



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Relación entre la potencia delta del
electroencefalograma y temperatura ambiente
durante la hibernación del hámster.**

Margalida Suau Fullana.

Grado de Biología.

Año académico 2019-20.

Trabajo tutelado por Mourad Akaarir El ghourri.

*Departamento de Biología.

Se autoriza a la Universidad a incluir este Trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave: *Mesocricetus auratus*, hibernación, EEG, ECG, EMG, temperatura, efecto rebote, acetilcolina, neostigmina, atropina.

Agradecimientos

Quisiera agradecer al equipo de Neurofisiología, del departamento de Biología de la UIB, en especial al Dr. Mourad Akaarir El Ghourri por darme las directrices necesarias para la elaboración de este estudio.

Además, dar mis agradecimientos al Dr. Rubén Rial, por sus consejos y ayuda incondicional.

También quisiera dar las gracias a mis padres Catalina Fullana Massanet y Bernardo Suau Sacares, a mi hermana Aina Suau Fullana y a mi novio Andreu Mairata Pons, por su apoyo incondicional, y por permitirme la oportunidad de cursar un grado universitario.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Ritmos biológicos.....	2
1.2. Ritmos circadianos	2
1.3. Características del ritmo circadiano	2
1.4. El sueño	4
1.4.1. El sueño comportamental	4
1.4.2. El sueño poligráfico	5
1.4.3. Fases del sueño.....	5
1.5. Regulación del sueño.....	7
1.5.1. Control homeostático del sueño	7
1.5.2. Control circadiano del sueño	8
1.5.3. Privación del sueño	8
1.6. Hibernación	9
1.6.1. Estructura de la hibernación	9
1.6.2. Actividad cerebral durante la hibernación.....	10
1.6.2. Hibernación, ahorro de energía y ondas lentas.....	11
1.7. Privación del sueño durante la hibernación. Análisis crítico de la hipótesis.....	12
1.7.1. Rebote de sueño	12
1.7.2. Delta EEG durante la vigilia	13
1.7.3. Acetilcolina, agonistas y antagonistas.....	13
1.7.4. Hibernación y acetilcolina.....	14
2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Animales.....	16
3.2. Metodología	16
3.2.1. Técnica operatoria	16
3.2.2. Adquisición de datos	17
3.2.3. Análisis de los parámetros fisiológicos.....	19
3.2.4. Análisis estadístico	20
3.3. Planificación del trabajo	20
3.4. Presupuesto.....	21
4. BIBLIOGRAFÍA.....	22

RESUMEN

La hibernación es una adaptación para la conservación de la energía, y se ha afirmado que evolucionó como una extensión de los mecanismos del sueño NREM. Cuando la temperatura corporal disminuye el EEG muestra menor amplitud hasta llegar a ser plano.

Al salir de la hibernación, se observó en animales en vigilia un EEG con ondas lentas. Este resultado fue interpretado como si durante la hibernación los animales están privados de sueño; suponiendo que las bajas temperaturas corporales son incompatibles con la función restauradora y ahorradora del sueño.

Este proyecto pretende demostrar que un animal al despertar de la hibernación, la presencia de EEG delta no se debe a una deuda de sueño, sino a un proceso dependiente de la reactivación súbita del sistema nervioso autónomo parasimpático.

Para ello, se pondrán a hibernar en una cámara termostalizada animales previamente operados. Una vez en hibernación, se procederá a la administración intraperitoneal de fármacos antagonistas muscarínico :atropina y neostigmina. Este ultimo al no poder atravesar la barrera hematoencefálica, no tendría efectos centrales que provocarían la aparición de ondas lentas en el EEG en el animal despierto. La producción de ondas lentas sería entonces un fenómeno asociado a la desaparición del tono vagal durante la hipotermia y no a la privación de sueño.

ABSTRACT

Hibernation is an adaptation for energy conservation, and it has been claimed that it evolved as an extension of the mechanisms of NREM sleep. When the body temperature decreases, the EEG shows less amplitude until it becomes flat.

Upon leaving hibernation, an EEG with slow waves was observed in waking animals. This result was interpreted as if during hibernation the animals are deprived of sleep; assuming that low body temperatures are incompatible with the restorative and sleep-saving function.

This project aims to demonstrate that an animal upon waking from hibernation, the presence of EEG delta is not due to a sleep debt, but to a process dependent on the sudden reactivation of the parasympathetic autonomic nervous system.

To do this, previously operated animals will be hibernated in a thermostatted chamber. Once in hibernation, the intraperitoneal administration of muscarinic antagonist drugs: atropine and neostigmine will proceed. The latter being unable to cross the blood brain barrier, would not have central effects that would cause the appearance of slow waves in the EEG in the awake animal. The production of slow waves would then be a phenomenon associated with the disappearance of the vagal tone during hypothermia and not with sleep deprivation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ritmos biológicos

La rotación de la tierra sobre su eje y su movimiento alrededor del Sol (traslación) confieren al medio ambiente una ritmicidad en las condiciones de luz y temperatura (Brown, 1976). Estos cambios conllevan una serie de comportamientos como la hibernación, las migraciones, la reproducción estacional o el ajuste del periodo de actividad al periodo óptimo del día. Esta dependencia temporal de la conducta comporta mecanismos complejos de regulación fisiológica, como por ejemplo el de la retroalimentación negativa, que conduce a una mejor adaptación de los organismos al medio ambiente (Moore-Ede, 1986). La ciencia encargada de estudiar estos ritmos biológicos y procesos cíclicos que intervienen sobre los seres vivos y su adaptación al ciclo de luz-oscuridad, se conoce como cronobiología. Los creadores de esta ciencia fueron Jürgen Aschoff y Colin Pittendrigh (1960).

Los ritmos biológicos son oscilaciones cíclicas de un fenómeno biológico con intervalos de tiempo regulares. El parámetro que caracteriza este ritmo es el período, que hace referencia al tiempo que se tarda en completar la oscilación, y su inversa que es la frecuencia, que se corresponde con el número de ciclos por unidad de tiempo. Estos ritmos se pueden clasificar en *circadianos* que presentan un período cercano a las 24 horas (períodos de 20 a 28 horas), *ultradianos* con períodos menores, como el ritmo cardíaco (<20 h) e *infradianos* con períodos mayores (>28 h), como las fases lunares, la variación de la marea y la hibernación (Golombek, 2002).

1.2. Ritmos circadianos

El cambio predecible en el entorno es debido al sistema circadiano, permitiendo a todos los organismos adaptar su fisiología y comportamiento a los acontecimientos cíclicos diarios, para conseguir los requerimientos necesarios propios de cada especie (Aschoff, 1963). La selección natural ha favorecido la evolución de los ritmos circadianos, ya que un animal que ajuste su actividad de acuerdo con las circunstancias ambientales más favorables presentará una clara ventaja sobre otro que, por ejemplo, permanezca activo continuamente (Aschoff, 1964).

Los ritmos circadianos, término propuesto por Halberg (1959) son oscilaciones endógenas con un período de tiempo aproximado de 24 horas. Se distinguen de otras oscilaciones biológicas, debido a que su período corresponde con el de un ciclo ambiental (Rusak, 1979). Estos ritmos pueden sincronizarse con el ambiente a partir de una serie de señales periódicas que reciben el nombre de *zeitgebers*.

1.3. Características del ritmo circadiano

El sistema circadiano en mamíferos consta de un reloj central ubicado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) que se encuentra en la parte anterior del hipotálamo, y una serie de osciladores periféricos

ubicados a lo largo del cuerpo. En cambio, en otros organismos como las aves, reptiles y anfibios, la retina y la glándula pineal son otras estructuras capaces de funcionar como relojes reguladores (Golombek y Yannielli, 2006). Además, de tener un origen endógeno, es necesario que los ritmos circadianos dispongan de mecanismos de sincronización para poder ajustar de manera continua los ciclos ambientales. Esta propiedad permite la corrección de manera automática de los desfases producidos diariamente en el reloj (Aschoff, 1981).

El sistema circadiano en mamíferos está formado por una estructura básica que consta de tres componentes principales (Fig. 1): las vías de entradas que participan en la sincronización ambiental, es decir, el ciclo luz-oscuridad conocido como *Zeitgebers*, el marcapasos o reloj circadiano central y las vías de salida que transmiten las señales circadianas al resto del organismo.

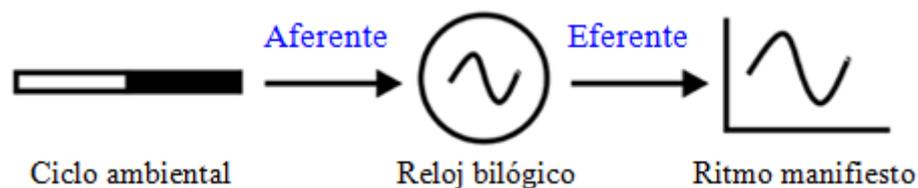


Figura 1: Diagrama de los principales componentes del sistema circadiano.

La principal vía de entrada de información fótica al NSQ es el tracto retinohipotalámico (TRH), está formado por células ganglionares de la retina sensible a la melanopsina. Desde el NSQ (Fig. 2) se proyectan las señales de salida que transmiten la información a regiones del cerebro que participan en la regulación comportamental y fisiológica del organismo (Berson et al., 2002).

Una de las principales vías de salida del reloj biológico es la hormona melatonina sintetizada por la glándula pineal. Esta es la encargada de la sincronización de los ritmos biológicos con el ciclo luz-oscuridad (Bartness et al., 1933). Actúa sobre estructuras del cerebro y controla procesos fisiológicos y de conducta, además de controlar la secreción de otras hormonas (Vela-Bueno et al., 2007). Durante la fase de oscuridad hay un aumento de producción y secreción de melatonina, que es sintetizada a partir de serotonina mediante la N-acetiltransferasa (NAT) (Klein, 1985). La síntesis de la melatonina debilita la señal circadiana de los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), produciendo la pérdida de calor que induce la somnolencia a través del área preóptica del hipotálamo. Por tanto, la melatonina está implicada en la regulación de los ritmos biológicos, además de regular el ciclo de sueño-vigilia. (Cajochen et al., 2003).

De esta manera, el reloj circadiano impulsa los ritmos de sueño-vigilia y metabólicos, así como los hormonales. La alineación adecuada entre la luz, el reloj circadiano y los comportamientos producen un orden temporal en los organismos que es esencial para la supervivencia (Hastings et al., 2003).

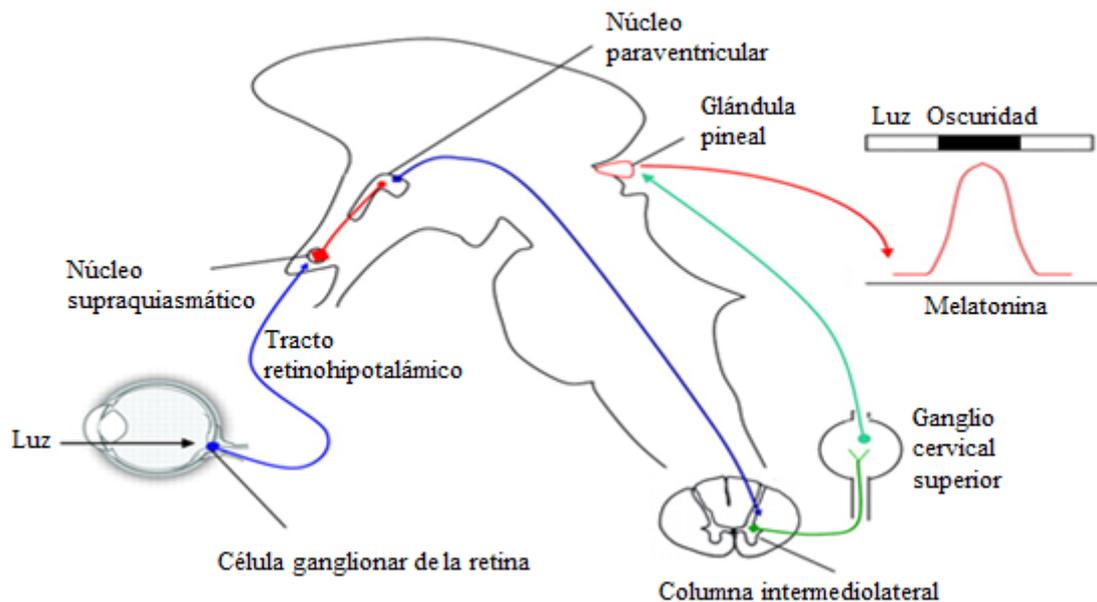


Figura 2: Regulación de la secreción de melatonina. La regulación circadiana de la secreción de melatonina depende de una vía indirecta que se origina en las células ganglionares fotosensitivas de la retina y llega, a través del tracto retinohipotalámico, al núcleo supraquiasmático, que es el marcapasos circadiano central. El núcleo supraquiasmático, a través de una proyección inhibitoria del núcleo paraventricular del hipotálamo, controla la salida simpática a la glándula pineal que es responsable del pico de secreción de melatonina durante la oscuridad. Modificada de Benarroch, 2008.

1.4. El sueño

1.4.1. El sueño comportamental

La definición del sueño se fue completando con los años, de manera que actualmente las características que lo definen como un comportamiento son las siguientes: reposo motor (Pieron, 1913), umbrales sensoriales elevados (Pieron, 1913), fácil reversibilidad (Pieron, 1913), adopción de una postura estereotipada (Flanigan, 1973), uso de lugares específicos donde dormir (Bruce Durie, 1981), organización cíclica circadiana (Bruce Durie, 1981) y estado regulado, porque presenta efectos de privación y de saciedad (Tobler, 1984).

Por tanto, el sueño se puede definir como un estado de la consciencia, reversibles y fisiológico, con presencia de una desconexión temporal y parcial con el ambiente y un aumento del umbral en respuesta a estímulos externos. En aquellos organismos vivos de rango superior a nivel evolutivo, la cantidad y la naturaleza del sueño se puede relacionar con diversos factores como la edad, el tamaño corporal, dieta o la condición del ambiente (Siegel, 2005). Para los mamíferos y las aves el sueño se basa en características comportamentales, además de análisis de registros poligráficos. (Fig. 3).

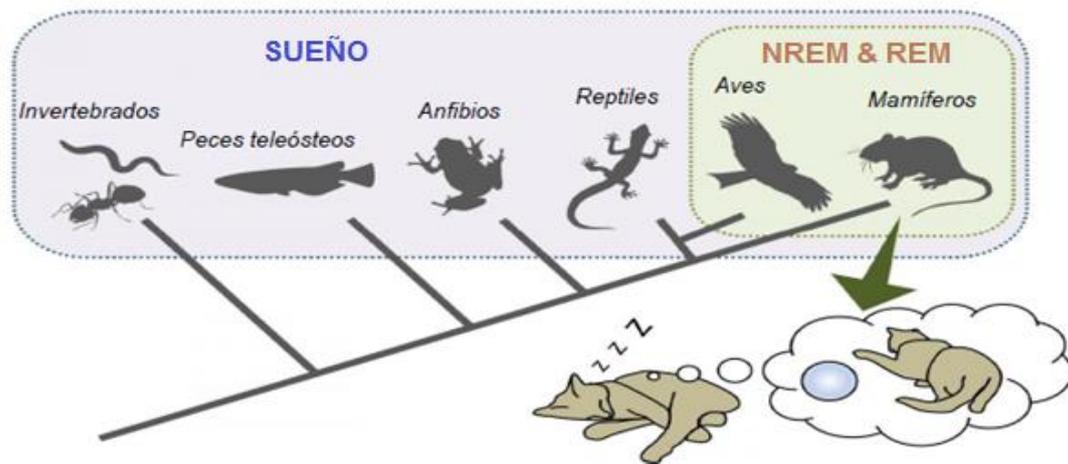


Figura 3: Representación del rango de evolución del sueño poligráfico. Modificado de Hayashi, 2017.

1.4.2. El sueño poligráfico

El reconocimiento de las diferentes fases del sueño se lleva a cabo registrando simultáneamente la actividad cerebral o electroencefalograma (EEG), la actividad muscular o electromiograma (EMG) y el estado de los ojos o electrooculograma (EOG) (Rechtschaffen y Kales, 1968).

El sueño poligráfico para cada especie presenta características diferentes, pero solamente se reconoce en un rango evolutivo superior, es decir, en aves y mamíferos. Aunque, las aves presentan diferencias con el sueño de los mamíferos, ya que se ha demostrado que algunas especies como las aves migratorias, son capaces de reducir la fase de sueño, incluso no presentarlo en un periodo de tiempo (Randler, 2014).

1.4.3. Fases del sueño

La clasificación del sueño fue establecida por Dement y Kleitman (1957), donde explicaron los criterios definitorios de cada una de las etapas en los seres humanos (Fig. 4):

Vigilia: El trazado del EEG presenta ondas rápidas de bajo voltaje por encima de los 13 Hz (actividad β) cuando el individuo está activo o tiene los ojos abiertos. Aparece el ritmo α (8-12 Hz) cuando el individuo se mantiene despierto, pero con los ojos cerrados, que se caracteriza por la ausencia de movimientos oculares y tono muscular apreciable en la musculatura antigravitatoria.

Fase 1 o de adormecimiento: El trazado del EEG presenta ondas rápidas de bajo voltaje en las que aparecen ondas más lentas de pequeño voltaje llamadas banda de frecuencia θ (4-7 Hz). Presenta movimientos oculares de rotación lenta (movimientos pendulares) y un tono muscular presente pero progresivamente reducido respecto a la vigilia.

Fase 2 o de sueño ligero: El trazado del EEG presenta dos o más husos de sueño (brotes breves de ondas con una frecuencia de unos 14 Hz, que tienen menor voltaje en su inicio y su final) por cada 30 s y/o complejos K (ondas bifásicas de gran voltaje que suelen aparecer al principio o al final de un huso,

pero que también pueden presentarse de forma aislada). Hay ausencia de movimientos oculares rápidos y un tono muscular disminuido pero presente.

Fase 3-4 o de sueño profundo: El trazado del EEG presenta ondas lentas de alto voltaje dentro de la banda delta (0,3-4 Hz) que ocupan más del 20% del trazado. Ausencia de movimientos oculares rápidos. Tono muscular muy disminuido, a veces ausente.

Fase REM o sueño paradójico: El trazado del EEG es casi indistinguible al de la fase 1 y tiene una frecuente presencia de ondas de 4 a 6 Hz con morfología típica de diente de sierra. Aparición de Movimientos Oculares Rápidos, (sueño MOR o también sueño REM, por “Rapid Eye Movements”) aislados. Tono muscular nulo, atonía total. De forma esporádica pueden darse sacudidas musculares de localización anárquica.

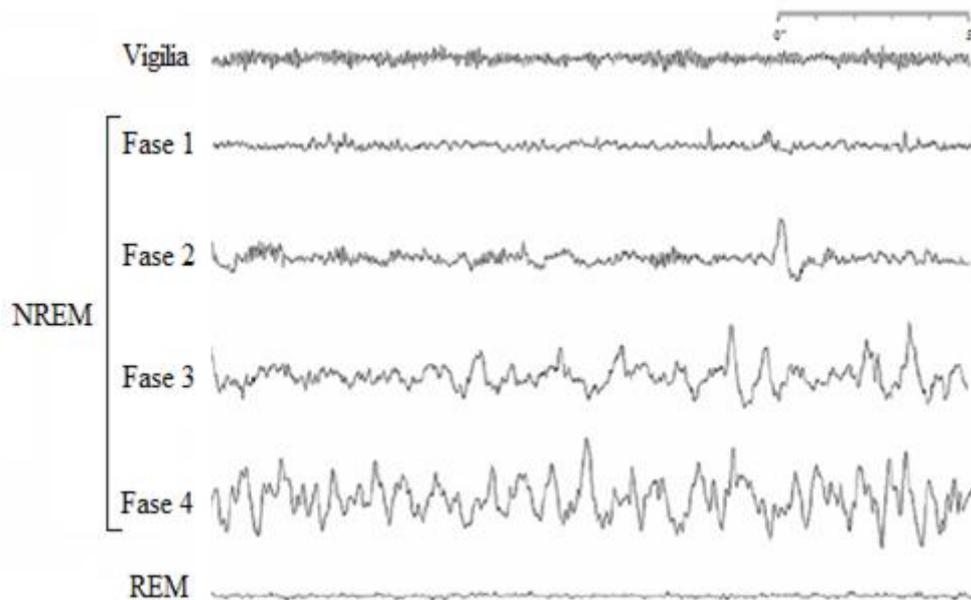


Figura 4: Representación de las características electroencefalográficas de vigilia, sueño NREM y REM en condiciones normales de un adulto. Modificada de Hayashi, 2017.

El sueño es un proceso ultradiano que produce, dentro del sueño, oscilaciones cíclicas entre NREM y REM. En 1968, Rechtschaffen y Kales, establecieron los criterios para el análisis paramétrico de la arquitectura del sueño, mediante el cual se puede obtener una representación gráfica (hipnograma) de la organización cronológica de las diferentes fases del sueño a lo largo de la noche (Fig. 5).

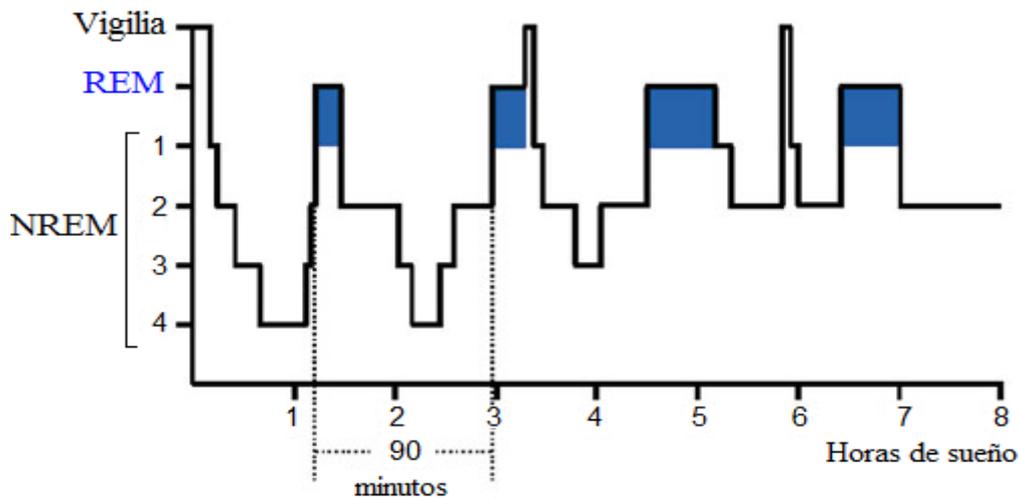


Figura 5: Ejemplo de un hipnograma de un adulto humano normal. Modificada de Hayashi, 2017.

1.5. Regulación del sueño

La producción del sueño y vigilia está regulada por dos procesos descritos por Borbély en 1982 (Fig. 6). Uno de ellos, es el proceso circadiano predictivo (C), y el otro es el proceso homeostático reactivo (S). El modelo de estos dos procesos se estableció primero en la regulación del sueño en la rata (Borbély, 1982a) y luego se aplicó al sueño humano (Borbély, 1982b).

Además, la probabilidad de que una persona se duerma en un momento dado depende también de dos componentes ultradianos, controlados por relojes biológicos (Rodríguez et al., 2015).

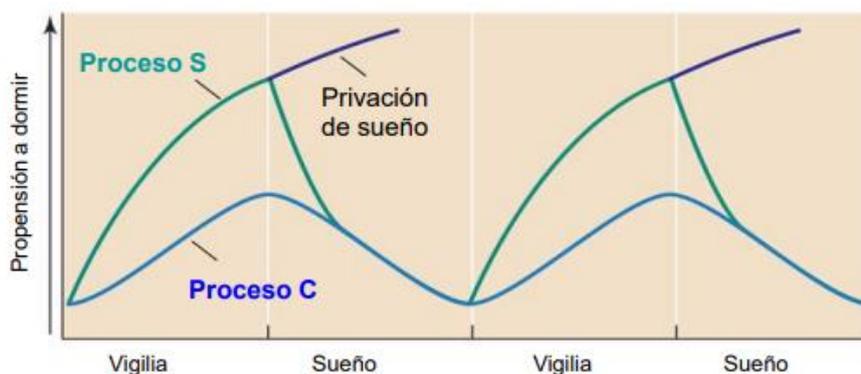


Figura 6: Modelo de los dos procesos para la organización del sueño: homeostático (S) y circadiano (C). Modificado de Borbély, 1982.

1.5.1. Control homeostático del sueño

El proceso homeostático reactivo (S) controla la producción continua del sueño-vigilia. La potencia delta en el EEG aumenta y disminuye en función del tiempo transcurrido en vigilia y sueño, por lo que

se considera que es el indicador básico de la necesidad homeostática de sueño. La adenosina tiene un papel fundamental en la regulación homeostática, se acumula durante la vigilia y presenta un aumento de sensibilidad de sus receptores. Esta molécula presenta un carácter endógeno que resulta del metabolismo del ATP en neuronas y es capaz de llevar a cabo acciones reguladoras sobre circuitos del ciclo vigilia-sueño (Carús y Andrés, 2012). Durante los periodos de privación de sueño y mediante análisis por microdiálisis se observa, en áreas cerebrales como el prosencéfalo basal y la corteza, un aumento progresivo de los niveles de concentración de adenosina a medida que se prolonga la vigilia. Estos niveles de adenosina disminuyen de nuevo durante la recuperación del sueño (Bartness et al., 1933; Porkka-Heiskanen et al., 2000 y Basheer et al., 2000). Las sustancias que bloquean los receptores de adenosina, como la cafeína, la teofilina y las xantinas, promueven el mantenimiento del estado de vigilia por tiempo prolongado (Schwierin et al., 1996).

1.5.2. Control circadiano del sueño

El proceso circadiano predictivo (C), controlado por un reloj biológico endógeno e independiente de la historia previa de sueño y vigilia, determina la organización de los estados alrededor a un ciclo de 24 horas. Por tanto, este proceso actúa regulando el sueño, independientemente del tiempo pasado en vigilia, ya que la necesidad de dormir va a variar dependiendo de la hora del día en la que se encuentre el individuo. El mejor indicador en el proceso circadiano es la temperatura corporal, que presenta una fuerte correlación con la propensión al sueño. La tendencia a dormir aumenta rítmicamente, de modo que es máxima cuando la temperatura central alcanza sus valores mínimos (Rial et al., 2010).

Además, también se ven implicados dos componentes ultradianos: el primero se presenta con una periodicidad de 90-120 min y genera la alternancia sueño REM-NREM durante la noche y que se continúa durante el día con el ciclo básico de actividad y de descanso. El segundo componente consta de un periodo de 12 h, que se manifiesta en la temperatura corporal y en la propensión al sueño típica de las horas siguientes al mediodía (Rodríguez et al., 2015).

1.5.3. Privación del sueño

El estudio de las funciones del sueño ha utilizado, clásicamente, manipulaciones experimentales que brindan datos muy generales sobre las consecuencias de la pérdida de sueño sobre el organismo.

El grupo de Rechtschaffen observó que la privación total de sueño en ratas las conduce a una muerte inevitable en un promedio de tres semanas (Everson et al., 1989). En el ínterin, las ratas exhibieron un importante deterioro físico, con ulceraciones en la piel, en la cola y en las patas, alteraciones en la coordinación motora y postural (ataxia), aumento en la ingesta de alimento acompañada de una pérdida de peso considerable e incremento en la energía expedita. Además, durante las últimas 24 horas, algunas ratas cursaron con una disminución drástica de la temperatura corporal. Para privar de sueño total a las

ratas, éstas se colocaron en una plataforma que rota cada vez que el animal presenta una actividad cerebral de ondas lentas, que sugiere que el animal se está quedando dormido (Bergmann et al., 1989). Estos trabajos sugieren que el cerebro del sueño beneficia de manera crucial al de la vigilia, por lo que es indispensable para la vida. Evidentemente, estos estudios indican que surge un desequilibrio homeostático por no dormir, originando una descompensación en el metabolismo de los animales bajo una privación total de sueño crónica.

1.6. Hibernación

Los endotermos pequeños, debido a sus elevadas tasas metabólicas, están muy expuestos a ayunar en los periodos de inactividad en los que no se alimentan. Algunos entran en un estado de torpor en esos periodos, en los que disminuyen la temperatura y la tasa metabólica. Cuanto menos sea la temperatura corporal, menor será la tasa metabólica y la velocidad de conversión de las reservas energéticas, como el tejido adiposo, en calor corporal. Por ello le será beneficioso permitir que su temperatura corporal disminuya en los periodos en que no se alimenta. Posteriormente y antes que el animal empiece su actividad, aumentará su temperatura corporal como resultado de un repentino aumento de actividad metabólica, especialmente por tiritos y oxidación de reservas de grasa. El colibrí y varias especies de pequeños mamíferos también experimentan torpor (p.ej., las musarañas), pero los grandes mamíferos tienen una masa corporal demasiado grande para enfriarse rápidamente en los cortos periodos de torpor (Randall et al., 2002).

La hibernación es un periodo de torpor o de aletargamiento invernal que puede durar semanas o incluso varios meses en los climas fríos; se acompaña de una caída considerable de la temperatura interna (Carey, 2003). Sólo los hibernadores pueden sobrevivir a esa temperatura, mientras que una temperatura inferior a 25°C es letal para todos los demás mamíferos. La hibernación es una adaptación fisiológica común en mamíferos de los órdenes Roedores, Insectívoros y Quiróptero, que pueden almacenar suficientes reservas energéticas para sobrevivir a periodos de falta de alimentos. Muchos hibernantes se despiertan periódicamente (tan a menudo como una vez por semana, o tan infrecuentemente como cada 4 a 6 semanas) para vaciar la vejiga urinaria y defecar (Randal et al., 2002).

1.6.1. Estructura de la hibernación

En especies como las ardillas de tierra (*Citellus o Spermophilus* spp.), es común poder observar el letargo estacional y disminución de la temperatura basal (Tb). Se han observado cambios bioquímicos y endocrinos preparatorios para la hibernación. Una vez se han dado los cambios estacionales, empieza la etapa de hibernación y puede durar hasta 6 meses. No obstante, los animales no permanecen continuamente tórpidos durante este período. La hibernación se caracteriza por episodios de letargo que pueden durar desde varias horas hasta varias semanas, separados unos de otros por breves despertares eutérmicos (Kilduff, 1993).

La estructura de la hibernación es parecida en las diferentes especies que hibernan, y consta de cuatro fases principales (Fig. 7):

1. La fase eutérmica se caracteriza por la presencia del sueño NREM o movimiento ocular no rápido (Walker et al., 1980).

2. La segunda fase, es la entrada de la hibernación, se caracteriza por una disminución en la T_b y el metabolismo. En las ardillas terrestres, ocurre aproximadamente durante 12-24 horas.

3. La fase de hibernación profunda se caracteriza por T_b por encima de la temperatura ambiental, puede llegar a estar a $1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ardillas de tierra (Heller et al., 1974) y en ardillas árticas se observa la subcongelación (Barnes, 1989). A medida que se observa la disminución de la T_b en valores eutérmicos de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la frecuencia cardíaca disminuye de 200-300 latidos / min a 7-10 latidos / min y la frecuencia respiratoria disminuye de 100-150 respiraciones / minuto a 1-2 respiraciones / minuto con presencia de períodos de apnea. Esta fase puede durar desde varias horas hasta semanas.

4. La fase es la excitación y el retorno a la condición eutérmica; esto se logra mediante una combinación de termogénesis temblorosa y no temblorosa. La movilización de las reservas de energía en la grasa marrón es un factor importante durante la excitación (Kilduff, 1993).

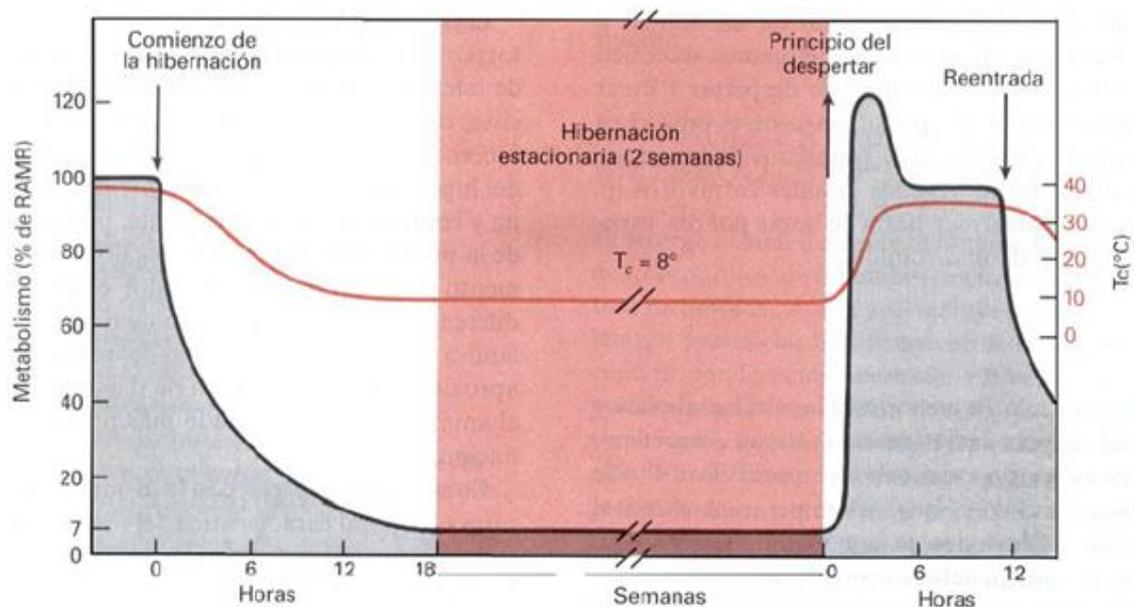


Figura 7: Esquema de las fases típicas de la hibernación. Modificado de Kilduff, 1993.

1.6.2. Actividad cerebral durante la hibernación

La hibernación es una adaptación para la conservación de la energía, y se ha afirmado que evolucionó como una extensión de los mecanismos del sueño NREM (Harris et al., 1984; Walker et al., 1977). Los animales entran en hibernación durante sueño NREM, mientras que el sueño REM desaparece gradualmente. Cuando la temperatura del núcleo corporal cae por debajo de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, el

electroencefalograma disminuye en amplitud hasta llegar a ser plano (Fig. 8). Los períodos de hibernación pueden durar varios días durante la estación fría, pero son interrumpidos por despertares periódicos aleatorios en los que la temperatura central aumenta a 37 °C (Walker et al., 1980).

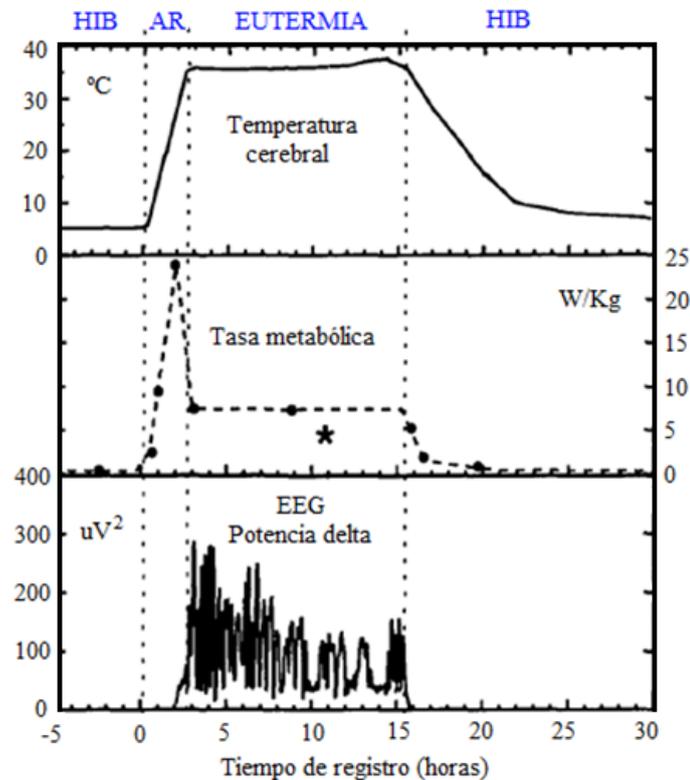


Figura 8: Evolución de la actividad de onda lenta del EEG (potencia delta), temperatura cerebral subcortical y metabolismo durante la hibernación (HIB), excitación (AR) y eutermia. Modificado de Kilduff, 1993.

Durante los despertares periódicos de episodios de hibernación profunda, las ardillas de tierra (*Spermophilus lateralis*) pasan la mayor parte del tiempo dormidas. El análisis espectral del electroencefalograma reveló que la intensidad cortical de ondas lentas durante el sueño es alta al comienzo de un período eutérmico y disminuye después. La intensidad de las ondas lentas del sueño, es mayor después de episodios más largos de hibernación que después de episodios más cortos, también se obtuvieron resultados similares en la ardilla del Ártico (Daan et al., 1991). El acortamiento de los episodios de hibernación causó una reducción del EEG de onda lenta durante las primeras 4 horas después de la excitación. Por otra parte, Trachsel en 1991 observó que la recuperación del sueño no tuvo lugar durante el letargo.

1.6.2. Hibernación, ahorro de energía y ondas lentas

Se ha comprobado que, previamente a la entrada en la hibernación, los animales hibernadores entran en sueño cuya profundidad aumenta progresivamente en proporción a los descensos en la temperatura

corporal. Dado que la temperatura corporal también disminuye durante el sueño de onda lenta (Glotzbach y Heller, 1976) algunos autores (Harris et al., 1984; Walker et al., 1980; Berger y Phillips, 1995) han propuesto que la hibernación y el sueño constituyen un estado único que sólo se distinguen por la mayor profundidad del primero, aunque ambos tendrían la misma función básica: el ahorro energético. Esta función es indudable en el caso de la hibernación, pero no tanto para el sueño, ya que se ha calculado que la energía ahorrada tras 8h de sueño sería equivalente al contenido energético de una tostada. Por esto, la hipótesis de que el sueño sirve para ahorrar energía está lejos de ser aceptada por la comunidad científica. Sin embargo, se observó que, al despertar tras un período de hibernación, aparece un período de vigilia con alta potencia en el EEG de ondas lentas, de la misma forma que ocurre tras la privación de sueño (Trachsel, 1991). Este resultado fue interpretado suponiendo que la hibernación no permite que el organismo lleve a cabo las funciones de ahorro de energía o de recuperación, que se supone que se obtienen tras un período de sueño. Por esto, la hibernación parece ser un estado en el que ocurre privación de sueño que debe recuperarse al finalizar un período de hibernación. La recuperación del sueño perdido recibe el nombre de “rebote de sueño”.

1.7. Privación del sueño durante la hibernación. Análisis crítico de la hipótesis

1.7.1. Rebote de sueño

Para que la hibernación y el sueño constituyan un estado único es preciso que ambos estados estén regulados homeostáticamente en el cual cierta variable aumenta o disminuye durante la vigilia, cambio que se restituye durante el sueño. Ciertamente, la regulación homeostática, tanto de la hibernación, como del sueño están relativamente bien comprendidos, aunque para el sueño, las lagunas son más importantes. Como se ha descrito, se desconoce cuál es la variable regulada durante el sueño. Además, la misma existencia de regulación homeostática para el sueño nunca ha estado suficientemente bien establecida. Si se suprime el sueño, su función debe cesar y, si esta función es de importancia vital, debe recuperarse más pronto o más tarde. Sin embargo, desde el principio se comprobó que no existe relación entre la cantidad de sueño perdido durante la privación y la cantidad de sueño recuperado durante el rebote. El ejemplo sobresaliente de dicha ausencia fue el caso de Randy Gardner, un estudiante de 17 años que en el año 1964 permaneció sin dormir durante 11 días y 25 minutos, que, a pesar de la enorme privación sufrida, se recuperó tras dormir 14 h y 40 min en la primera fase de recuperación y, en la segunda, diez horas y media, sin que, a continuación, se manifestara ninguna consecuencia indeseable. Un equipo de neurocientíficos, encabezado por el doctor William Dement, se encargó de monitorizar los signos vitales del joven y a escribir un informe detallado sobre su evolución

De hecho, la ausencia de correlación observada en el caso de Randy Gardner se ha comprobado repetidamente. Por ejemplo, se ha observado que la privación total de sueño determina importantes y prolongados incrementos en la cantidad de sueño REM (Rechtschaffen et al 1999), cuyo EEG no muestra las ondas lentas que se aprecian tras la hibernación. Además, la magnitud de los rebotes

observados después de la privación nunca alcanza a compensar la cantidad de sueño perdida durante la privación. Para superar estos problemas se han propuesto numerosas alternativas que, básicamente, suponen que los rebotes se manifiestan, no sólo como aumentos en la cantidad de sueño, sino en su intensidad. Sin embargo, ha sido difícil demostrar efectivamente que la intensidad del sueño aumente de forma significativa durante los rebotes (Friedman et al., 1978).

1.7.2. Delta EEG durante la vigilia

Está generalmente aceptado que las ondas delta del EEG son indicadores exclusivos del sueño NREM. Sin embargo, esta suposición está lejos de ser segura. Es sabido que las ondas delta del EEG son indicadoras de la inhibición cortical causada por el hipotálamo rostral que promueve el sueño y que, por supuesto, se manifiesta durante el sueño NREM, (McGinty et al., 2001) pero las ondas lentas también aparecen en individuos despiertos. Por ejemplo, se ha observado la existencia de EEG delta en individuos despiertos en los cuales la sincronización del EEG en las frecuencias bajas se relaciona con el procesamiento emocional (Basar, 2006; Güntekin, 2007; Kamarajan et al., 2008; Knyazev y Slobodskoj-Plusnin, 2007; Knyazev, et al., 2009) Para los propósitos del presente trabajo, un caso particularmente interesante es la aparición de EEG delta acompañado de husos que se observa en animales plenamente despiertos tras la administración de dosis elevadas de atropina (Wickler, 1952). De acuerdo con los hechos bien conocidos, la inhibición de las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal debe provocar EEG de onda lenta (Szymusiak y McGinty, 1986; Szymusiak et al., 2000), como realmente se observó tras la administración de atropina (Wickler, 1952), así como tras la hibernación en ardillas y en otras especies (Trachsel, 1991; Longo, 1966; Itil y Fink 1968; Castro-Zaballa et al., 2019), pero en ningún caso vigilia, como se observó, tanto tras la administración de atropina, como tras la hibernación, constituyendo uno más de los múltiples enigmas que supone la presencia universal de sueño en los animales.

1.7.3. Acetilcolina, agonistas y antagonistas

La activación de las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal es responsable de la reacción de alerta, en la que el EEG presenta bajo voltaje y frecuencias mixtas (Szymusiak y McGinty, 1986; Szymusiak et al., 2000). La activación de otras neuronas colinérgicas del puente, de los núcleos pedunculopontino (PPT) y laterodorsal tegmental (LDT) también producen un EEG de baja amplitud y frecuencias mixtas, pero no durante la vigilia, sino durante el sueño REM. Por lo tanto, existen varios núcleos colinérgicos cerebrales cuya activación determina, en unos casos vigilia, y en otros REM.

También son colinérgicas las neuronas preganglionares y postganglionares del sistema nervioso autónomo parasimpático, así como algunas neuronas postganglionares del sistema simpático, que no son adrenérgicas, como cabría esperar, sino colinérgicas, controlando las glándulas sudoríparas y el endotelio vascular de algunas regiones. En general, la actividad simpática se activa durante las

situaciones de peligro real o potencial y la parasimpática controla las funciones viscerales necesarias para el mantenimiento y la supervivencia.

Existen dos tipos básicos de receptores para la acetilcolina: nicotínicos y muscarínicos y se conocen muchos de sus agonistas y antagonistas. En particular, la atropina, que, como se ha visto, determina disociación entre el EEG y el comportamiento, es un antagonista de los receptores muscarínicos. Pero la actividad general de los agonistas para los receptores colinérgicos depende de otro factor: la posibilidad de que, administrados periféricamente, tengan o no actividad sobre los receptores colinérgicos cerebrales, o la tengan solamente en tejidos periféricos. Esta posibilidad depende de su estructura molecular, ya que si tienen un grupo amonio terciario pueden atravesar la barrera hematoencefálica, pero si el amonio es cuaternario, no tienen actividad sobre el sistema nervioso central, a diferencia de aquellos que tienen un grupo de amonio terciario, que se absorben fácilmente y ejercen acciones sobre el sistema nervioso central. Ejemplos de estos últimos son el carbacol, la metacolina y la pilocarpina. Al contrario, la neostigmina y la muscarina no atraviesan la barrera hematoencefálica y solo tienen actividad sobre las sinapsis periféricas. Sobre todo, inhiben la placa motora de la musculatura somática y también tienen actividad visceral, produciendo, por ejemplo, bradicardia. Es importante señalar que tanto el sistema simpático, como el parasimpático (vago) presentan un tono continuo con descargas permanentes sobre todos los tejidos, con lo que sus efectos siempre son el resultado de un equilibrio entre la actividad simpática y parasimpática.

1.7.4. Hibernación y acetilcolina

Los cambios en la frecuencia cardíaca que aparecen durante la entrada en hibernación dependen básicamente del sistema parasimpático. De hecho, el sistema parasimpático tiene una actividad cíclica y determina el descenso en la temperatura corporal pero también causa arritmia sinusal respiratoria y, en general, es responsable de la bradicardia y la reducción en la frecuencia respiratoria tal como se observan en las primeras fases de la hibernación.

Notablemente, cuando la temperatura corporal y la frecuencia cardíaca alcanzan valores mínimos, la administración de atropina suele producir incrementos paradójicos transitorios en la frecuencia cardíaca y respiratoria, lo que indica que la actividad parasimpática desaparece al llegar al estado estacionario de la hibernación, mientras que, en el estado final de la hibernación, la frecuencia cardíaca y la respiración sólo dependen de la temperatura corporal. En cambio, la salida de la hibernación sólo depende del sistema simpático (Twente y Twente 1978; Harris y Milsom 1995; Drew et al., 2007) que determina la reaparición de las arritmias y las frecuencias cardíaca y respiratoria como consecuencia exclusiva de la activación α adrenérgica. Como resultado final, el tono vagal desaparece durante la hibernación profunda (Milsom et al., 2001).

2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Trachsel (1991) sugiere que las bajas temperaturas corporales durante la hibernación son incompatibles con la función restauradora del sueño, lo cual se refleja como incrementos en la potencia delta del EEG de la actividad cortical. Los animales deben incurrir en los costos energéticos de los despertares periódicos de la hibernación para recibir los beneficios restauradores del sueño eutérmico de onda lenta. Esto sugiere que, durante la hibernación, los animales están privados de sueño y la entrada en eutermia exige recuperar la deuda de sueño acumulada.

Todo se basa en la suposición de que las ondas lentas son indicios exclusivos del sueño, y eso no es del todo seguro. Por ejemplo, los registros de EEG de los recién nacidos humanos y del ornitorrinco (Siegel et al., 1999) muestran ondas lentas durante el sueño REM, incluso durante la vigilia tal como se indicó anteriormente. De hecho, el propio Trachsel observó que el tiempo inmediato después del despertar de las ardillas no solo se caracteriza por la sincronización del EEG, sino que también tiene períodos distintos de desincronización del EEG (episodios de vigilia o sueño REM), que pueden sumar hasta el 20% del tiempo total de grabación al comienzo de la eutermia. Además, las ardillas son totalmente capaces de ciertas actividades de vigilia, como reaccionar rápidamente a estímulos externos y correr inmediatamente después de la excitación. Es improbable que tal comportamiento ocurra si el cerebro no es completamente funcional.

Dado que la actividad del sistema nervioso parasimpático es nula durante la recuperación de la hibernación, puede afirmarse que el animal se encuentra en un estado equivalente a un bloqueo atropínico completo. Si esto fuera cierto, quedaría explicada la presencia de ondas lentas en el EEG, que aparecerían, no como consecuencia de una eventual privación de sueño, sino como un resultado directo de la inactivación completa del sistema parasimpático. No obstante, la administración de neostigmina durante el inicio del regreso a la eutermia permitiría la recuperación de las frecuencias cardíaca y respiratoria, así como la eutermia que, como se ha explicado, dependen de la estimulación α adrenérgica. Sin embargo, como la neostigmina es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, no causaría efectos centrales y, en particular, no provocaría la aparición del EEG de ondas lentas. Con esto se demostraría que el aumento en la potencia delta subsiguiente a la recuperación de la hibernación es un proceso dependiente de la reactivación súbita del sistema nervioso autónomo parasimpático y la presencia del EEG de onda lenta observada tras la administración de atropina sería un artefacto cuyas causas aún no están determinadas, pero en todo caso no relacionadas con el sueño, sino que sería, simplemente, una consecuencia de la incapacitación colinérgica asociada a la hibernación unida a un artefacto ocasionado por los efectos centrales de la atropina. En este caso, tal como ha sido sugerido como alternativa (Trachsel, 1991), la producción de ondas lentas sería un fenómeno asociado a la desaparición del tono vagal durante la hipotermia y no a la privación de sueño.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Los experimentos se llevarán a cabo en tres grupos de seis ejemplares de hámster dorado de la especie *Mesocricetus auratus* (Foto. 1) con capacidad de hibernación. Estos animales serán proporcionados por la empresa francesa Janvier lab, que cuenta con muy buenas instalaciones de cría de roedores y con especialistas en animales transgénicos.

Al llegar, estos animales se mantendrán bajo el periodo de cuarentena y después serán estabulados en las estancias del animalario de la Universitat de les Illes Balears. Los animales se ubicarán en jaulas individuales provistas de un bebedor de agua y alimento “*ad libitum*”, en condiciones de iluminación 12/12 L/D (Luz/Oscuridad) y una temperatura de 20°C.



Fotografía 1: *Mesocricetus auratus*.

3.2. Metodología

3.2.1. Técnica operatoria

Antes del procedimiento quirúrgico, los animales serán anestesiados por inhalación utilizando como anestésico el isoflurano (Forane, Abbot ®). A continuación, se colocarán en el aparato estereotáxico para una implantación crónica de electrodos de plata que serán fijados en el cráneo de los animales con un cemento acrílico Duralay® (Fig. 9).

El principal indicador del sueño es el registro del EEG. Para ello se colocarán 2 electrodos activos, cada uno de ellos en un hemisferio, sobre la corteza cerebral, y un electrodo referencial situado en el cerebelo; consiguiendo de esta manera dos canales monopares de EEG.

Para tener una buena definición de las distintas etapas del sueño es imprescindible contar con el registro de la actividad de la musculatura antigravitatoria: electromiograma (EMG). En este caso se implantarán dos electrodos activos en la musculatura del cuello (registro bipolar).

Para el registro del electrocardiograma (ECG) se colocarán dos electrodos entre la piel y la musculatura de la espalda del animal. Las fluctuaciones de la frecuencia cardíaca en las diferentes fases

del experimento se valorarán por las mediciones del intervalo R-R de la señal ECG (Variabilidad de la Frecuencia Cardiaca).

Para el registro de la temperatura cerebral se insertará un termistor profundamente en el prosencéfalo.

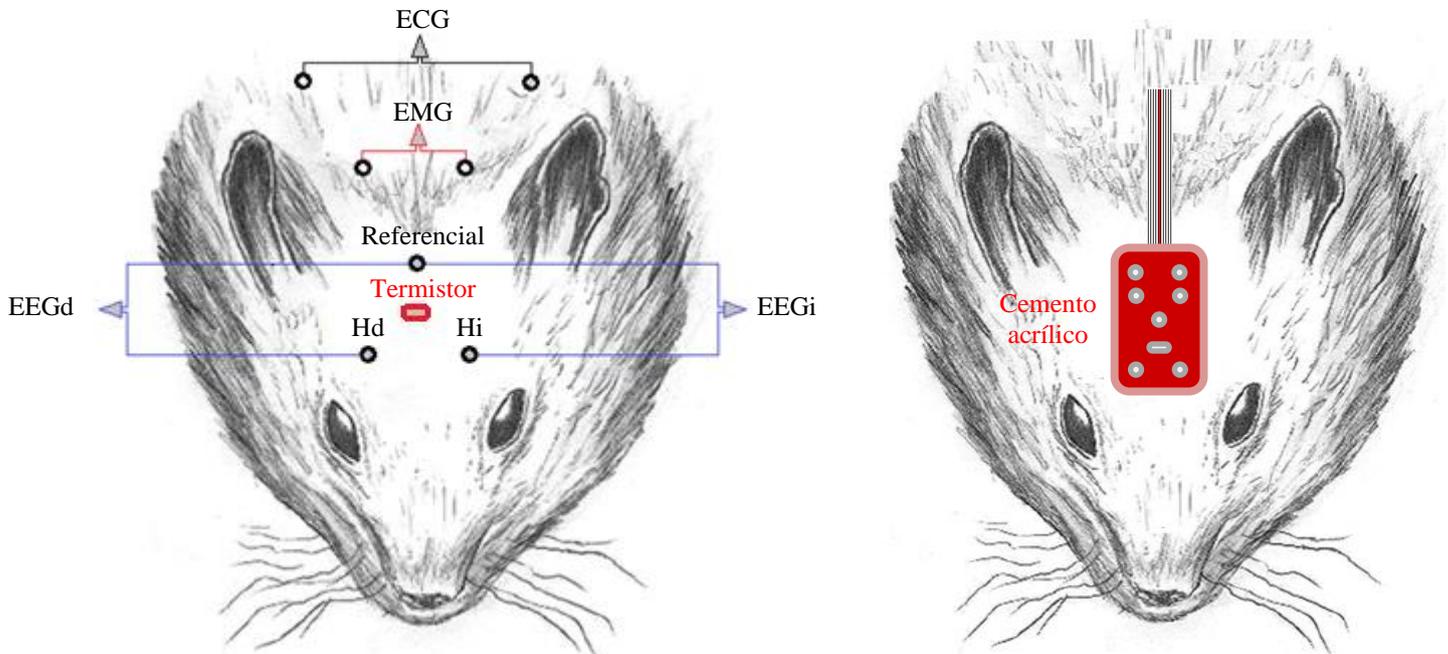


Figura 9: Localización de los electrodos en el hámster dorado *Mesocricetus auratus*.

3.2.2. Adquisición de datos

Después de la operación, los animales, se colocarán en jaulas individuales transparentes de una dimensión de 20 x 22 x 21 cm, provistas de bebedero con agua, alimento (pienso *ad libitum*) y viruta. A continuación, serán introducidos en una cámara insonorizada y termostata para su recuperación y su habituación. Estarán una semana en su nuevo hogar en las mismas condiciones de luz y temperatura que las del estabulario (12/12 L/D a 20°C).

En la segunda semana se modificará el fotoperíodo, pasando a ser de 8/16 L/D y la temperatura del habitáculo se reducirá a 15°C.

En la tercera semana, la iluminación pasará a ser de 4/20 y la temperatura bajará a 5°C. Esta situación se mantendrá hasta que se observen indicios de hibernación.

Los movimientos realizados por los animales serán registrados durante todo el tiempo de experimentación; se muestrearán en intervalos de 5 minutos, con un intervalo mínimo de 10 milisegundos por movimiento. Las interrupciones del haz de luz se miden constantemente usando un equipo transmisor y un software DAS 24 V29, diseñado por el grupo de Cronobiología de la Universidad de Barcelona, que permite observar y guardar los patrones de movimiento para su análisis posterior.

Previamente a la exploración de los diferentes parámetros electrofisiológicos, se conectará el animal al sistema de registro (Fig. 10) formado por un amplificador y un convertidor analógico digital Digidata 1322 (Axscope). En el caso de EEG, EMG, ECG se utilizará una frecuencia de muestreo de 200 muestras cada segundo (200 Hz), un filtro rechazador de 50 Hz y filtros pasa-altos y pasa-bajos característicos de cada variable. La temperatura cerebral se medirá cada segundo.

La hibernación se mantendrá durante una semana, al final de la cual cada animal recibirá, por inyección intraperitoneal suero salino (grupo 1), atropina 1 mg/kg (grupo 2) y 0.4 mg/kg de neostigmina (grupo 3) (Miranda-Chávez et al., 2018). Se espera que estas maniobras activen la salida de la hibernación. Se registrarán las diferentes variables al menos durante cuatro horas durante la recuperación de la hibernación.

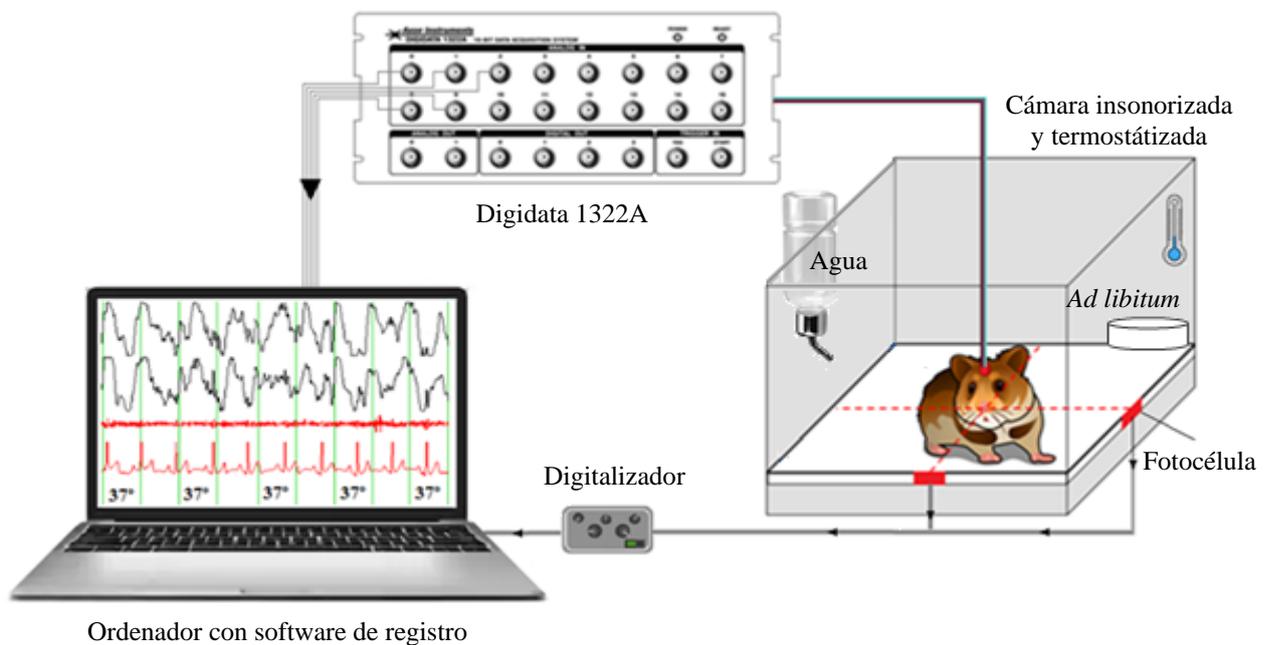


Figura 10: Circuito para el registro de EEG, EMG, ECG, temperatura cerebral y ritmo de actividad-inactividad del animal.

La velocidad de despertarse de la hibernación suele ser mucho más alta que la de entrada en hibernación. Así, en el caso, por ejemplo, de la ardilla terrestre la transición al estado de torpor necesita de 1 a 18 horas, mientras que el despertar requiere menos de 3 horas. La rapidez de despertarse en este mamífero de talla media depende del rápido calentamiento iniciado por una intensa oxidación de la grasa acompañada de tiritos; lo que causa un gran aumento de la tasa metabólica.

3.2.3. Análisis de los parámetros fisiológicos

A. Análisis del ritmo circadiano

Una vez recogidos los datos de movimiento del hámster, gracias a los sensores infrarrojos de los marcos de las jaulas, se procederá al análisis de los ritmos circadianos mediante:

- Análisis visual que se realizará mediante el actograma. Consiste en el ordenamiento vertical consecutivo de gráficas de ocurrencia de eventos. Para ello se utilizará el programa OriginPro.

B. Análisis de la actividad cerebral

En el caso del EEG se procederá primero al reconocimiento visual de las diferentes fases de sueño y vigilia, así como durante la hibernación. Para ello la señal EEG se clasificará en tres categorías (Fig. 11):

- Hibernación con amplitud de EEG muy baja (prácticamente nula) y frecuencias inespecíficas.
- EEG desincronizado de amplitud baja a intermedia, categoría que incluye la vigilia durante la eutermia, la excitación o el reingreso a la hibernación, así como el sueño REM.
- EEG sincronizado de amplitud intermedia-alta que corresponde al “sueño NREM”.

Aparte del reconocimiento visual, mediante la transformada rápida de Fourier (FFT) se analizará la señal EEG desde el punto de vista de la frecuencia. Dicho análisis se basa sobre la descomposición de una señal periódica compleja en una serie de ondas sinusoidales relacionadas entre si de forma armónica obteniendo un espectro de potencias. La figura 12 muestra un ejemplo de espectro de potencias en el ratón.

El registro del EMG ayudará a reconocer las distintas etapas del sueño, hibernación, arousals y vigiliass.

C. Análisis de la actividad cardíaca

Tal como fue indicado anteriormente, las variaciones de la frecuencia cardíaca en las diferentes fases del experimento se valorarán calculando el intervalo R-R de la señal ECG, conocido como la señal de variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV) determinadas por los procesos respiratorios y mediados por la actividad de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático.

D. Temperatura

El registro de esta variable nos permitirá saber en todo momento la temperatura cerebral del animal. Se establecerá una correlación entre la temperatura registrada y las actividades cerebrales y cardíacas, así como la actividad motora general.

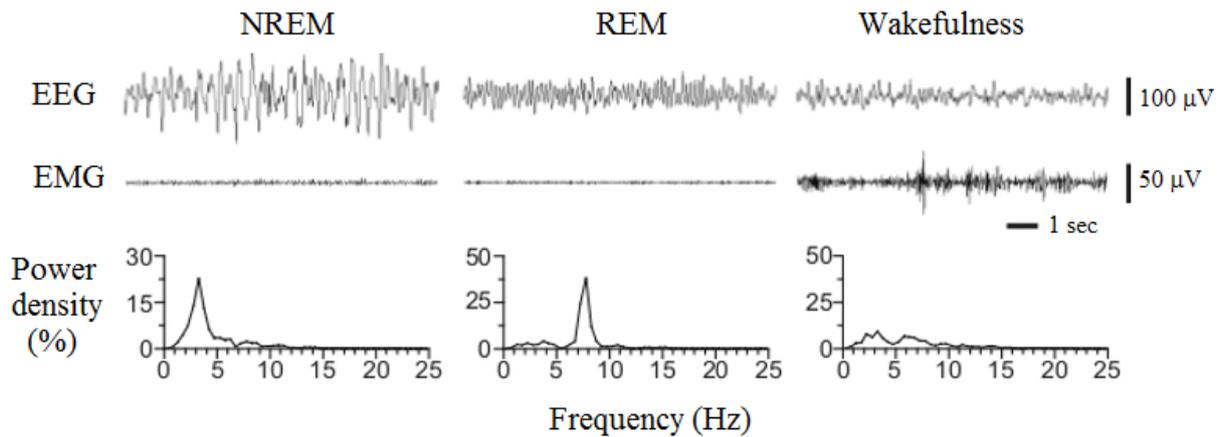


Figura 11: Espectros de potencia de EEG durante el sueño NREM, el sueño REM y vigilia en el ratón. En el sueño NREM, el EEG muestra ondas delta (0,5- 4 Hz). En el sueño REM, el EEG muestra ondas de baja amplitud y ondas theta (6-10 H). En vigilia, el EEG muestra ondas de baja amplitud y alta frecuencia. El tono muscular alto durante la vigilia, bajo durante el sueño NREM y atonía durante el sueño REM. Modificada de Oishi et al., 2016.

3.2.4. Análisis estadístico

Se analizarán de los resultados obtenidos, expresados en valores medios \pm error estándar de la media, seguido del análisis de varianza (ANOVA) univariante y/o la prueba T-student de muestras relacionadas con el programa OriginPro. En ambos casos se considerará como estadísticamente significativo un nivel de probabilidad igual o inferior a $p < 0.05$ y si es necesario se realizarán las comparaciones múltiples (*post hoc*) de LSD o Bonferroni para identificar los grupos estadísticamente diferentes.

3.3. Planificación del trabajo

Los experimentos con animales se realizarán después de obtener la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA). Todas las fases del trabajo serán bajo la tutela y la supervisión del profesor Dr. Mourad Akaarir El ghourri.

En la primera fase del proyecto, se procederá a obtener todos los permisos necesarios y el material de experimentación. En la segunda fase se realizarán los experimentos con hámsters en el laboratorio de fisiología animal de la Universitat de les Illes Balears. El procedimiento a seguir será igual en los tres grupos experimentales (control, atropina y neostigmina), con excepción de la inyección intraperitoneal que será específica en cada grupo. Finalmente, se analizarán los resultados obtenidos para poder extraer conclusiones y realizar un informe (Tabla 1).

Tabla 1: Calendario del proyecto

2020	Ene.				Feb.				Mar.				Abr.				May.			
Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Material y maquinaria																				
Obtención y ensamblado																				
Experimentación con hámster																				
Implantación electrodos (1 día)																				
Recuperación del animal																				
8/16 L/D a 20°C																				
4/20 a 5°C (Hibernación)																				
Inyección intraperitoneal																				
Recogida y análisis de datos																				

3.4. Presupuesto

El coste total del material necesario para poder llevar a cabo el proyecto es de 1.068,58 € (Tabla 2).

Tabla 2: Presupuesto total del proyecto

Concepto	Cantidad	Valor unitario (€)	Valor total (€)
Aparato estereotáxico	1 ud.	0*	0*
Axoscope digidata 1322 ^a	1 ud.	0*	0*
Digitalizador	1 ud.	0*	0*
Ordenador	1 ud.	0*	0*
Jaulas con infrarrojos	18 ud.	0*	0*
Cámara insonorizada y termostatizada	1 ud.	0*	0*
Hámster	18 ud.	44,21	795,79
Mantenimiento diario animal	18 ud.	0*	0*
Electrodos	7 ud./ind.	0*	0*
Termistor	1 ud./ind.	0*	0*
Cemento acrílico Duralay	59 ml	20,69	20,69
Isoflurano	1 ud.	0*	0*
Atropina	5 g.	57,10	57,10
Neostigmina	5 g.	195	195
PRESUPUESTO TOTAL			1.068,58

*Coste cero debido a que ya se tiene en el laboratorio

4. BIBLIOGRAFÍA

Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 25, pp. 11-28). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Aschoff, J. (1963). Comparative physiology: diurnal rhythms. *Annual review of physiology*, 25(1), 581-600.

Aschoff, J. (1964). Circadian rhythms in man. *Science*, 148, 1427-143.

Aschoff, J. (1981). Freerunning and entrained circadian rhythms. In *Biological rhythms* (pp. 81-93). Springer, Boston, MA.

Barnes, B. M. (1989). Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. *Science*, 244(4912), 1593-1595.

Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., y Goldman, B.D. (1933). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *Journal of Pineal Research*, 15, 161-190.

Başar, E., Güntekin, B., & Öñiz, A. (2006). Principles of oscillatory brain dynamics and a treatise of recognition of faces and facial expressions. *Progress in brain research*, 159, 43-62.

Basheer, R., Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M. M., & McCarley, R. W. (2000). Adenosine as a biological signal mediating sleepiness following prolonged wakefulness. *Neurosignals*, 9(6), 319-327.

Benarroch, E. E. (2008). Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations. *Neurology*, 71(8), 594-598.

Berger, R. J., & Phillips, N. H. (1995). Energy conservation and sleep. *Behavioural brain research*, 69(1-2), 65-73.

Bergmann, B. M., Kushida, C. A., Everson, C. A., Gilliland, M. A., Obermeyer, W., & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep deprivation in the rat: II. Methodology. *Sleep*, 12(1), 5-12.

Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295(5557), 1070-1073.

Borbély, A. A. (1982a). Sleep regulation: circadian rhythm and homeostasis. In *Sleep* (pp. 83-103). Springer, Berlin, Heidelberg.

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

Brown Jr, F. A. (1976). Biological clocks: endogenous cycles synchronized by subtle geophysical rhythms. *Biosystems*, 8(2), 67-81.

Bruce Durie, D. J. (1981). Sleep in animals. *Psychopharmacology of Sleep*. Raven Press, New York, 1-18.

Cajochen, C., Kräuchi, K., & Wirz-Justice, A. (2003). Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *Journal of neuroendocrinology*, 15(4), 432-437.

Carey, H. V. (2003). Andrews MT, and Martin SL. *Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature*. *Physiol Rev*, 83, 1153-1181.

Carús-Cadavieco, M., & Andrés, I. D. (2012). Adenosina y control homeostático del sueño: Acciones en estructuras diana de los circuitos de vigilia y sueño. *Revista de Neurología*.

Castro-Zaballa, S., Cavelli, M., González, J., Monti, J., Falconi, A., & Torterolo, P. (2019). EEG dissociation induced by muscarinic receptor antagonists: Coherent 40 Hz oscillations in a background of slow waves and spindles. *Behavioural brain research*, 359, 28-37.

Daan, S., Barnes, B. M., & Strijkstra, A. M. (1991). Warming up for sleep?—ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neuroscience letters*, 128(2), 265-268.

Dement, W., & Kleitman, N. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 9(4), 673-690.

Drew, K. L., Buck, C. L., Barnes, B. M., Christian, S. L., Rasley, B. T., & Harris, M. B. (2007). Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *Journal of neurochemistry*, 102(6), 1713-1726.

Everson, C. A., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep*, 12(1), 13-21.

Flanigan Jr, W. F. (1973). Sleep and Wakefulness in Iguanid Lizards, *Ctenosaura pectinata* and *Iguana iguana*; pp. 417–436. *Brain, behavior and evolution*, 8(6), 417-436.

Friedman, L., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1978). Effects of sleep deprivation on sleepiness, sleep intensity, and subsequent sleep in the rat. *Sleep*, 1(4), 369-391

Glotzbach, S. F., & Heller, H. C. (1976). Central nervous regulation of body temperature during sleep. *Science*, 194(4264), 537-539.

Golombek, D. (2002). Introducción: La máquina del tiempo. *Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*, 2, 19-35.

Golombek, D. y Yannielli, P. (2006). Organización del sistema circadiano en vertebrados. En *Cronobiología básica y clínica*. Madrid: Juan Antonio Madrid Pérez y María de los Ángeles Rol de Lama, pp.192-224.

Güntekin, B., & Basar, E. (2007). Emotional face expressions are differentiated with brain oscillations. *International Journal of Psychophysiology*, *64*(1), 91-100.

Halberg, F. (1959). Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Z. Vitamin-, Hormon- u Fermentforsch*, *10*, 225.

Harris, D. V., Walker, J. M., & Berger, R. J. (1984). A continuum of slow-wave sleep and shallow torpor in the pocket mouse *Perognathus longimembris*. *Physiological zoology*, *57*(4), 428-434.

Harris, M. B., & Milsom, W. K. (1995). Parasympathetic influence on heart rate in euthermic and hibernating ground squirrels. *Journal of experimental biology*, *198*(4), 931-937.

Hastings, M. H., Reddy, A. B., & Maywood, E. S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(8), 649-661.

Hayashi, Y., & Liu, C. Y. (2017). The Evolution and Function of Sleep. In *Brain Evolution by Design* (pp. 343-366). Springer, Tokyo.

Heller, H. C., & Colliver, G. W. (1974). CNS regulation of body temperature during hibernation. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *227*(3), 583-589.

Itil, T., & Fink, M. (1968). EEG and behavioral aspects of the interaction of anticholinergic hallucinogens with centrally active compounds. In *Progress in brain research* (Vol. 28, pp. 149-168). Elsevier.

Kamarajan, C., Rangaswamy, M., Chorlian, D. B., Manz, N., Tang, Y., Pandey, A. K., ... & Porjesz, B. (2008). Theta oscillations during the processing of monetary loss and gain: a perspective on gender and impulsivity. *Brain research*, *1235*, 45-62.

Kilduff, T. S., Krilowicz, B., Milsom, W. K., Trachsel, L., & Wang, L. C. (1993). Sleep and mammalian hibernation: homologous adaptations and homologous processes?. *Sleep*, *16*(4), 372-386.

Klein, D. C. (1985, January). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In *Ciba Found Symp* (Vol. 117, pp. 38-56).

Knyazev, G. G., & Slobodskoj-Plusnin, J. Y. (2007). Behavioural approach system as a moderator of emotional arousal elicited by reward and punishment cues. *Personality and Individual Differences*, *42*(1), 49-59.

Knyazev, G. G., Slobodskoj-Plusnin, J. Y., & Bocharov, A. V. (2009). Event-related delta and theta synchronization during explicit and implicit emotion processing. *Neuroscience*, *164*(4), 1588-1600.

Longo, V. G. (1966). Behavioral and electroencephalographic effects of atropine and related compounds. *Pharmacological Reviews*, *18*(2), 965-996.

McGinty, D., Alam, M. N., Szymusiak, R., Nakao, M., & Yamamoto, M. (2001). Hypothalamic sleep-promoting mechanisms: coupling to thermoregulation. *Archives italiennes de biologie*, 139(1), 63-76.

Milsom, W. K., Zimmer, M. B., & Harris, M. B. (2001). Vagal control of cardiorespiratory function in hibernation. *Experimental Physiology*, 86(6), 791-796.

Miranda-Chávez, H., Sakihara-Kobashigawa, W., Reyna-Orozco, P., Ricra-Morales, P., Mundaca-Villanueva, E., Muñoz-Villanueva, M., ... & Salazar-Granara, A. (2018). Influencia de la vía de administración sobre el efecto del extracto etanólico de la semilla de *Jatropha curcas* L., en la motilidad intestinal en ratones albinos. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 3(1), 34-39.

Moore-Ede, M. C. (1986). Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 250(5), R737-R752.

Oishi, Y., Takata, Y., Taguchi, Y., Kohtoh, S., Urade, Y., & Lazarus, M. (2016). Polygraphic recording procedure for measuring sleep in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (107), e53678.

Piéron, H. (1913). Le problème physiologique du sommeil. In *Le problème physiologique du sommeil*.

Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 25, pp. 159-184). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2000). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience*, 99(3), 507-517.

Randall, D. J., Burggren, W., & French, K. (2002). *Fisiología Animal*. España: Eckert, 4ed.

Randler, C. (2014). Sleep, sleep timing and chronotype in animal behaviour. *Animal Behaviour*, 94, 161-166.

Rechtschaffen, A., & Kales, A. (1968). A manual of standardized terminology, technique and scoring system for sleep stages of human sleep. *Brain Information Service, Los Angeles*.

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

Rial, R. V., Akaârîr, M., Gamundí, A., Nicolau, C., Garau, C., Aparicio, S., ... & Coenen, A. M. (2010). Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: from reptiles to mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1144-1160.

Rodriguez, B., Madrid, C., Estivill, E., & Madrid, J. A. (2015). Cronobiología del sueño. En *Patología básica del sueño* (pp. 21–25). Barcelona: Elsevier. Barcelona: Elsevier.

Rusak, B. E. N. J. A. M. I. N., & Zucker, I. R. V. I. N. G. (1979). Neural regulation of circadian rhythms. *Physiological reviews*, 59(3), 449-526.

Schwierin, B., Borbély, A. A., & Tobler, I. (1996). Effects of N6-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. *European journal of pharmacology*, 300(3), 163-171.

Siegel, J. M., Manger, P. R., Nienhuis, R., Fahringer, H. M., Shalita, T., & Pettigrew, J. D. (1999). Sleep in the platypus. *Neuroscience*, 91(1), 391-400.

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

Szymusiak, R., & McGinty, D. (1986). Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. *Brain research*, 370(1), 82-92.

Szymusiak, R., Alam, N., & McGinty, D. (2000). Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep. *Behavioural brain research*, 115(2), 171-182.

Tobler, I. (1984). Evolution of the sleep process: A phylogenetic approach. *Sleep Mechanisms. Exp Brain Res Suppl*, 8, 207-226.

Trachsel, L. O. R. E. N. Z., Edgar, D. M., & Heller, H. C. (1991). Are ground squirrels sleep deprived during hibernation?. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 260(6), R1123-R1129.

Twente, J. W., & Twente, J. (1978). Autonomic regulation of hibernation by *Citellus* and *Eptesicus*. In *Strategies in Cold* (pp. 327-373). Academic Press.

Vela-Bueno, A., Olavarrieta-Bernardino, S. y Fernández-Mendoza, J. (2007). Melatonin, sleep, and sleep disorders. *Sleep Medicine Clinics*, 2, 303-312.

Walker, J. M., Glotzbach, S. F., Berger, R. J., & Heller, H. C. (1977). Sleep and hibernation in ground squirrels (*Citellus* spp): electrophysiological observations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 233(5), R213-R221.

Walker, J. M., Haskell, E. H., Berger, R. J., & Heller, H. C. (1980). Hibernation and circannual rhythms of sleep. *Physiological Zoology*, 53(1), 8-11.

Wikler, A. (1952). Pharmacologic dissociation of behavior and EEG “sleep patterns” in dogs: morphine, N-allylnormorphine, and atropine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 79(2), 261-265.