



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo Final de Grado

Efecto de un antidepresivo tricíclico sobre el EEG de *Gallotia galloti* y su relación con la evolución del sueño

Rosa Rado Sánchez

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 41571322H

Trabajo tutelado por Mourad Akaârir El Ghourri
Departamento de Biología

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo: sueño, vigilia, electroencefalograma, potencial evocado, *Gallotia galloti*, imipramina.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN	6
El sueño como comportamiento.....	6
El sueño electrofisiológico.....	6
Potenciales evocados.....	8
La neuroanatomía del sueño.....	8
La terapia antidepresiva y el sueño.....	9
El sistema nervioso de los reptiles.....	10
La evolución del sueño. Mamíferos y reptiles.....	10
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
5. MATERIAL Y METODOLOGÍA	13
Animales.....	13
Técnica operatoria.....	13
Tratamientos y técnica de registro.....	14
Análisis de las señales bioeléctricas.....	15
Análisis estadístico.....	16
6. RESULTADOS	17
7. DISCUSIÓN	21
8. CONCLUSIONES	23
9. REFERENCIAS	24

RESUMEN

El ciclo sueño-vigilia es el más estudiado de los ciclos circadianos y concretamente el sueño es un campo en el que la neurociencia ha profundizado, pero su evolución hasta llegar al nivel de los mamíferos todavía está por aclarar. Las últimas hipótesis se basan en que el sueño de los mamíferos procede del estado de vigilia de los reptiles, y para llevar a cabo estas investigaciones se usan criterios electrofisiológicos que incluyen el registro del electroencefalograma (EEG), el cual indica la actividad eléctrica cerebral y es el principal indicador del sueño.

Para profundizar en los principios del sueño, se presenta este estudio con la especie lacértida *Gallotia galloti*. Teniendo en cuenta que los antidepresivos tricíclicos (ADT) producen una reducción total del sueño REM en mamíferos, se supone que si en reptiles suprimen alguna de las fases de su vigilia, este estado podría entenderse como el antecesor filogenético del sueño REM. Con este trabajo se ha comprobado que la imipramina (ADT) produce sobre el EEG de *Gallotia galloti* el efecto de suprimir la respuesta al sobresalto después de un estímulo acústico, hecho que aporta otra evidencia de la homología entre la vigilia de los reptiles y el sueño de los mamíferos.

ABSTRACT

Sleep-wake cycle is the most studied circadian rhythms and sleep is a particular field in which neuroscience has deepened. Nevertheless, sleep evolution at mammalian level is still unclear. The last hypothesis is based on the fact that the dream of mammals comes from the vigil of reptiles, and to conduct these investigations electrophysiological criteria are used. This methodology includes registering the electroencephalogram (EEG), which indicates the brain's electrical activity and which is the main indicator of sleep.

To deepen the principles of sleep, this study is presented with reptils *Gallotia galloti*. Considering that tricyclic antidepressants (ADT) produce a total reduction of REM sleep in mammals, it ADT would eliminate some phase of reptiles vigil, this state could be understood as the phylogenetic predecessor of REM sleep. This work has shown that imipramine (ADT) produced on the EEG of *Gallotia galloti* the suppressing of the startle response after an acoustic stimulus, a fact that brings further evidence of the homology between reptiles waking and mammals sleep.

INTRODUCCIÓN

El sueño como comportamiento

Todos los organismos llevan a cabo su actividad biológica según unos determinados ritmos internos establecidos a lo largo de la historia evolutiva, en relación a patrones de periodicidad concretos, como son los ciclos de luz y oscuridad diarios o la rotación y la translación de la Tierra alrededor del Sol.

Estos ciclos temporales están descritos en todos los seres vivos, hecho que apunta a un valor adaptativo y de supervivencia a lo largo del tiempo. Así, se habla del reloj biológico, que se entiende como la estructura interna de un organismo que genera determinados ciclos biológicos, permitiéndoles anticiparse a los acontecimientos externos. Tanto en invertebrados como en vertebrados, algunos de los relojes biológicos más importantes se localizan en el Sistema Nervioso Central (SNC).

El ciclo sueño-vigilia es el más estudiado de los ciclos circadianos, haciendo hincapié en el punto de vista comportamental. Se entiende que la etapa de vigilia corresponde a un período de actividad y, por el contrario, la etapa del sueño equivale a la inactividad o baja actividad.

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:

1. Reposo motor (Pieron, 1913);
2. Umbrales sensoriales elevados (Pieron, 1913);
3. Fácil reversibilidad (Pieron, 1913);
4. Adopción de una postura estereotipada (Flanigan, 1973);
5. Uso de lugares específicos donde dormir (Bruce Durie, 1981);
6. Organización cíclica circadiana (Bruce Durie, 1981);
- y 7. Estado regulado, porque presenta efectos de privación y de saciedad (Tobler, 1985).

Todo ello permite suponer que lo que determina que un organismo presente este sueño es el elevado nivel de complejidad en su comportamiento, es decir, en su Sistema Nervioso.

El sueño electrofisiológico

El sueño de mamíferos y aves no es un estado homogéneo. Los criterios electrofisiológicos han permitido establecer las etapas que conforman el sueño, cada una de ellas con unos patrones bioeléctricos propios, y relacionadas con la profundidad del sueño y otros parámetros fisiológicos. Las diferentes características de las fases del sueño permiten determinar la calidad de este o su dependencia de factores exógenos, como los fármacos o el ruido.

Los registros poligráficos son imprescindibles para el estudio del sueño, ya que registran simultáneamente determinadas variables indicadoras del sueño, de manera que es posible cuantificar y caracterizar el sueño y sus etapas. El electroencefalograma (EEG), que indica la actividad eléctrica cerebral, es el principal indicador del sueño, pero el electrooculograma (EOG), el electromiograma (EMG) y el electrocardiograma (ECG) también son informativos.

El tejido nervioso posee la capacidad de generar potenciales eléctricos que son la base de la excitabilidad. Se denomina EEG al registro de las diferencias de potencial que se establecen entre dos electrodos y la representación de sus variaciones en el tiempo.

Las características del EEG y su correspondencia con los niveles de conciencia en mamíferos fueron un campo que empezó a estudiarse en el siglo XX con los trabajos de Berger, quien observó que en vigilia activa el EEG mostraba unas ondas rápidas de pequeño voltaje (actividad β) y a medida que el sueño se hacía profundo las ondas del EEG se ralentizaban. En los posteriores estudios sobre el sueño humano se descubrió que este era un estado no homogéneo (Aserinsky & Kleitman, 1953) con dos etapas principales y hasta 1968 no fueron definidas cada una de sus fases (Rechtschaffen & Kales, 1968):

1. Vigilia: EEG de ondas rápidas de bajo voltaje, superior a los 13 Hz (actividad β) cuando el individuo está activo o tiene los ojos abiertos; con los ojos cerrados o en reposo sensorial aparece el ritmo α (8-12 Hz). Ausencia de movimientos oculares en reposo y tono muscular apreciable en la musculatura antigravitatoria.
2. Fase 1 o de adormecimiento: patrón de EEG de ritmo mixto, ya que consta de ondas rápidas de bajo voltaje y algunas ondas más lentas (actividad θ) de 4 a 8 Hz. Movimientos oculares de rotación lenta y tono muscular presente pero reducido respecto a la vigilia.
3. Fase 2 o de sueño ligero: aparición de los husos de sueño y los complejos K. Los primeros son brotes de ondas con una frecuencia de 14 Hz que duran aproximadamente un segundo y que tienen menor voltaje en su inicio y su final; los segundos son ondas bifásicas de gran voltaje que suelen aparecer al principio o al final de un huso, pero también de forma aislada. Ausencia de movimientos oculares rápidos y tono muscular disminuido.
4. Fase 3-4 o de sueño profundo: EEG con ondas lentas de alto voltaje (ondas delta) de 0,3-4 Hz que ocupan más del 20% del patrón. Ausencia de movimientos oculares rápidos y tono muscular muy disminuido, a veces ausente.
5. Fase REM o sueño paradójico: EEG casi indistinguible al de la fase 1 y con presencia de ondas de 4-6 Hz con morfología en diente de sierra. Aparición de Movimientos Oculares Rápidos (sueño MOR o sueño REM, por “Rapid Eye Movements”) aislados o agrupados. Tono muscular nulo, atonía total.

Los cambios en el EEG, EOG y EMG indican que el sueño comporta que el funcionamiento de un organismo tenga unas características concretas y distintas a las que se muestran durante la vigilia.

En los humanos, estas fases se organizan de una forma cíclica característica a lo largo de la noche y la representación gráfica de ello se denomina hipnograma (Figura 1).

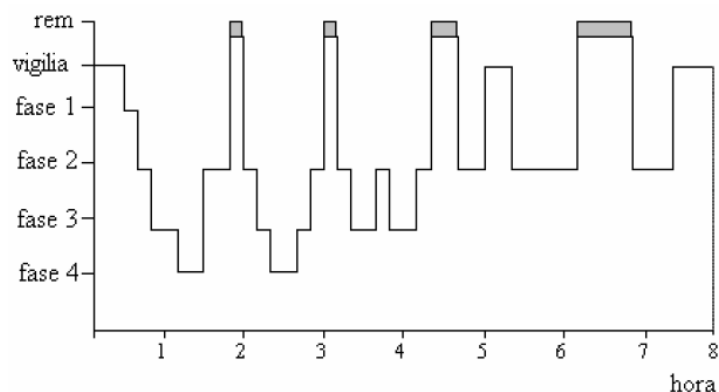


Figura 1. Ejemplo de un hipnograma de un adulto joven y sano.

Potenciales evocados

Un potencial evocado es el conjunto de las modificaciones de la actividad eléctrica del sistema nervioso, producidas por un suceso psicológico o un estímulo físico. Para que se produzca un potencial activado son necesarios tres hechos: la activación de un receptor sensorial periférico, el transporte del mensaje codificado por las vías específicas y la integración del mensaje al nivel de las proyecciones encefálicas (Akaârir, 2007).

Estas diferencias de potenciales pueden ser amplificadas y visualizadas. El registro de los potenciales se ha diseñado para comprobar la función de los sentidos que suministran al cerebro la mayor parte de toda la información que entra al organismo: la sensibilidad somestésica, la vista y la audición. DuBois-Raymond demostró que la estimulación de un nervio induce una modificación del potencial y años después Richard Caton describió la actividad eléctrica del cerebro y los cambios potenciales evocados en la estimulación sensorial (Phurailatpam, 2014).

Se pueden registrar potenciales evocados en el hombre y otros animales durante la vigilia, pero son de pequeña amplitud y suelen quedar enmascarados en el EEG, por lo que sólo se pueden estudiar con otras técnicas concretas. En cambio, en los reptiles despiertos los potenciales evocados se observan claramente en el EEG sin necesidad de esas técnicas. Es fácil observar potenciales evocados a la estimulación sensorial en la corteza de los reptiles en vigilia (González *et al.*, 1978), que consisten en oscilaciones positivo-negativo-positivo de gran amplitud que normalmente van seguidas de un huso de menor amplitud.

Neuroanatomía del sueño

La vigilia y los dos tipos de sueño en los mamíferos están controlados por diversos centros y núcleos cerebrales que actúan de manera coordinada en un circuito neuronal con trayectos de inhibición recíproca, de manera que se mantiene un estado u otro. Así mismo, existen numerosas sustancias endógenas y neurotransmisores que participan en la producción y la regulación de la vigilia y el sueño.

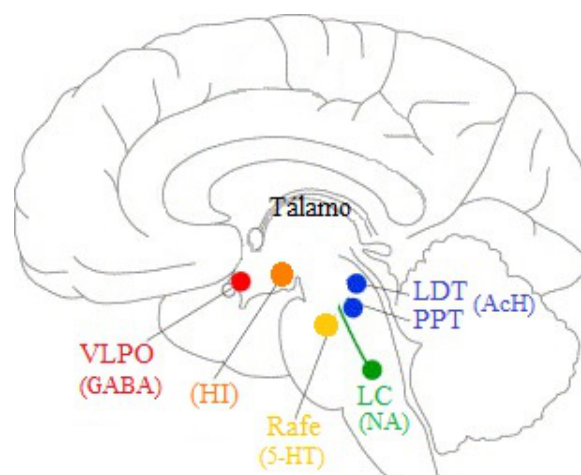


Figura 2. Representación gráfica del sustrato neuroanatómico controlador de la vigilia y del sueño. Núcleos pedúnculo-pontino y latero-dorsal del tegmento (LDT-PPT), locus coeruleus (LC), núcleo ventro-lateral preóptico (VLPO).

Durante la vigilia se produce una alta actividad neuronal de los núcleos colinérgicos latero-dorsal tegmental y pedúnculo-pontino (LDT-PPT) (Figura 2). Esta actividad desaparece durante el NREM y vuelve a aumentar en la fase REM. Estos núcleos conectan en el hipotálamo con otras fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas, procedentes del locus coeruleus (LC) y del rafe dorsal (RD), respectivamente, las cuales también permanecen activas en la vigilia, pero no en el sueño NREM ni en el REM (Rial *et al.* 2006).

En el sueño NREM y REM, permanece activo el núcleo ventrolateral-preóptico (VLPO) del hipotálamo y se liberan los GABA, neurotransmisores que inhiben las regiones activadoras de la vigilia. Por su parte, la vigilia está asociada a la elevada liberación de noradrenalina (NA), histamina (HI) y serotonina (5-HT) en todas las áreas de la corteza cerebral, sustancias que producen la inhibición del VLPO (Rial *et al.* 2006). Así, se crea una especie de mecanismo regulador que determina la alternancia de vigilia o sueño (Saper *et al.*, 2005).

Terapia antidepresiva y el sueño

Los EEG de la vigilia y el sueño proporcionan marcadores biológicos de la depresión y de la terapia antidepresiva, respectivamente. Ya el inventor del EEG, Hans Berger (1938), observó que su actividad se ve alterada por las drogas, por tanto el análisis cuantitativo del EEG ayuda a delinear los efectos de los antidepresivos en la actividad cerebral (Steiger & Kimura, 2010).

La depresión es un estado patológico que produce pensamientos negativos, disminuciones en la actividad, apatía y anhedonia. Puede dividirse en tres tipos principales: la depresión reactiva, la distimia y la depresión mayor.

En todos los estados depresivos aparecen los trastornos del sueño, como son la dificultad para conciliarlo y los despertares frecuentes (Mouchet-Mages & Olié, 2007). Por ello, se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de caracterizar el sueño de las personas con esta patología y el efecto de los tratamientos antidepresivos. Un sueño indicativo de la depresión es aquel que muestra un insomnio en el inicio, un número elevado de microdespertares nocturnos, un acortamiento en las latencias del sueño REM y un aumento de su duración, y una fase 2 reducida (Steiger & Kimura, 2010).

Los fármacos antidepresivos, paralelamente a una mejoría en la sintomatología depresiva, generalmente provocan cambios en las características del sueño, hecho que se asocia a la acción que ejercen sobre los sistemas de neurotransmisión centrales, concretamente incrementando las monoaminas en el espacio sináptico. Unos de los primeros fármacos que se utilizaron para tratar la depresión fueron los antidepresivos tricíclicos (ADT) y un efecto común de la mayoría de estos, tanto en sujetos con depresión o sin ella, es la supresión del sueño REM (Steiger & Kimura, 2010). La imipramina es un ADT ampliamente utilizado clínicamente que actúa inhibiendo la recaptación de 5-HT y NA, que son las rutas principalmente afectadas en la depresión. Por tanto, su acción farmacológica produce un aumento en la concentración de monoaminas a través de la inhibición de la recaptación de éstas (Yasuda *et al.*, 2014). Aunque los ADT provocan generalmente un aumento de las ondas lentas del EEG (banda δ), la imipramina es una de las excepciones, ya que las disminuye, pero el efecto que produce que es de interés para este trabajo, es que bloquea la producción de REM.

Actualmente, son conocidos los efectos moduladores de los antidepresivos en el sueño REM, pero el origen de estos cambios y su significado aún deben de ser explicados.

El sistema nervioso de los reptiles

El telencéfalo de los reptiles presenta una organización anatómica única. La parte dorsal del telencéfalo, el palio, comprende dos componentes: la corteza y la cresta dorsal ventricular. El primero se subdivide en corteza medial, corteza dorsal y corteza lateral, mientras que la cresta dorsal ventricular se divide en las partes anterior y posterior. La organización celular cortical observada en todas las especies de reptiles es de tres estructuras laminares en capas: una capa celular densa y dos capas de escasas células, externa e interna. Esto está en contraste con la neocorteza de los mamíferos, que presenta una estructura laminar de seis capas con subtipos neuronales (Nomura *et al.* 2013). Se cree que la corteza medial y la lateral equivalen al hipocampo y a la corteza periforme de los mamíferos, respectivamente, pero en cuanto a la corteza dorsal existe controversia.

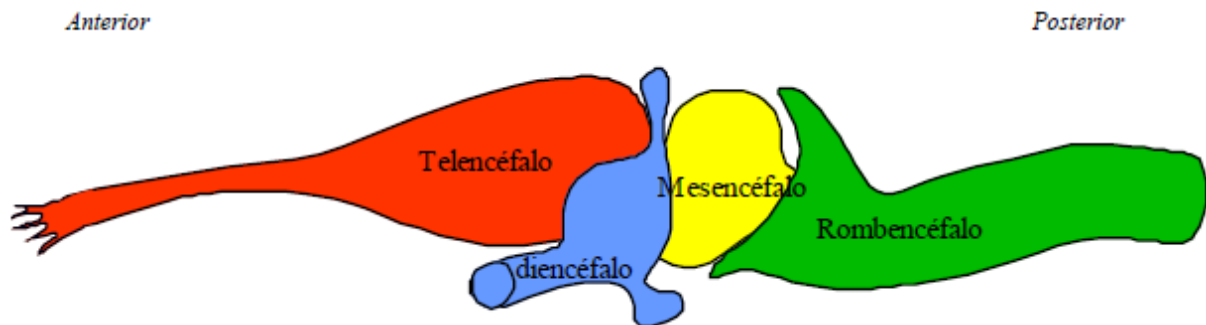


Figura 3. Representación del SNC de los reptiles, en vista lateral.

La evolución del sueño. Mamíferos y reptiles

Uno de los retos de la neurociencia es reconocer las razones por las que el ritmo sueño-vigilia presente en los organismos más simples se convirtió al más complejo sueño-vigilia de los mamíferos.

Los estudios sobre la evolución del sueño atendiendo al escalón filogenético de reptiles a mamíferos se iniciaron hacia la mitad del siglo XX.

Se contemplaba que el REM era el sueño primitivo, dadas sus características “primitivas”, el control rombencefálico, la poiquilothermia y su preponderancia en animales inmaduros, por lo que se esperaba encontrarlo en el sueño de los reptiles.

Los monotremas, un grupo que incluye a los equidnas y los ornitorrincos, son animales de características muy primitivas, próximas a la de los reptiles, y por eso sería importante saber cómo es su sueño. Al estudiar el sueño del equidna, se observó que este solamente presentaba NREM y, por tanto, se creyó que esa era la forma más antigua del sueño. Pero tras el análisis del sueño del ornitorrinco, en el cual se observó una enorme proporción de REM, de hasta un 60% del sueño total (Siegel *et al.*, 1999), se supuso que el REM debía existir en los reptiles. Aún así, las características de este REM no aportan

una evidencia clara para apoyar que el sueño primitivo sea el REM y NREM el moderno. Una posibilidad es suponer que en los vertebrados existen dos tipos de vigilia; en los reptiles una paleovigilia que depende de estructuras subcorticales, las cuales fueron reorganizadas con la aparición de la neocorteza en los mamíferos y se desarrolló una neovigilia cortical.

De esta manera, se apoyó otra hipótesis ya descrita, según la que el sueño de los mamíferos es un residuo de la primitiva vigilia de los reptiles. Como afirmó Rial *et al.* (2007a) el sueño y la vigilia son dos caras de la misma moneda y dejar de lado los cambios que ha experimentado la vigilia durante la evolución de amniotas es injustificado. La hipótesis se extendió y en la actualidad ofrece un panorama completo de la evolución del sueño, la vigilia y la hibernación.

Se ha afirmado que el EEG tiene un valor limitado para discernir la evolución de sueño, pero aunque el sueño comportamental puede parecer similar, la comprensión de la causa de las diferencias entre el EEG de mamíferos y reptiles adultos es una herramienta esencial para reconocer la trayectoria evolutiva en el desarrollo de sueño (Rial *et al.* 2010).

Los primeros estudios del EEG en reptiles ignoraron la importancia de la temperatura corporal, la cual sufre importantes variaciones entre el día y la noche, es decir, entre su vigilia y su reposo. Con los estudios de Rial *et al.* (1993) se conoció que la amplitud del EEG y la frecuencia de los husos eran dependientes de la temperatura corporal. Aunque los reptiles carecen de mecanismos fisiológicos para mantener su temperatura corporal constante, poseen adaptaciones de su comportamiento para ello. Durante su fase de reposo mantienen una temperatura próxima a la del medio ambiente, hecho que explica que durante la noche, cuando se suponía que dormían, su EEG no alcanzaba una amplitud similar a la registrada en el NREM de mamíferos. Por otra parte, un reptil activo con una temperatura corporal elevada muestra un EEG polimorfo con la predominancia de ondas lentas de alto voltaje, similares a las del NREM de los mamíferos, y además se observan potenciales evocados de gran amplitud parecidos a los complejos K del NREM en mamíferos.

Todo indica la existencia de una homología filogenética entre la vigilia de los reptiles y el sueño de ondas lentas de los mamíferos, y que la verdadera adquisición evolutiva de los mamíferos no es el sueño sino una vigilia avanzada (Rial *et al.*, 1993), a pesar de que las funciones en ambos casos sean completamente distintas. Concretamente, el estado activo de reptil se transformó en el sueño de los mamíferos, dentro del cual el comportamiento peregrino de los reptiles se convirtió en la fase NREM y el comportamiento general activo en REM (Rial *et al.* 2010). Los reptiles, durante una parte del tiempo, ajustan su temperatura corporal y mantienen un control sobre las constantes fisiológicas y cuando asumen la temperatura deseada entran en la fase de búsqueda de alimentos, encuentros sexuales, etc., la cual en muchas ocasiones es menos compatible con la homeostasis. Por ello, se supone que la fase en la que domina la homeostasis de un reptil se convirtió en el sueño NREM y la fase en la cual los reptiles buscan alimento, contactos sociales y evitan la depredación, se convirtió en sueño REM, para lo cual sólo fue necesario la inhibición de todas las salidas motoras (Rial *et al.*, 2007, 2010).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, cabe suponer que si los ADT producen una reducción casi total del sueño REM en mamíferos, y en reptiles suprimen alguna de las fases de su sueño-vigilia, este estado podría entenderse como el antecesor filogenético del sueño REM.

Para llevar a cabo este proyecto de investigación, se propone estudiar los efectos de la imipramina sobre el EEG de la especie *Gallotia galloti*, además de los cambios producidos en éste después de la reacción a un sobresalto.

Se supone que un reptil activo en reposo después de un sobresalto abandonará la homeostasis y entrará en situación de alarma, hechos que equivaldrían a permanecer en la fase NREM antes del estímulo y en la fase REM después de él. Si así fuera esta equivalencia, la respuesta al sobresalto se debería ver suprimida o atenuada a causa de la imipramina, ya que es un ADT que impide la aparición del REM.

Objetivos

Analizar el efecto que provoca un ADT, la imipramina, en el EEG de seis ejemplares activos de la especie *Gallotia galloti*.

Registrar el EEG de seis ejemplares activos de la especie *Gallotia galloti* y los cambios producidos debidos a una estimulación de sobresalto. Las respuestas registradas en este grupo de animales se compararán con las registradas en los mismos animales tras recibir una dosis de imipramina. Si el ADT suprime o reduce la reacción de sobresalto, se dará soporte a la hipótesis de la equivalencia entre la fase REM y la fase activa.

Aportar evidencias a favor o en contra de la existencia de homología filogenética entre la fase activa de los reptiles y el REM de los mamíferos.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron seis lagartijas de la especie *Gallotia galloti* (Familia Lacertidae, Orden Squamata) de ambos sexos, con un peso medio de 50 gramos y de edad indeterminada. Son endémicas de la isla de Tenerife y se trajeron bajo la autorización pertinente del Gobierno Autónomo Canario. Para su captura se utilizaron recipientes de hojalata a modo de trampas con trozos de tomate como cebo.

En el laboratorio, se simularon las condiciones de su hábitat natural en terrarios con iluminación artificial aportando 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, situados en una habitación a temperatura ambiente. Se les proporcionó una dieta de agua y papillas infantiles de fruta, verdura y carne.

Técnica operatoria

A partir de los estudios de Rial y González en los años 70 (González *et al.*, 1978; Rial *et al.*, 1978) se desarrolló la tecnología de registro electrofisiológico para la especie *Gallotia galloti*.

Primeramente se anestesiaron los animales con Isoflurano por vía inhalatoria durante unos diez minutos en la caja de anestesia y de manera continuada, a menor presión, durante la operación.

Para el implante de los electrodos se siguieron los pasos detallados a continuación:

1. Se eliminaron las placas dérmicas parietales, frontoparietales e interfrontoparietales con la ayuda de un bisturí, para dejar el hueso craneal expuesto. Seguidamente se cauterizó la zona.
2. Utilizando una fresa dental, se practicó un pequeño surco en el hueso frontoparietal, pasando por la línea media, y dos orificios muy poco profundos en el hueso parietal, todo de unos 2mm de diámetro.
3. Se implantaron dos electrodos activos en los orificios del hueso frontoparietal, colocados simétricamente en la corteza de ambos hemisferios, y dos electrodos referenciales en el hueso parietal, éstos junto con un tornillo para fijar el conjunto al cráneo (Figura 4). Se utilizaron electrodos de plata de 150 μ m de diámetro, aislados exteriormente, excepto en el extremo, y soldados a un microconector, para conectar el animal con el equipo de registro.
4. Para sujetar los electrodos se utilizó cemento acrílico *DuraLay*®.

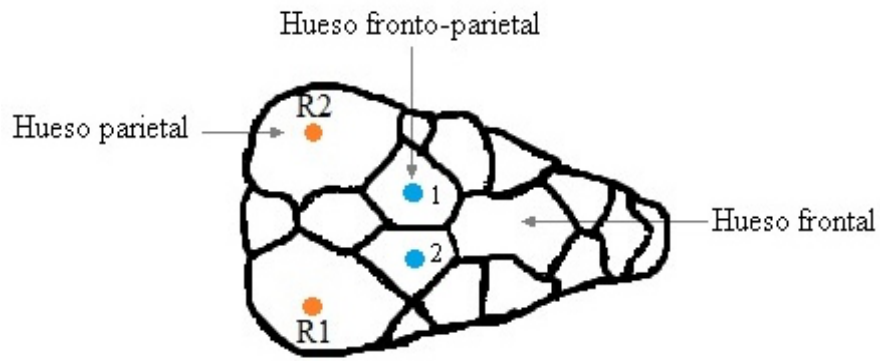


Figura 4. Localización de los electrodos en ejemplares de *Gallotia galloti*. 1 y 2: electrodos activos, R1 y R2: electrodos referenciales. (Akaâr, 2007)

5. Antes de iniciar el registro se emplazaron electrodos subcutáneos para medir el electrocardiograma y la respiración del animal (Figura 5).

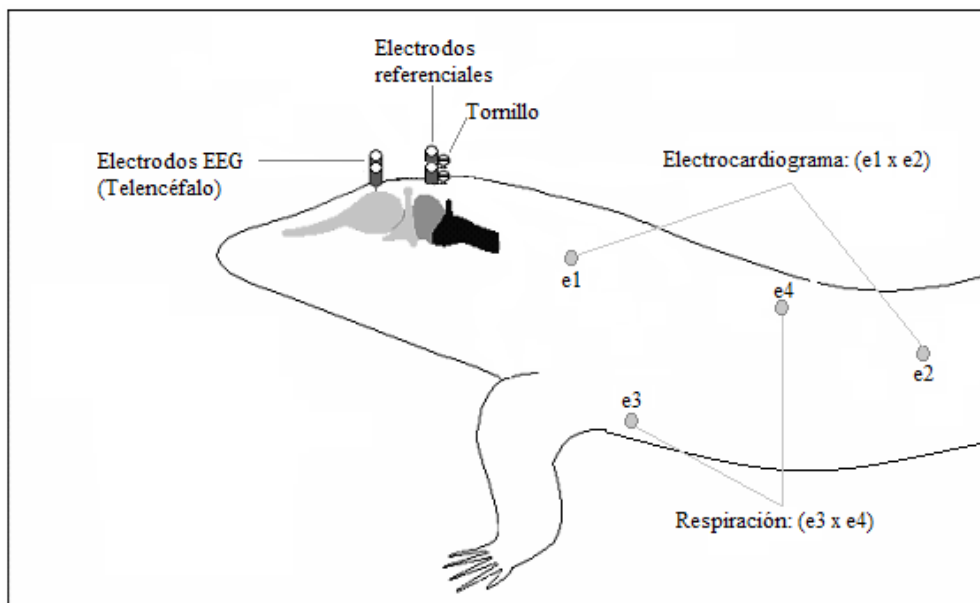


Figura5. Situación de los electrodos para el registro de EEG, ECG y la respiración en un ejemplar de *Gallotia galloti* (Akaâr, 2007).

Tratamiento y técnica de registro

Pasados tres días de recuperación para cada animal, se llevó a cabo su inmovilización en una plataforma con regulador de temperatura dispuesto a 30°C durante todo el registro, situada en una pequeña habitación aislada. Se estableció la conexión de los electrodos al sistema de registro, formado por un amplificador y un convertidor analógico-digital Digidata 1322 (AxoScope).

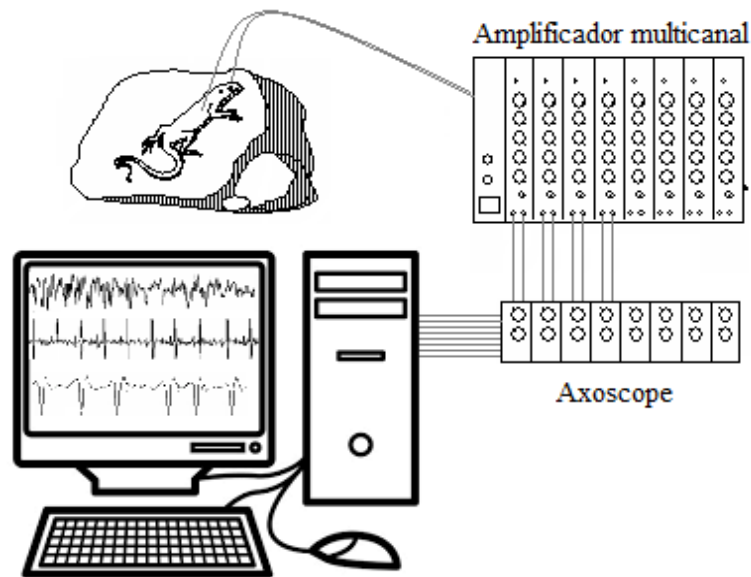


Figura 6. Representación del sistema de registro de las variables EEG, ECG y respiración en un sujeto de *Gallotia galloti*. (Akaârîr, 2007)

El registro se inició después de 30 minutos de adaptación del animal. Se realizaron tres registros seguidos, con tres condiciones diferentes, para cada animal:

1. Control. El animal se situó en el sistema de registro sin ningún tratamiento durante 20 minutos.
2. Suero. Se trató al ejemplar de *Gallotia galloti* con 0,15ml de suero salino vía intraperitoneal, para observar los posibles efectos de la inyección, y se registraron las señales de interés durante 30 minutos. Se realizó una estimulación acústica cada 10 minutos, consistida en un golpe seco en la pared de la habitación aislada.
3. Imipramina. Se trató al ejemplar del lacértido con una disolución de imipramina (*Tofranil*), a concentración 25mg/ml, vía intraperitoneal (0,25ml/50g de peso) y se registró durante 70 minutos, realizando una estimulación acústica igual a las anteriores, pero cada 20 minutos.

Análisis de las señales bioeléctricas

Para determinar la reacción de los animales a la estimulación acústica aplicada, así como las señales bioeléctricas características en cada tratamiento, se analizó visualmente el EEG junto con la frecuencia del ECG y la respiración. Las señales se proporcionaron a una hoja de cálculo del programa Origin5.0.

Para el muestreo del EEG en cada tratamiento, se elaboraron cortes de la señal cada cinco minutos para obtener tramos seguidos de dos minutos y realizar la raíz cuadrada media (RMS: root mean squar) de los valores obtenidos, para poder comparar la amplitud de las ondas.

El muestreo para observar la reacción al estímulo se realizó seleccionando los segmentos correspondientes a 30 segundos anteriores y posteriores a la estimulación acústica, rechazando los fragmentos en los que se detectaron movimientos motores que condicionasen el EEG, dado que en estos casos el animal no estaba en reposo.

En el análisis de los fragmentos representativos del EEG, se aplicó la transformada rápida de Fourier (FFT: Fast Fourier Transform). La transformada rápida de Fourier FFT es un algoritmo que reduce el tiempo de cálculo de n^2 pasos a $n \cdot \log_2(n)$. Se considera idónea para el análisis del EEG porque busca la función senoidal que mejor lo describe, y obtiene un valor de potencia para cada intervalo de frecuencia.

Análisis estadístico

A partir de la señal original, previamente traducida a formato numérico, se seleccionaron los fragmentos de EEG para analizar. Se empleó la prueba T-student de las muestras relacionadas del programa OriginPro8 para analizar las diferencias en las potencias de EEG antes y después de la estimulación auditiva. Se utilizó también Anova de un factor para comparar las potencias EEG correspondiente a los diferentes estados (control, tras la inyección de suero salino y tras la inyección de imipramina).

RESULTADOS

En este apartado se exponen los resultados obtenidos al analizar el EEG. Los registros del ECG y la respiración han sido almacenados para su análisis en posibles estudios posteriores.

Potencia del EEG

La figura 7 muestra el RMS de todo el EEG registrado en las diferentes condiciones estudiadas. En el tratamiento con imipramina se intuye una leve disminución de la amplitud en las ondas del EEG respecto al control y al tratamiento con suero salino, aunque las diferencias entre las tres condiciones no son significativas (control x suero salino, $p = 0,652$; control x imipramina, $p = 0,495$; imipramina x control, $0,229$).

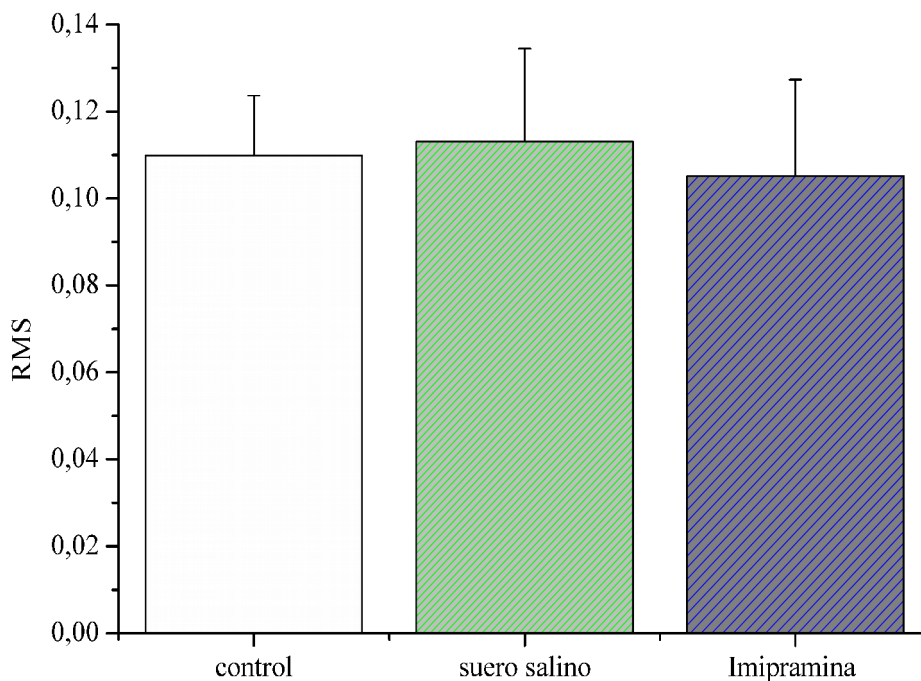


Figura 7. RMS de EEG de *Gallotia galloti* en condiciones de control, después de inyección de suero salino y después de inyección de imipramina.

Potencia EEG antes y después de estimulación auditiva.

La estimulación acústica causa siempre un incremento en la potencia general y la sincronía del EEG en el lacértido tratado con suero salino, pero no tiene efecto después de tratar el animal con imipramina

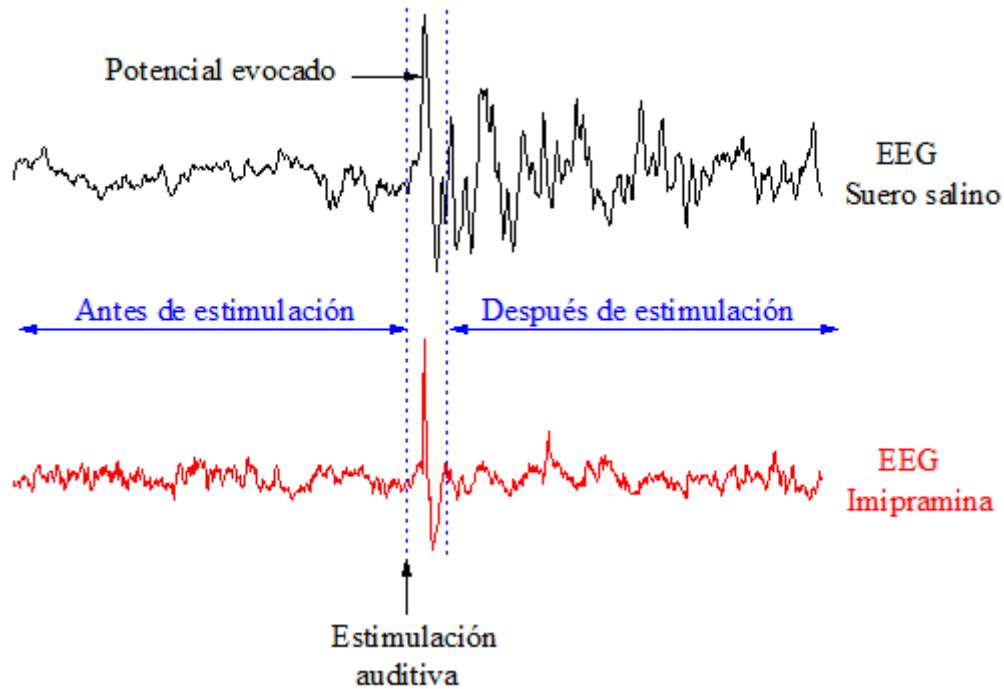


Figura 8. Reacción de activación del EEG en *Gallotia galloti* en respuesta a la estimulación acústica.

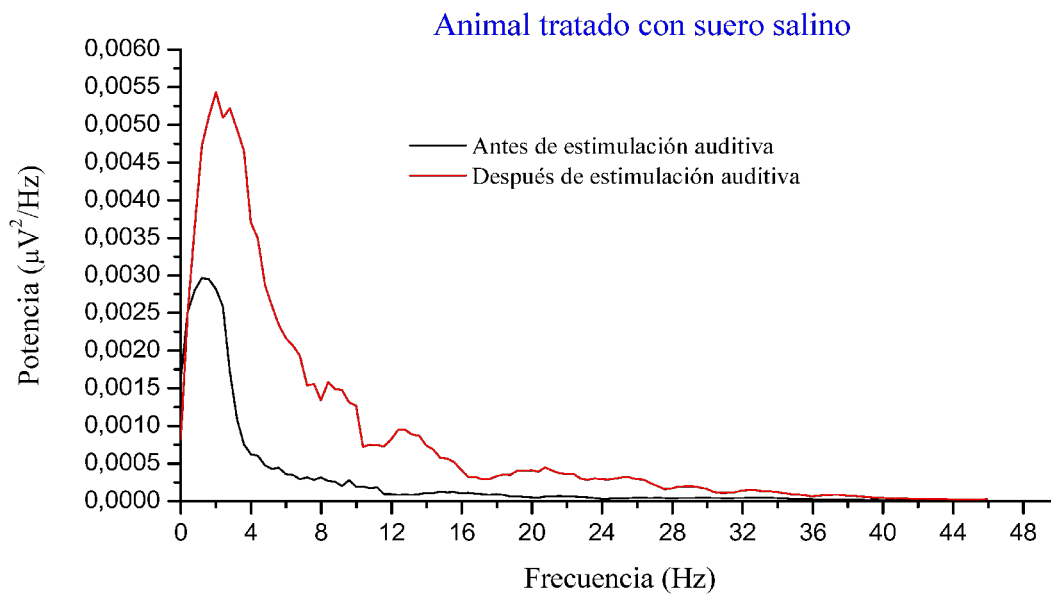


Figura 9. Potencia del EEG de *Gallotia galloti* antes y después de estimulación auditiva. (Animal tratado con suero salino)

La figura 9 representa los espectros de potencia del EEG del reptil *Gallotia galloti* tratado con suero salino obtenidos antes de la estimulación acústica frente a después de dicha estimulación, con diferencias significativas ($p = 7,268E-11$).

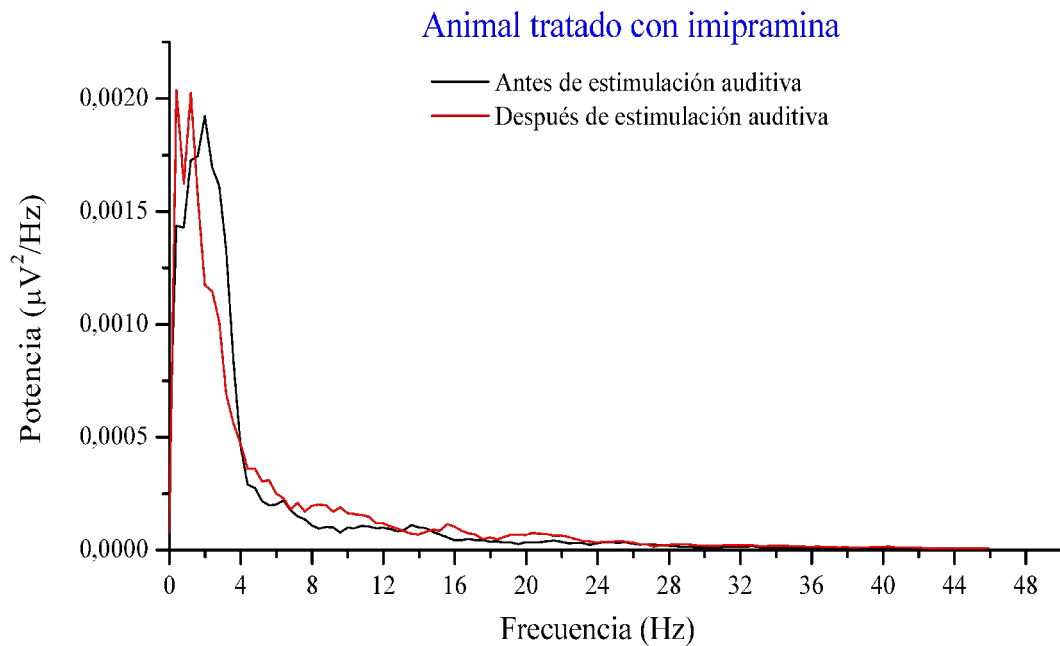


Figura 10. Potencia del EEG de *Gallotia galloti* antes y después de estimulación acústica.
(Animal tratado con imipramina)

La figura 10 representa los espectros de potencia del EEG del reptil *Gallotia galloti* tratado con imipramina. Las diferencias antes y después del estímulo NO resultaron significativas ($p = 0.882$).

De otra parte se compararon las potencias del EEG:

- Antes del estímulo auditivo en animales tratados con suero salino frente a animales tratados con imipramina (Figura 11). La diferencia resultó significativa ($p = 4,469E-5$).
- Después del estímulo auditivo en animales tratados con suero salino frente a animales tratados con imipramina (Figura 12). En este caso la diferencia también fue significativa ($p = 1,039E-10$).

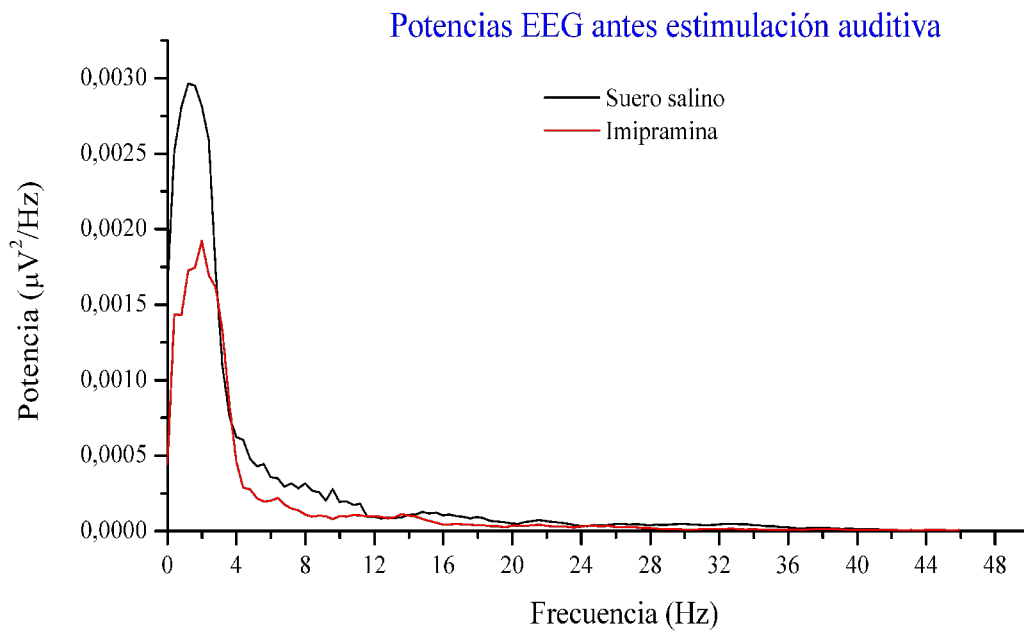


Figura 11. Potencia del EEG de *Gallotia galloti* antes de estimulación acústica.
 (Animal tratado con suero salino frente a animal tratado con imipramina)

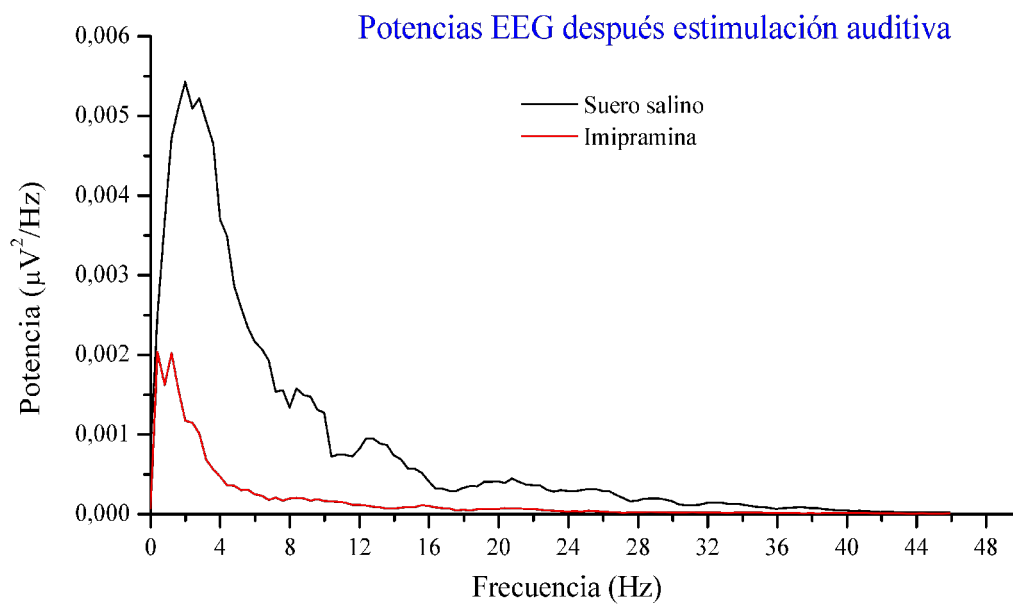


Figura 12. Potencia del EEG de *Gallotia galloti* después de estimulación acústica.
 (Animal tratado con suero salino frente a animal tratado con imipramina)

DISCUSIÓN

De una forma general, el presente trabajo ha intentado aportar pruebas de la homología entre los estados del sueño de los mamíferos (REM - NREM) y los estados de vigilia de los reptiles (activa - inactiva), escogiendo como sujeto experimental al lacértido *Gallotia galloti*.

Se ha estudiado el trazado del electroencefalograma de los sujetos previa y posteriormente a una estimulación acústica. La efectividad del estímulo ha sido demostrada ya que se ha expuesto su capacidad para provocar una respuesta de sobresalto en los sujetos, y posteriormente se han examinado los efectos producidos por la imipramina (ADT) en el EEG. Se ha escogido la imipramina para llevar a cabo el experimento debido a que sus resultados son conocidos y estudiados en mamíferos, concretamente en humanos y roedores. Como se ha descrito en la introducción, es un fármaco que bloquea la producción del sueño REM, una característica interesante que permitiría establecer una conexión entre el sueño de los mamíferos y la vigilia de los reptiles, si causara el mismo efecto en estos últimos.

Las variaciones en la amplitud del EEG de los animales poiquilotermos obedecen a varios factores, entre los que destaca la temperatura corporal. En cambio, las variaciones que pueda determinar la temperatura corporal en mamíferos no pueden ser muy importantes, ya que esta temperatura se mantiene dentro de un pequeño rango. Por este motivo, los lacértidos de este estudio se han mantenido a una temperatura constante de 30°C en todos los registros realizados.

En cuanto a la reacción de alerta, la respuesta del EEG ante un estímulo inesperado en reptiles y mamíferos es muy diferente. Muchos estudios han demostrado que la reacción de alerta en los mamíferos posterior a la estimulación sensorial resulta en una disminución de la amplitud del EEG y un aumento de las frecuencias, hecho que manifiesta el paso de una fase a otra. Por ejemplo, al realizar un estímulo en los humanos cuando permanecen en vigilia con ojos cerrados (Figura 13), se da lugar a la transición de actividad α (8-12Hz) a actividad β (13-23Hz). Por el contrario, en los reptiles la estimulación sensorial ocasiona un aumento en amplitud y sincronización. Conocidos los antecedentes, se han podido comprobar estas diferencias en el presente trabajo.

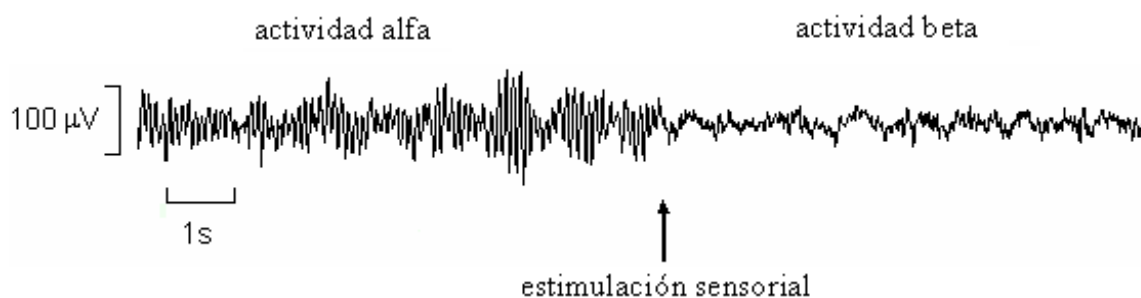


Figura 13. Reacción de activación del EEG humano con ojos cerrados. Se comprueba que el ritmo α desaparece tras la estimulación sensorial y a la vez aparece un EEG con frecuencias altas y de baja amplitud (β). (Akaâr, 2007).

En los registros de todos los ejemplares de *Gallotia galloti* se ha podido comprobar visualmente que, con un tratamiento de suero salino usado como control, después de un estímulo auditivo se produce un potencial evocado y se desencadena una reacción de activación del EEG reflejada en un incremento en la potencia del EEG (Figura 14). Y sin embargo, con el tratamiento de imipramina, no se produce ninguna reacción de activación (Figura 8).

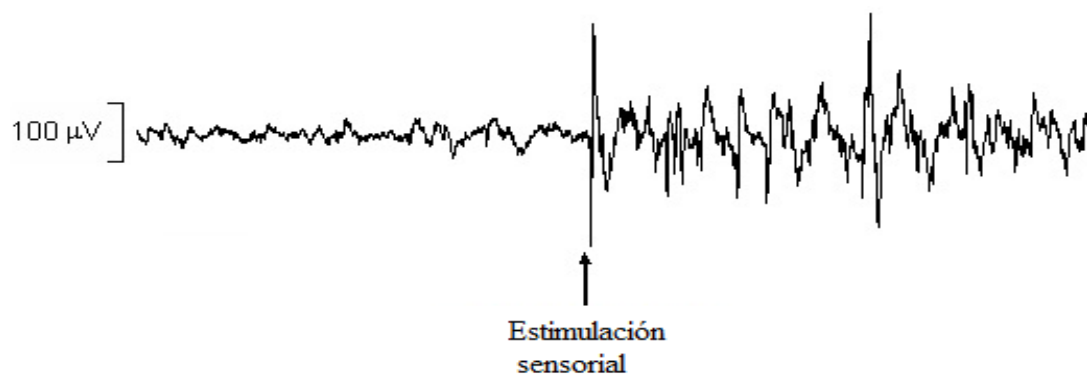


Figura 14. Reacción de activación del EEG en *Gallotia galloti* en respuesta a la estimulación acústica. (Akaârir, 2007)

En las potencias absolutas del EEG de las tres condiciones experimentales (control, suero salino e imipramina) no se han encontrado diferencias significativas (Figura 7), resultado que no se esperaba, ya que contrasta con estudios anteriores llevados a cabo por el grupo investigador de la UIB (Gamundí *et al*, 1990; Akaârir *et al*, 2007). Por tanto, cabe dudar si esta falta de significación deba tenerse en cuenta, ya que podría ser consecuencia de algunas perturbaciones registradas, como la contaminación por ruido o los movimientos mismos del animal.

Con las potencias relativas se ha comprobado que en condiciones normales (suero salino), el animal en vigilia y reposo responde al estímulo sensorial produciéndose un EEG de mayor amplitud (Figura 8 y 9). El uso de imipramina ha supuesto que este efecto se vea suprimido, ya que las diferencias en la potencia del EEG anterior y posterior al estímulo no son significativas (Figura 10 y 12). Cabe decir que las condiciones de partida de ambos tratamientos fueron similares (Figura 11), por lo que las diferencias registradas se corresponden con verdaderos cambios en la función cerebral como consecuencia de los estímulos aplicados.

En referencia al espectro de frecuencias del EEG de los reptiles y a sus relaciones con el sueño de los mamíferos, es preciso mencionar los signos fásicos del REM son reflejos de sobresalto así como respuestas de alerta o miedo probablemente originadas en la amígdala (Jha *et al.*, 2005) y que en los trabajos de Siegel *et al.* se concluyó que el REM debería existir en los reptiles. Además, sabiendo que los ADT suprimen el REM en los mamíferos, se puede esperar que también supriman las respuestas a los estímulos causantes de sobresalto. Así se ha podido comprobar en el presente estudio, ya que la administración de imipramina ha anulado efectivamente todas las consecuencias en el EEG del sobresalto después de un estímulo acústico en los ejemplares de *Gallotia galloti*.

Se puede suponer que el REM de los mamíferos es el resultado de la inhibición motora de los reflejos de sobresalto de los reptiles, por lo que se apoya la hipótesis de partida, descrita por el grupo investigador de la UIB, en la que se describe que este estado de vigilia en los reptiles se puede entender como el antecesor filogenético del sueño REM.

CONCLUSIONES

1. La aplicación de un estímulo acústico ha demostrado ser eficaz para producir una reacción de sobresalto en el EEG de *Gallotia galloti*.
2. Los estímulos sensoriales aplicados a los animales en vigilia y reposo han provocado un aumento en la amplitud del EEG.
3. La administración de suero salino no modificó el EEG en ausencia de estimulación, por lo tanto los efectos producidos en los registros con imipramina son debidos exclusivamente a este ADT.
4. El tratamiento con el ADT imipramina ha anulado la respuesta al estímulo de sobresalto, produciendo un EEG idéntico al registrado previamente a la aplicación del estímulo.
5. Dado que la imipramina suprime el REM en mamíferos y también ha suprimido la respuesta al sobresalto en los reptiles estudiados de la especie *Gallotia galloti*, el trabajo realizado da soporte a la hipótesis de homología entre la vigilia activa de los reptiles y el sueño REM de los mamíferos.

REFERENCIAS

- Akaârir, M. (2007). *Signos Electrofisiológicos de los estados de reposo, sueño y vigilia. Estudio comparativo entre mamíferos y reptiles*. Tesis Doctoral, Universitat de les Illes Balears.
- Armitage, R. (1995). Microarchitectural Findings in Sleep EEG in Depression: Diagnostic Implications. *Biological Psychiatry*, 37:72-84.
- Armitage, R., Hoffmann, R.F., Rush, J. (1999). Biological rhythm disturbance in depression: temporal coherence of ultradian sleep EEG rhythms. *Psychological Medicine*, 29:1435-1448.
- Aserinsky, E., Kleitman, N. (1953). Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science*, 118: 273-274.
- Ayala-Guerrero, F., Mexicano, G. (2008) . Sleep and wakefulness in the green iguanid lizard (*Iguana iguana*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A 151:305–312.
- Bruce Durie, D.J. (1981). Sleep in animals. En: Wheatley, D. (Ed.), *Psychopharmacology of Sleep*. Raven Press, pp. 1-18, New York.
- Clarke, A., Barry, R., McCarthy, R., Selikowitz, M., Johnstone, S. (2008). Effects of imipramine hydrochloride on the EEG of children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder who are non-responsive to stimulants. *International Journal of Psychophysiology*, 68: 186-192.
- Flanigan, W.F. (1973). Sleep and wakefulness in iguana reptiles, *Ctenosaura pectinata* and *Iguana iguana*. *Brain Behavior and Evolution*, 8: 401-436.
- Gamundí, A. (1990). *Análisis comparativo de los estados de actividad de mamíferos y reptiles*. Tesis Doctoral, Universitat de les Illes Balears.
- González, J., Vera, L.M., García-Cruz, C.M., Rial, R.V. (1978). Efectos de la temperatura en el electroencefalograma y los potenciales evocados de los reptiles (*Lacerta galloti*). *Rev. Esp. Fisiol*, 34:153-158.
- Jha, S.K., Brennan, F.X., Pawlik, *et al.* (2005). REM sleep: a sensitive index of fear conditioning in rats. *European Journal of Neurosciences*, 21:1077–1080.
- Mouchet-Mages, S., Olié, J.P. (2007). Antidepressants and sleep: the need for better treatment. *Mediographia*, 29(1):50-55.

- Nomura T, Kawaguchi M, Ono K, Murakami Y. 2013. Reptiles: A new model for brain evo-devo research. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*, 320B:57–73.
- Phurailatpam, J. (2014). Evoked potentials: Visual evoked potentials (VEPs): Clinical uses, origin, and confounding parameters. *Journal of Medical Society*, 28:140-4.
- Pieron, H. (1913). *Le problema physiologique du sommeil*. Paris: Masson.
- Rechtschaffen, A., Kales, A. (1968). *A manual of standardized terminology: techniques and scoring system for sleep stages of human subjects*. Ucla Brain Information Service/Brain Research Institute; Los Angeles, California.
- Rial, R.V., Akâarir, M., *et al.* (2010). Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: From reptiles to mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34:1144–1160.
- Rial, R., Akaârir, M., Nicolau, C., Gamundí, A., Esteban, S. (2006). Sueño y vigilia: aspectos fisiológicos. En Madrid, J., Rol de Lama, A., *Cronobiología básica y clínica* (330-363). Madrid: Editec@red.
- Rial, R., Garau, C., Aparicio, S., Esteban, S. (2006). Evolución, significado biológico y alteraciones del sueño. En Madrid, J., Rol de Lama, A., *Cronobiología básica y clínica* (366-397). Madrid: Editec@red.
- Rial, R.V., González, J. (1978). Kindling effect in the reptilian brain: motor and electrographic manifestations. *Epilepsia*, 19: 581-589.
- Rial, R.V., Nicolau, M.C., Gamundí, A., *et al.* (2007a). The trivial function of sleep. *Sleep Medicine Reviews*, 11:311-325.
- Rial, R.V.; Nicolau, M.C.; López-García, J.A. & Almirall, H. [1993]. On the evolution of waking and sleeping. *Comp. Physiol. Biochem.*, 104A(2):189-193.
- Saper, B., Scammell, T.E., Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437: 1257-1263.
- Steiger, A., Kimura, M. (2010). Wake and sleep EEG provide biomarkers in depression. *Journal of Psychiatric Research*, 44: 242-252
- Tobler, I. (1985). Deprivation of sleep and rest in vertebrates and invertebrates. En: S. Inoué y A. A. Borbély (Eds.), *Endogenous sleep substances and sleep regulation*. VNU Science Press, Utrecht.

- Yasuda, S., Yoshida, M., Yamagata, H. *et al.* (2014). Imipramine Ameliorates Pain-related Negative Emotion via Induction of Brain-derived Neurotrophic Factor. *Cell Mol Neurobiol*; 34:1199–1208.