WE, eds. *Principles and practice of sleep medicine*. Philadelphia: WB Saunders, 2005:405-17.
55. Benington JH, Heller HC. Implications of sleep deprivation experiments for our understanding of sleep homeostasis. *Sleep* 1999;22:1033-7.
56. Zamboni G, Amici R, Perez E, Jones CA, Parmeggiani PL. Pattern of REM sleep occurrence in continuous darkness following the exposure to low ambient temperature in the rat. *Behav Brain Res* 2001; 122:25-32.
57. Coolen A, Hoffmann K, Barf RP, Fuchs E, Meerlo P. Telemetric study of sleep architecture and sleep homeostasis in the day-active tree shrew *Tupaia belangeri*. *Sleep*. 2012 Jun 1;35(6):879-88. doi: 10.5665/sleep.1894.
58. Rampin C, Cespuglio R, Chastrette N, Jouvet M. Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in the rat. *Neurosci Lett* 1991; 126:113-8.
59. Marinesco S, Bonnet C, Cespuglio R. Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: a possible role for corticosterone. *Neuroscience* 1999; 92, 921–933.
60. Ocampo-Garcés, A.; Molina, E.; Rodríguez, E. and Vivaldi, E.A. “Homeostasis of REM sleep after total and selective sleep deprivation in the rat”. *Journal of Neurophysiology* 84: 2699–2702, 2000.
61. Endo, T., Schwierin, B., Borbély, A. A. and Tobler, I. Selective and total sleep deprivation: effect on the sleep EEG in the rat. *Psychiatry Res.*, 1997, 66: 97±110.
62. Vivaldi, E.A.; Ocampo-Garcés, A.; Villegas, R. “Short-term homeostasis of REM sleep throughout a 12:12 light:dark schedule in the rat”. *Sleep*. 28(8):931-943, 2005.
63. Van Dort C. J., Zachs D. P., Kenny J. D., Zheng S., Goldblum R. R., Gelwan N. A., Ramos D. M., Nolan M., Wang K., Weng F., Lin Y., Wilson M., and Brown E. N. Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 13; 112(2): 584–589.
64. Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci*. 2000 May 15;20 (10):3830-42.
65. Steriade, M. and Mc Carley, R. W. *Brainstem Control of Wakefulness and Sleep*. Plenum Press, New York, 1990.
66. Terenzi, M. G., Zagon, A. and Roberts, M. H. Efferent connections from the anterior pretectal nucleus to the diencephalon and mesencephalon in the rat. *Brain Res.*, 1995, 701: 183–191.
67. Miller, A. M., Obermeyer, W. H., Behan, M. and Benca, R. M. The superior colliculus–pretectum mediates the direct effects of light on sleep. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, 95: 8957–8962.
68. Fite, K. V., Janusonis, S., Foote, W. and Bengston, L. Retinal afferents to the dorsal raphe nucleus in rats and Mongolian gerbils. *J. Comp. Neurol.*, 1999, 414: 469–484.
69. Brown, R. E. and Mc Carley, R. W. Neurotransmitters, neuromodulators, and sleep. In: P. L. Parmeggiani and R. Velluti (Eds). *The Physiologic Nature of Sleep*. Imperial College Press, London, 2005: 45–75.
70. Wang, Q. P., Guan, J. L. and Shioda, S. Synaptic contacts between serotonergic and cholinergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus and laterodorsal tegmental nucleus. *Neuroscience*, 2000, 97: 553–563.

71. Morin, L. P. and Allen, C. N. The circadian visual system, 2005. *Brain Res. Rev.*, 2006, 51: 1–60.
72. Valiente-Soriano, F. J., García-Ayuso, D., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Galindo-Romero, C., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M. (2014). Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 131.
73. Fleming, M. D., Benca, R. M. and Behan, M. Retinal projections to the subcortical visual system in congenic albino and pigmented rats. *Neuroscience*, 2006, 143: 895–904.
74. Gabel, V. et al. Effects of artificial dawn and morning blue light on daytime cognitive performance, well-being, cortisol and melatonin levels. *Chronobiol Int* 30, 988–997, (2013).
75. Chellappa, S. L., Gordijn, M. C. & Cajochen, C. Can light make us bright? Effects of light on cognition and sleep. *Prog Brain Res* 190, 119–133, doi:B978-0-444-53817-8.00007-4[pii]0.1016/B978-0-444-53817-8.00007-4 (2011).
76. Bourgin P, Hubbard J. Alerting or Somnogenic Light: Pick Your Color. *PLoS Biology*. 2016;14(8):e2000111. doi:10.1371/journal.pbio.2000111.
77. Thapan K, Arendt J, Skene DJ. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol* 2001;535(Pt 1):261e7. [32] Gronli J, Byrkjedal IK, Bjorvatn B,
78. Rüger M, Gordijn MC, Beersma DG, de Vries B, Daan S. Time-of-day-dependent effects of bright light exposure on human psychophysiology: comparison of daytime and nighttime exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R1413–20.
79. Alkozei A, Smith R, Pisner DA, Vanuk JR, Berryhill SM, Fridman A, Shane BR, Knight SA, Killgore WD. Exposure to Blue Light Increases Subsequent Functional Activation of the Prefrontal Cortex During Performance of a Working Memory Task. *Sleep*. 2016 Sep 1;39(9):1671-80. doi: 10.5665/sleep.6090.
80. Bliwise DL, Nino-Murcia G, Forno LS, Viseskul C (1990) Abundant REM sleep in a patient with Alzheimer's disease. *Neurology* 40: 1281–1284.
81. Comella CL (2007) Sleep disorders in Parkinson's disease: an overview. *Mov Disord* 22 [Suppl 17]:S367–S373.