

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental

“Determinación de los efectos de la restricción de sueño por el método de plataformas múltiples modificado sobre la memoria declarativa, la plasticidad sináptica y la función eléctrica del hipocampo de rata”

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental

PRESENTA

Mtro. en Biol. Exp. **Jesús Enrique García Aviles**

Matrícula: 2192802432

ORCID: 0000-0003-1259-5155

Correo electrónico: enrique.aviles222@gmail.com

COMITÉ TUTORAL

Co-directora interna: Dra. Beatriz Gómez González (UAM-I)

Directora externa: Dra. Mara Alaide Guzmán Ruiz (UNAM)

Asesora: Dra. Adriana Jiménez Hernández (HJM)

JURADO

Presidente: Dra. Mina Königsberg Fainstein

Secretario: Dra. Adriana Jiménez Hernández

Vocal: Dra. Anahí Chavarría Krauser

Vocal: Dr. Julio César Almanza Pérez

Iztapalapa, Ciudad de México, 17 de noviembre del 2025

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 10 de octubre de 2025

Comisión Académica del Posgrado

Presente

El que suscribe **Jesús Enrique García Aviles** alumno con número de matrícula **2192802432**, del posgrado **Doctorado en Biología experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **"Determinación de los efectos de la restricción de sueño por el método de plataformas múltiples modificado sobre la memoria declarativa, la plasticidad sináptica y la función eléctrica del hipocampo de rata"** a desarrollar en la **Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa**, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

Así mismo reconozco que toda información o dato obtenido dentro del proyecto que desarrolle pertenece a la Universidad Autónoma Metropolitana.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.


Jesús Enrique García Aviles
Nombre completo y firma

Declaración de originalidad

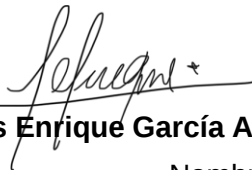
El que suscribe **Jesús Enrique García Aviles**, alumno del posgrado **Doctorado en Biología experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **"Determinación de los efectos de la restricción de sueño por el método de plataformas múltiples modificado sobre la memoria declarativa, la plasticidad sináptica y la función eléctrica del hipocampo de rata"**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento antes el H. Jurado para la obtención del grado de **Doctor en Biología experimental** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna personas física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 10 de octubre del 2025

Atentamente


Jesús Enrique García Aviles

Nombre y firma del alumno

El presente trabajo se realizó principalmente en los laboratorios Sensorial I y II del Departamento de Fisiología en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT (SECIHTI), registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave **DAFCYT-2003IDPTNNN0020**.

Número de apoyo otorgado a Jesús Enrique García Aviles por CONACYT (SECIHTI): **801573**

Este trabajo fue financiado por subvenciones de Ciencia Básica y de Frontera 2023-2024 CONACYT (SECIHTI): **CBF2023-2024-870** otorgado a la Dra. Mara Alaide Guzmán Ruiz, **CBF2023-2024-1804** otorgado a la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán y por los apoyos UNAM-PAPIIT: **IA205523** otorgado a la Dra. Mara Alaide Guzmán Ruiz y UNAM-PAPIIT: **IN22524** otorgado a la Dra. Natalí N. Guerrero Vargas.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “**Determinación de los efectos de la restricción de sueño por el método de plataformas múltiples modificado sobre la memoria declarativa, la plasticidad sináptica y la actividad eléctrica del hipocampo de rata**”, que presentó

El mes de noviembre del año 2025

Presidente: Dra. Mina Königsberg Fainstein. Departamento de Ciencias de la Salud, laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, UAM-Iztapalapa.

Secretario: Dra. Adriana Jiménez Hernández. División de Investigación, Hospital Juárez de México.

Vocal 1: Dra. Anahí Chavarría Krauser. Unidad de Medicina Experimental “Dr. Ruy Pérez Tamayo”, Facultad de Medicina, UNAM.

Vocal 2: Dr. Julio César Almanza Pérez. Profesor Titular C. Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-Iztapalapa.

Miembros del comité de tutores:

Directora externa: Dra. Mara Alaide Guzmán Ruiz

Laboratorio de Sensorial I y II, Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina.
Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.

Co-directora interna: Dra. Beatriz Gómez González

Laboratorio de Neuropsicobiología, Área de Neurociencias, Departamento de Biología
de la Reproducción, CBS. Universidad Autónoma Metropolitana, CDMX.

Asesora: Dra. Adriana Jiménez Hernández

División de Investigación, Hospital Juárez de México, CDMX.

Agradecimientos

A Evangelina, amiga y madre siempre presente, agradezco profundamente tu dedicación y apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso. Gracias por acompañarme, por creer en mí y por ser mi inspiración constante para seguir adelante.

A Calixto, mi padre, por tu cariño, tu apoyo permanente y por recordarme siempre cuánto orgullo sientes de mí.

A mis hermanas Elizabeth, Carmen y Ariana, gracias por su amor, comprensión y complicidad inquebrantables.

A Moisés, por tu amor, tu apoyo y la motivación que me brindas para continuar en el camino de la investigación; siempre has estado en primera fila, observando con entusiasmo cada paso que doy.

A la Dra. Mara Guzmán, gracias por estar cuando más lo necesité. No solo me brindaste tu ayuda académica en momentos en que pensé abandonar la ciencia, sino que también contribuiste profundamente a mi crecimiento personal. Aprecio y valoro infinitamente tu guía, tu generosidad y tu amistad.

A mis amigos Lisbeth y Sergio, quienes me han acompañado por más de una década. Aunque la distancia nos separe, nunca han dudado de mí y siempre me han ofrecido su apoyo y su amistad incondicional.

A mis amigos y colegas del laboratorio, especialmente Jessica Avilez y Maydelin Espadín, con quienes compartí innumerables desafíos y aprendizajes. Su compañía hizo más llevaderos los momentos difíciles del posgrado. Son, sin duda, las mejores.

A todos ustedes, gracias por estar, por creer en mí y por formar parte de este camino.

También quiero agradecer a la Unidad Académica Bioterio (UAB) de la Facultad de

Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la atención brindada. A la Unidad de Microscopia, especialmente a la Dra. Mónica Ramírez Vázquez, Biol. Ivonne Grisel Sánchez Cervantes, Mtra. Elba Carrasco Ramírez y a la Lic. María José Gómora Herrera por la atención, paciencia y todos los conocimientos que compartieron conmigo.

Al Dr. Esteban Santacruz, Clara Murcia-Mejía y a Gerardo Perera Marín por su ayuda en la determinación de los niveles de corticosterona.

A la Dra. Selva Rivas y a la Dra. Marlén Valdés Fuentes por su ayuda con las instalaciones y asesoría para la realización del Western blot.

A la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, por el espacio, recursos, asesoría y retroalimentación que hicieron posible la realización de este trabajo. A los técnicos académicos QFB. Virginia Arriaga y al Dr. Octavio Mercado por su amabilidad y ayuda.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	3
3.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
4.	INTRODUCCIÓN	6
4.1.	El sueño y su arquitectura	6
4.2.	Neurofisiología del sueño NMOR y MOR	8
4.3.	Efectos conductuales de la restricción y privación de sueño	9
4.4.	Funciones del hipocampo.....	10
4.5.	Función de la vía de ERK en el hipocampo	13
4.6.	Efectos de la restricción de sueño sobre la función hipocampal	15
4.7.	La microglía y función homeostática.....	16
4.8.	La función de la microglía en el sueño	18
4.9.	Respuesta de la microglía a alteraciones no homeostáticas.....	19
4.10.	Alteraciones de la microglía en respuesta a la pérdida de sueño	20
4.11.	Cambios morfológicos y funcionales de la microglía del hipocampo durante la reducción del sueño.....	22
5.	ANTECEDENTES	23
6.	JUSTIFICACIÓN	24
7.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
8.	HIPÓTESIS.....	25
9.	OBJETIVOS.....	25
9.1.	Objetivo general	25
9.2.	Objetivos particulares	26
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
10.1.	Animales	27
10.2.	Restricción de sueño mediante el modelo de plataformas múltiples modificado	28
10.3.	Diseño experimental.....	29
10.3.1.	Primer grupo: análisis de proteínas de plasticidad sináptica hipocampales inmediatamente después de 10 días de RS.....	29
10.3.2.	Segundo grupo: análisis de proteínas hipocampales de plasticidad sináptica después del último periodo de descanso de 4 horas.....	29
10.3.3.	Tercer grupo: registro de potenciales de campo locales hipocampales	31

10.3.4.	Cuarto grupo: evaluación de memoria declarativa dependiente de hipocampo después de las últimas 4 h de descanso.....	32
10.4.	Inmunofluorescencia	33
10.5.	Análisis de la expresión de Sin e IBA-1 y análisis morfológicos para las células IBA-1+ del hipocampo	34
10.6.	Western blot	35
10.7.	Registro y análisis de los potenciales de campo locales del hipocampo.....	36
10.8.	Pruebas conductuales de reconocimiento de objeto novedoso y reconocimiento de localización de objeto.....	39
10.8.1.	Habitación.....	40
10.8.2.	Entrenamiento	40
10.8.3.	Prueba RON	40
10.8.4.	Prueba LO	40
10.9.	Ensayo radioinmunológico para la detección de corticosterona.....	43
10.10.	Análisis Estadístico.....	43
11.	RESULTADOS.....	45
11.1.	Diez días de restricción de sueño inducen cambios específicos en la inmunorreactividad de IBA-1 y en la morfología microglial en el hipocampo	45
11.2.	La inmunorreactividad de IBA-1 en el hipocampo se restablece parcialmente tras 4 h de descanso, aunque la morfología microglial permanece alterada	48
11.3.	La inmunorreactividad de la sinaptofisina en el hipocampo permanece reducida incluso tras 4 h de descanso	51
11.4.	La fosforilación de ERK aumenta tras las últimas 4 h de descanso	55
11.5.	La actividad eléctrica hipocampal está alterada durante las 4 h de descanso tras 10 días de RS.	57
11.6.	La memoria declarativa se encuentra deteriorada tras 4 h de descanso después de 10 días de restricción de sueño	59
11.7.	Los niveles de corticosterona sérica no se modificaron a los 10 días de restricción de sueño ni después de las últimas 4 horas de oportunidad para dormir	61
12.	DISCUSIÓN	63
12.1.	La memoria dependiente del hipocampo se ve afectada por la restricción del sueño 63	
12.2.	La restricción de sueño altera la función microglial en modelos animales	64
12.3.	Alteración de la actividad eléctrica hipocampal tras la restricción del sueño.....	67
12.4.	Cambios en sinaptofisina y ERK durante la restricción de sueño	70
13.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	72
14.	CONCLUSIÓN	74

15.	REFERENCIAS.....	75
16.	ANEXOS Y PROBATORIOS.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1. Comparación de las fases del sueño entre humanos y roedores.	7
Figura 4.5. Circuito trisináptico hipocampal.....	14
Figura 10.3. Diseño experimental del método modificado de plataformas múltiples (MPMM) para la restricción de sueño.	30
Figura 10.7. Sitio de implantación del electrodo en el hipocampo de los animales sometidos a RS.	38
Figura 10.8. Pruebas conductuales reconocimiento de objeto novedoso y reconocimiento de localización de objeto.....	42
Figura 11.1. Diez días de restricción de sueño alteran el número y la morfología de las células positivas para IBA-1 en el hipocampo.	47
Figura 11.2. Las alteraciones en las células positivas para IBA-1 del hipocampo persisten después de 4 h de descanso tras 10 días de restricción de sueño.	50
Figura 11.3.1 Diez días de restricción de sueño disminuyen los niveles de sinaptofisina en el hipocampo.	53
Figura 11.3.2. La disminución de los niveles de sinaptofisina en el hipocampo inducida por 10 días de restricción de sueño persiste después de 4 horas de descanso.	54
Figura 11.4. Cuatro horas de descanso después del protocolo de restricción de sueño incrementan la relación pERK/ERK en el hipocampo de los animales restringidos de sueño.	56
Figura 11.5. La restricción de sueño altera la actividad eléctrica del hipocampo durante el período de oportunidad para dormir de 4 h.	58
Figura 11.6. La memoria declarativa se ve afectada después de 4 horas de oportunidad para dormir tras 10 días de restricción de sueño.	60
Figura 11.7. Los niveles de corticosterona sérica no se ven afectados después de 10 días de restricción de sueño ni después de 4 h de oportunidad para dormir.	62

1. RESUMEN

La pérdida de sueño se ha relacionado con el deterioro cognitivo asociado a la edad. Además, la restricción del sueño (RS) altera la fisiología de múltiples regiones cerebrales e incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) además de disminuir la expresión de proteínas relacionadas a la plasticidad sináptica. Entre estas regiones, el hipocampo, tanto de humanos como de roedores, presenta alteraciones que perduran más tiempo que en otras áreas como los ganglios basales y el hipotálamo. En el presente estudio, ratas macho adultas fueron sometidas a 10 días de RS utilizando el método modificado de plataformas múltiples (MPMM) y se evaluaron diferentes marcadores en el hipocampo inmediatamente y después de un periodo de descanso de 4 h posteriores a la RS. Inmediatamente después de la restricción, los animales del grupo RS mostraron un aumento en la inmunorreactividad (IR) a la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (IBA-1) y en el número de células positivas a este marcador, hallazgos consistentes con activación microglial; estos cambios morfológicos persistieron tras un periodo de recuperación de 4 horas. Además, determinamos la expresión de las proteínas relacionadas con plasticidad sináptica sinaptofisina (Sin) y de la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) total y su forma fosforilada (pERK). Observamos que la expresión relativa de Sin se redujo significativamente después de la RS y permaneció disminuida tras el periodo de descanso, mientras que la relación pERK/ERK aumentó significativamente al final del periodo de recuperación. Estas alteraciones moleculares se acompañaron de una disrupción en los potenciales de campo locales (PCL) del hipocampo, caracterizada por un aumento en la actividad alfa y beta, y una disminución en las

bandas delta y theta. De manera importante, las ratas sometidas a RS mostraron un deterioro en la memoria a corto plazo en las pruebas de reconocimiento del objeto novedoso (RON) y localización de objeto (LO), luego del periodo de recuperación. En conjunto, estos hallazgos demuestran que la RS subcrónica induce alteraciones persistentes en la microglía y en la sinapsis, así como una señalización anormal de ERK que perdura tras un breve descanso, que podría relacionarse con disfunción de la red hipocampal y deterioro de la memoria.

2. ABSTRACT

Sleep loss has been implicated in age-related cognitive decline. Sleep restriction (SR) disrupts the physiology of multiple brain regions, increases blood–brain barrier (BBB) permeability, and reduces the expression of proteins associated with synaptic plasticity. Among these regions, the hippocampus in both humans and rodents displays alterations that persist longer than those observed in the basal ganglia or hypothalamus. In this study, adult male rats were exposed to 10 days of SR using the modified multiple platform method (MPMM). After the protocol, different markers were evaluated in the hippocampus immediately after SR and following a 4-h recovery period. SR animals exhibited increased immunoreactivity (IR) to ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) and a higher number of IBA-1–positive cells, consistent with microglial activation. These morphological changes persisted after recovery. We further examined the expression of synaptophysin (Syn), extracellular signal–regulated kinase (ERK), and its phosphorylated form (pERK). Syn levels were significantly reduced after SR and remained diminished following recovery, whereas the pERK/ERK ratio increased significantly after rest. Electrophysiological recordings revealed hippocampal local field potential (LFP) disruptions characterized by elevated alfa and beta activity and decreased delta and theta power. Behaviorally, SR rats exhibited short-term memory deficits in the novel object recognition (NORT) and object location (OLT) tasks after recovery. Together, these findings indicate that subchronic SR induces persistent microglial and synaptic alterations, accompanied by aberrant ERK signaling, which may contribute to hippocampal network dysfunction and memory impairment.

3. LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
C1q	Proteína del complejo 1 del complemento
C3	Proteína del complejo 3 del complemento
C3R	Receptor de C3
CA1	Cuerno de Amón 1
CA3	Cuerno de Amón 3
CD68	Cúmulo de diferenciación 68
CE	Corteza entorrinal
CX3CL1	Fractalquina
CX3CR1	Receptor de fractalquina
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GD	Giro dentado
IBA-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
IF	Inmunofluorescencia
IL-1β	Interleucina1 β
IL-6	Interleucina 6
IR	Inmunoreactividad

iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
LO	Localización de objeto
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MEK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MOR	Movimientos oculares rápidos
N1	Fase del sueño NMOR
N2	Fase del sueño NMOR
N3	Fase del sueño NMOR, también conocido como SOL
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NMOR	No movimiento oculares rápidos
P2Y12	Receptor purinérgico
pERK	Cinasa regulada por señales extracelulares fosforilada
PLP	Potenciación a largo plazo
PCL	Potenciales de campo locales
PSD95	Proteína de densidad postsináptica 95
RON	Reconocimiento de objeto novedoso
Sin	Sinaptofisina
SNC	Sistema nervioso central
SOL	Sueño de ondas lentas
TMEM119	Proteína transmembranal 119
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
WB	Western blot

4. INTRODUCCIÓN

4.1. *El sueño y su arquitectura*

El sueño es un proceso fisiológico altamente conservado en mamíferos necesario para la recuperación física y la regulación del metabolismo [1]. A nivel del sistema nervioso central (SNC), el sueño se ha relacionado con la limpieza de desechos celulares que son consecuencia del metabolismo celular [2, 3]. El sueño se caracteriza por patrones específicos de la actividad eléctrica evaluada mediante registros electroencefalográficos (EEG) o de los potenciales de campo locales (PCL) corticales acompañados de registros de la actividad electromiográfica (EMG) [4, 5].

La arquitectura general del sueño entre humanos y roedores es muy similar. En humanos, el sueño se divide en dos grandes fases: el sueño en donde de movimientos oculares rápidos (MOR) caracterizado por atonía muscular y la presencia de ondas de alta frecuencia y baja amplitud en el EEG; y el sueño NMOR en el que no se presentan los movimientos oculares rápidos y el EEG registra ondas de baja frecuencia y alta amplitud. El sueño NMOR se divide en 3 etapas conocidas como N1, N2 y N3, a la etapa N3 también se le denomina sueño de ondas lentas (SOL, por la presencia de ondas delta) [6]. El tipo de sueño que presentan los humanos se conoce como monofásico, ya que se caracteriza porque el tiempo en el que permanecen dormidos es un periodo bien definido principalmente durante la noche [7]. Durante este periodo, se presenta la alternancia del sueño MOR, NMOR y episodios breves de vigilia en ciclos de 90 minutos. Además, el sueño NMOR es predominante durante la primera mitad del sueño mientras que el sueño MOR se presenta con mayor proporción

durante la segunda mitad [8]. En roedores, las fases de sueño son las mismas, la principal diferencia con el sueño en humanos es que el patrón de sueño es polifásico, es decir, que sus ciclos de sueño se distribuyen a lo largo del día con mayor proporción durante el periodo de luz [9, 10] (Figura 4.1.). Aunque la conducta y la temporalidad del sueño entre humanos y roedores son diferentes, los mecanismos neurofisiológicos subyacentes y las funciones del sueño se conservan entre especies [11].

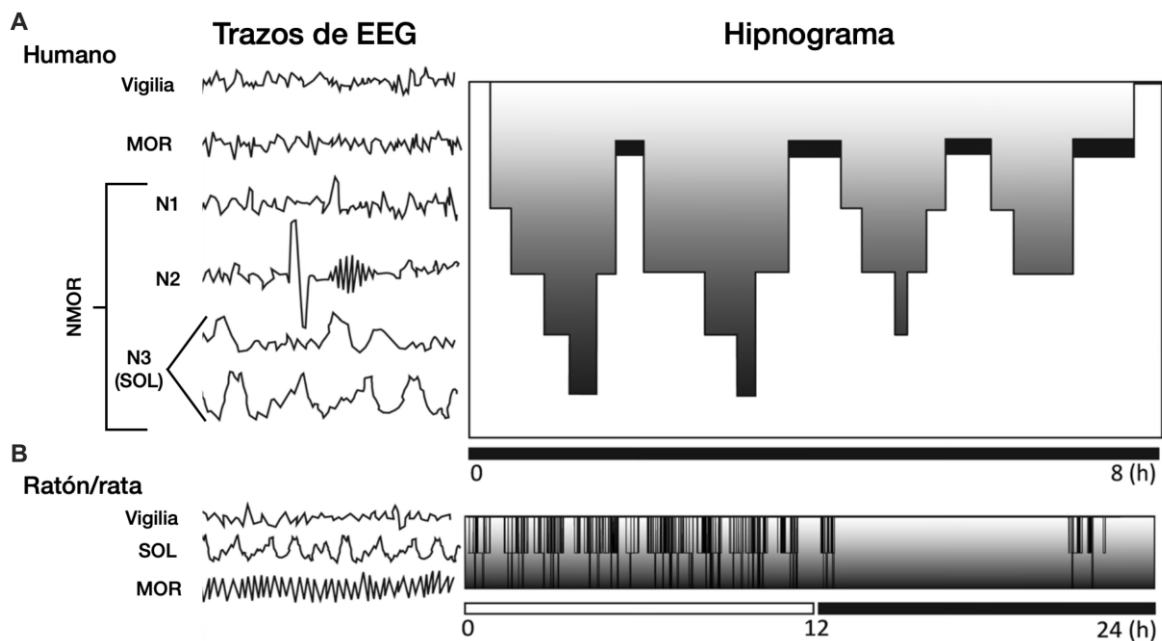


Figura 4.1. Comparación de las fases del sueño entre humanos y roedores.

A) fases del ciclo de sueño/vigilia de humano donde se muestran los trazos corticales representativos de la vigilia, el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y las fases correspondientes al sueño NMOR: N1, N2 y N3 conocido como sueño de ondas lentas (SOL) seguido por el hipnograma correspondiente. B) fases del ciclo sueño/vigilia de roedores con el trazo cortical representativo de la vigilia, SOL y sueño MOR seguido de su hipnograma correspondiente. Imagen tomada y modificada de Rayan et al., 2024.

4.2. Neurofisiología del sueño NMOR y MOR

El sueño NMOR se caracteriza por una disminución en el metabolismo del cerebro, así como la aparición de oscilaciones de frecuencia lenta en el EEG. En humanos las ondas lentas se caracterizan por la presencia de ondas delta corticales (0.5-4 Hz) y complejos K, mientras que en los roedores el EEG muestra predominancia de la actividad delta, sin embargo, la distinción entre las diferentes etapas es menos específica [12]. El sueño NMOR está regulado por la interacción de la corteza cerebral, el tálamo y núcleos del prosencéfalo basal [13]. En modelos animales se ha observado que durante esta etapa de sueño en el hipocampo se reactivan los patrones neuronales que previamente se activaron durante la vigilia, lo que apoya la hipótesis del papel de esta fase de sueño en la consolidación de la memoria [14]. En humanos, se ha observado mediante estudios polisomnográficos y de neuroimagen que la cantidad y calidad del SOL están asociadas con un mejor procesamiento de la memoria [15]. Por otra parte, el sueño MOR presenta un patrón de la actividad eléctrica parecido a la vigilia y con una actividad theta generalizada en el hipocampo, especialmente en roedores [16]. En el sueño MOR se presenta la activación de los núcleos pontinos y colinérgicos del tegmento que inducen la atonía muscular y las oscilaciones de frecuencia rápida en la corteza [17]. El sueño MOR está implicado en la consolidación de la memoria y la regulación del estado de ánimo. En roedores, la supresión selectiva del ritmo theta durante el sueño MOR evitó la consolidación de la memoria contextual [18]. Además, durante el sueño MOR se llevan a cabo procesos de reforzamiento sináptico mediante la expresión de genes relacionados con la

plasticidad sináptica como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés) y a la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (ARC, por sus siglas en inglés) [16, 19].

4.3. *Efectos conductuales de la restricción y privación de sueño*

La privación de sueño se define como la pérdida total de sueño ya sea por circunstancias particulares o por intervenciones experimentales mientras que la restricción de sueño se define como la disminución de la duración habitual de sueño que requiere un individuo para presentar un desempeño óptimo en sus tareas diarias [8, 20]. En humanos se ha observado que la reducción del tiempo de sueño disminuye el rendimiento en tareas que implican atención, toma de decisiones y la memoria de trabajo. Participantes adultos que fueron sometidos a un protocolo de restricción de sueño en el cual se les permitió dormir de 4 a 6 horas durante 14 días consecutivos presentaron un menor rendimiento en las pruebas de vigilancia psicomotora y la prueba computarizada de sustitución de símbolos de dígitos que evalúan el estado de alerta y la memoria de trabajo respectivamente. Los autores reportan que los efectos observados en el tiempo de reacción y la atención sostenida son comparables a los que presentan individuos privados completamente de sueño durante 1 o 2 noches [21]. La pérdida de sueño en ratas provoca alteraciones en la conducta. Tras 24 horas de privación total o fragmentación del sueño mediante cinta rodante, las ratas exhiben un aumento en la exploración de espacios abiertos en el test de campo abierto [22]. Además, ratas sometidas a privación del sueño MOR mediante el modelo de plataforma pequeña, presentaron problemas de orientación cuando fueron sometidas

a la prueba de laberinto acuático de Morris, indicando alteraciones en la capacidad de navegación de estos roedores y en regiones cerebrales implicadas en estas tareas como la corteza prefrontal y el hipocampo [23].

4.4. Funciones del hipocampo

El hipocampo es una estructura que se localiza en el lóbulo temporal y forma parte del sistema límbico. Las principales funciones del hipocampo son la formación, consolidación y recuperación de memorias [24]. Adicionalmente, es una región necesaria para la navegación espacial [25] y la regulación emocional [26]. La actividad eléctrica del hipocampo se caracteriza por una actividad rítmica de baja frecuencia, principalmente ondas theta (4-8 Hz), las cuales están asociadas con el procesamiento de señales ambientales y la codificación de la memoria [27, 28]. Dentro del hipocampo, el principal circuito neuronal para el procesamiento de la información es el circuito trisináptico el cual consiste en la vía perforante que es el grupo de sinapsis mediante el cual el giro dentado (GD) recibe información desde la corteza entorrinal (CE). Después, el GD envía información hacia la región CA3 del hipocampo a través de las fibras musgosas. Por último, las colaterales de Schaffer permiten la comunicación entre las neuronas piramidales del CA3 y la región CA1 hipocampal (Figura 4.5.) [29]. La PLP se lleva a cabo principalmente en la región CA1 y es inducida por las señales que se transmiten a través del circuito trisináptico hipocampal [30, 31].

Además, se ha determinado que la frecuencia theta es indispensable para establecer el proceso de PLP [18, 32, 33]. En experimentos *in vitro* e *in vivo* empleando un trazador sensible al voltaje se observó que la estimulación en la CE con una frecuencia

theta (5 Hz) ocasionó la propagación de la actividad neural a través del circuito trisináptico hipocampal [33]. En este experimento también se observó que la respuesta del hipocampo es dependiente de la frecuencia del estímulo en la CE; frecuencias de 1 Hz incrementaron los potenciales evocados en el GD significativamente, pero no en CA1. Además, la estimulación a 20 Hz no incrementó los potenciales evocados en el GD o CA1 en comparación con la estimulación a 5 Hz, que fue la única que incrementó los potenciales evocados y la PLP en CA1 [33], demostrando que la frecuencia theta es necesaria para la activación del circuito trisináptico. La hipótesis de Stepan y colaboradores para explicar este hallazgo es que el hipocampo funciona mediante una especie de “filtros”; mientras que la región del GD funciona como un “filtro de paso bajo”, el cual permite el paso de frecuencias bajas mientras que atenúa las señales de frecuencia alta. Por el contrario, la región CA3 permite el paso de frecuencias altas atenuando frecuencias bajas (efecto opuesto) [33]. Esta información sugiere que los ritmos hipocampales son indispensables para el establecimiento de procesos conocidos por consolidar la memoria. En ratas a las que se evaluó la actividad eléctrica hipocampal mientras realizaban la prueba de laberinto en T, la cual evalúa la memoria espacial, se observó que las oscilaciones theta y las gamma se acoplan en la región CA1 (el acoplamiento es un evento de organización temporal en el que la amplitud de las oscilaciones gamma se modula en función de la fase theta). Además, el comportamiento de este acoplamiento de frecuencias theta/gamma cambia conforme el animal adquiere habilidad en la tarea, lo que sugiere una función en la codificación y recuperación de información espacial [34]. Asimismo, el acoplamiento entre theta y gamma en tareas de memoria de trabajo espacial también se ha observado entre el

hipocampo y la corteza prefrontal en ratones modificados genéticamente que presentan déficit cognitivo y en ratones sometidos a pruebas de mayor dificultad cognitiva. Los autores sugieren que el incremento en el acoplamiento de las señales theta/gamma entre regiones puede ser un mecanismo compensatorio para mantener un buen desempeño en la memoria espacial cuando se incrementa la dificultad de la prueba [35]. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el acoplamiento cruzado de frecuencias es clave para la codificación secuencial de estímulos y para la plasticidad sináptica [36]. En el hipocampo predomina la neurotransmisión mediada por glutamato (glutamatérgica) que subyace a los procesos de plasticidad sináptica característicos de esta región, especialmente la PLP. La PLP depende de la activación de los receptores para *N*-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores para ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y los receptores para kainato que al ser activados permiten el influjo de iones Na^+ y Ca^{2+} activando cascadas de señalización intracelular y permitiendo el reclutamiento y la inserción de más receptores AMPA en la membrana postsináptica para reforzar la comunicación neuronal [37, 38]. Por otro lado, el GD es una región en la que se lleva a cabo la neurogénesis en roedores; este proceso contribuye a la plasticidad estructural y funcional del hipocampo y por lo tanto, a la capacidad de adaptación a nuevas experiencias [39]. La actividad neuronal activa vías de señalización transcripcionales y traduccionales que sostienen la plasticidad sináptica, incluidos genes de respuesta inmediata como *ARC*, *c-FOS*, así como proteínas estructurales y de señalización que estabilizan y permiten los cambios sinápticos.

4.5. Función de la vía de ERK en el hipocampo

La señalización de la vía ERK en el hipocampo desempeña un papel indispensable para los procesos de plasticidad sináptica y la memoria dependiente del hipocampo. La activación de la vía de las MAP cinasas (ERK/MAPK) acopla la actividad eléctrica con la expresión de genes que dependen de la activación de ERK que regula la transcripción de genes relacionados con la plasticidad. La activación de la vía ERK en respuesta a estímulos sinápticos promueve la activación de cascadas de señalización que regulan la expresión génica y la síntesis de proteínas necesarias para la memoria a largo plazo [40]. Por otro lado, la inhibición de MEK (cinasa activadora de ERK) evita la activación de ERK ante estímulos inductores de la PLP y atenúan su inducción [41]. En ratas, la activación de la vía de las MAPK incrementó en el hipocampo cuando los animales fueron sometidos a una prueba de condicionamiento contextual al miedo la cual evalúa el aprendizaje asociativo, sin embargo, al inhibir MEK, se abatió el aprendizaje, sugiriendo que la activación de la vía ERK/MAPK es necesaria para la consolidación de memoria [42]. Por otro lado, la vía ERK participa en la remodelación estructural de espinas dendríticas y en la regulación de proteínas presinápticas y postsinápticas, contribuyendo a la estabilización de circuitos neuronales tras la experiencia [43]. Esta evidencia vincula la vía de ERK con la expresión de proteínas esenciales para la PLP y la memoria, incluyendo el incremento de la expresión de diferentes proteínas sinápticas [44, 45]. Durante la PLP aumentan los puntos sinápticos (acumulaciones discretas de proteínas sinápticas visualizadas por inmunomarcaje que funcionan como indicadores de densidad sináptica) en donde se localizan proteínas de adhesión y sinapsis que participan en el ensamblaje de

proteínas pre- y postsinápticas que acompañan la consolidación de la PLP [46]. Estos hallazgos posicionan a la activación de ERK y las proteínas sinápticas de andamiaje y vesiculares, como la sinaptofisina, como efectores clave de la plasticidad [44-46]. La sinaptofisina (Sin) es una glucoproteína integral de las vesículas presinápticas identificada originalmente por Wiedenmann y Franke, y puede considerarse un marcador molecular de membrana vesicular sináptica [47]. Debido a su ubicuidad en las terminales presinápticas, la inmunorreactividad de la Sin se ha utilizado extensamente como índice cuantitativo de densidad sináptica en tejido humano y animal, con múltiples estudios que relacionan su abundancia con el número de sinapsis [48, 49]. Además, durante la fase tardía de la PLP, se presenta un incremento en el número de “puncta” positivos a Sin, lo que respalda su valor como marcador dinámico de cambios sinápticos estructurales [46-48].

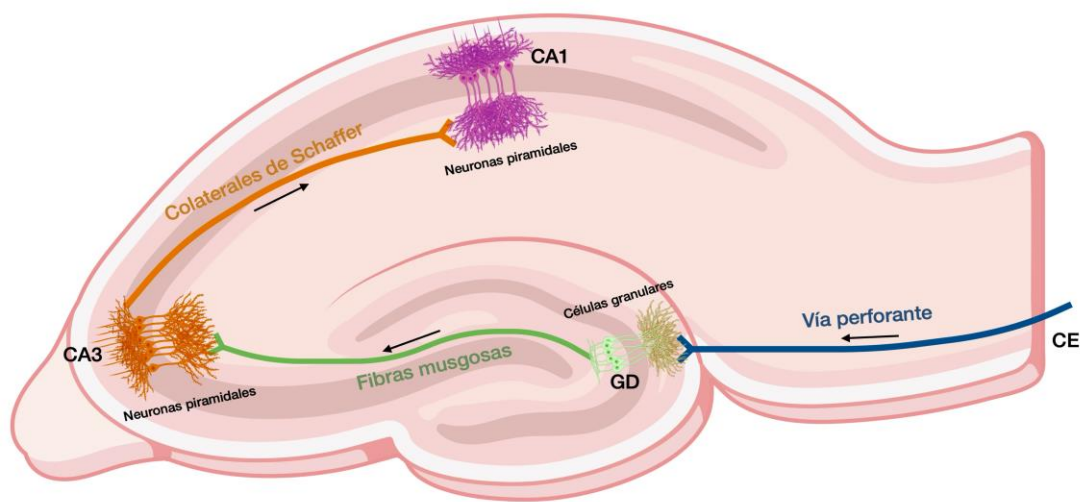


Figura 4.5. Circuito trisináptico hipocampal.

Esquema representativo del hipocampo de un roedor. La corteza entorrinal (CE) se comunica con el hipocampo proyectando axones al giro dentado (GD) mediante la vía perforante, las neuronas granulares del GD envían proyecciones (fibras musgosas) a las neuronas piramidales de la región CA3, por último, la CA3 se comunican con las neuronas piramidales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Creado en **biorender.com**.

4.6. Efectos de la restricción de sueño sobre la función hipocampal

La restricción o fragmentación del sueño tiene efectos adversos directos sobre la actividad eléctrica del hipocampo. En un modelo de fragmentación del sueño en ratas, en el cual se redujo significativamente el sueño MOR mediante interrupciones periódicas, se observó un deterioro de la PLP en la región CA1 del hipocampo. Estas alteraciones se asociaron a un pobre desempeño en la prueba del laberinto acuático de Morris, prueba que evalúa la memoria espacial que es dependiente del hipocampo [50]. Por otro lado, ratones a los cuales se abolió la actividad theta del hipocampo durante el sueño MOR presentaron un bajo desempeño en la prueba RON, sugiriendo que el ritmo theta durante esta fase de sueño es importante para la función cognitiva que depende del hipocampo [18]. Además, la restricción de sueño induce cambios específicos en los ritmos oscilatorios tanto en la corteza como en el hipocampo. Tras 6 horas de restricción de sueño, se observó un marcado incremento en la potencia de ondas delta durante el sueño posterior a la privación de sueño en la corteza, y refleja el control homeostático que ejerce la presión de sueño, el cual se define como el incremento progresivo de la necesidad para dormir en función al tiempo que el individuo pasa en vigilia [51, 52]. La pérdida de sueño altera la señalización de ERK en hipocampo y puede reducir marcadores sinápticos. En ratas las cuales fueron sometidas a 6 horas de restricción de sueño, se observó una disminución en la fosforilación de ERK1/2 en el hipocampo, estos animales presentaron una memoria espacial deteriorada 24 h después de protocolo de restricción, sugiriendo que la señalización de ERK es necesaria para la consolidación de la memoria espacial [53]. En ratones sometidos a restricción de sueño en el que se restaron 3 h a su periodo de

sueño durante 5 días, se observó la reducción en la expresión de proteínas pre y postsinápticas, incluida Sin, junto con pérdida de sinapsis y deterioro de memoria dependiente de hipocampo evaluada mediante las pruebas RON y condicionamiento contextual al miedo [54]. También se ha determinado cambios en la expresión de 1146 genes del hipocampo de ratones sometidos a un protocolo agudo de privación de sueño (5 h), con sobreexpresión de genes relacionados con splicing del RNA y asociados al núcleo, mientras que los genes regulados a la baja están implicados en procesos de adhesión celular, localización dendrítica, sinapsis y relacionados con la membrana postsináptica. No obstante, 3 h de descanso posterior a la privación de sueño normalizó los niveles de RNAm de la mayoría de genes alterados [55]. Estos resultados demuestran que la disminución del tiempo de sueño impacta a diferentes niveles la función y estructura del hipocampo. Sin embargo, son pocos los estudios que abordan la actividad eléctrica hipocámpal durante o después de la restricción y privación de sueño

4.7. *La microglía y función homeostática*

En condiciones fisiológicas, la microglía ejerce un papel fundamental para el mantenimiento de la homeostasis cerebral a través del monitoreo constante del microambiente, empleando la motilidad de sus procesos para realizar una vigilancia continua del parénquima cerebral y detectar de manera rápida alteraciones en la actividad neuronal y cambios en el microambiente [56]. A nivel molecular, la función homeostática microglial está sostenida por firmas transcripcionales que incluyen al receptor purinérgico P2RY12 acoplado a proteína G, la proteína transmembranal 119

(TMEM119) y el receptor CX3CR1. La vigilancia microglial depende principalmente de los receptores purinérgicos P2Y₁₂ que median la respuesta a nucleótidos extracelulares liberados por neuronas y astrocitos durante la actividad neuronal y sináptica. Adicionalmente, los canales iónicos de potasio THIK-1 que regulan la extensión y retracción de los procesos microgliales [57]. Otra función relevante de la microglía es la remodelación sináptica, en la que se eliminan conexiones innecesarias para favorecer la consolidación de circuitos eficientes para el aprendizaje y la memoria [58]. Este proceso es mediado por la interacción de la fractalquina con su receptor (CX3CL1–CX3CR1) y el sistema del complemento (C1q→C3→C3R) [55, 58]. Por otra parte, los ejes inhibitorios CD47-SIRP α permiten la discriminación de las sinapsis que deben ser eliminadas de las que se deben conservar [59], lo que la convierte a la actividad microglial en un agente crítico del mantenimiento y balance de los circuitos sinápticos dependientes de la actividad neuronal [60-62]. La plasticidad sináptica mediada a través de la microglía se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos: (a) poda de elementos sinápticos mediante el marcaje con C1q-C3 (opsonización), reconocimiento y posterior fagocitosis mediante el receptor de C3 (C3R), (b) liberación de factores moduladores como TNF- α y BDNF que regulan el tráfico de receptores AMPA y promueve la formación, estabilidad y fuerza sináptica, y (c) contactos dinámicos con espinas dendríticas que influyen en la estabilidad y recambio sináptico [60, 63, 64].

4.8. *La función de la microglía en el sueño*

La interacción entre el sueño y el sistema inmunitario ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, la evidencia sobre el papel específico de la microglia en la regulación del sueño es relativamente reciente. En ratones, se ha observado que la activación de los receptores microgliales P2Y₁₂ acoplados a proteínas G_i incrementa la producción de adenosina, lo que reduce los niveles de noradrenalina. Dicho mecanismo promueve la disminución de la vigilia y un aumento del tiempo total de sueño, particularmente del sueño NMOR [110]. Asimismo, se reportó una reducción en el número de episodios tanto de sueño MOR como de sueño NMOR, así como en los periodos de vigilia. De manera complementaria, la depleción microglial mediante la administración de un inhibidor del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R) provocó alteraciones en la arquitectura del sueño e incrementó la duración de la fase NMOR [143]. Por otra parte, se ha demostrado que los cambios morfológicos de la microglia y su interacción con las espinas dendríticas varían a lo largo del ciclo sueño-vigilia. Mediante microscopía de dos fotones, Nebeling et al. observaron que, durante la vigilia existe un mayor contacto de los procesos microgliales con las espinas dendríticas de las neuronas y que hacen mayor contacto con las que serán fagocitadas o en las regiones que se presentarán nuevas dendritas [144]. Estos hallazgos sugieren que la microglia participa activamente en la modulación del sueño fisiológico, integrando señales purinérgicas, monoaminérgicas y sinápticas para ajustar la duración y calidad del sueño. En conjunto, la evidencia posiciona a la microglia como un modulador clave del ciclo sueño-vigilia, con un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis neural durante el descanso.

4.9. Respuesta de la microglía a alteraciones no homeostáticas

La disrupción o supresión de las vías de señalización que emplea la microglía para mantener las funciones homeostáticas de vigilancia induce cambios en la microglía hacia perfiles pro-inflamatorios caracterizados por la inducción de la interleucina-1 beta (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la cintas de óxido nítrico inducible (iNOS) y un aumento en MAPK (p38, ERK) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) [65, 66]. La vía de señalización MAPK/ERK actúa como nodo clave en la transducción de señales proinflamatorias en la microglía. La presencia en el SNC de estímulos como lipopolisacárido (LPS), oligómeros beta amiloide (A β) o señales de daño activan rápidamente la vía ERK, con aumentos de la forma fosforilada de ERK1/2 en las células de la microglía en rangos temporales de minutos a horas [65-67]. En cultivos primarios de microglía de ratón se observó que la inhibición farmacológica de ERK con el inhibidor SCH772984 suprimió la expresión de genes esenciales para la homeostasis, genes microgliales asociados a enfermedad tanto anti como proinflamatorios, sugiriendo que la vía de señalización de ERK es indispensable para el correcto funcionamiento y respuesta microglial [68]. Estudios de secuenciación de una sola célula han mostrado que los estados activados microgliales implican la inducción de cinasas (por ejemplo, MEK $\rightarrow$ ERK) y de fosfatasas reguladoras que modulan la amplitud y duración de la fosforilación de ERK, lo cual induce la producción de citocinas y cambios en la capacidad fagocítica [67, 68]. Estos datos sugieren que la microglía integra señales neuronales, metabólicas e inmunes para alternar entre un estado que favorece la homeostasis y estados pro-inflamatorios que, si son mantenidos, conducen a la disfunción sináptica [63, 68]. Disminuir la expresión de C3

o el receptor CX3CR1 mediante manipulación genética han demostrado que la interrupción de estas vías de comunicación microglía-neurona altera la eliminación selectiva de sinapsis promoviendo un incremento en el número de sinapsis inmaduras y deteriora la consolidación de la memoria, lo que demuestra la necesidad funcional de la microglía en el refinamiento de circuitos sinápticos dependientes de actividad [60, 62].

4.10. Alteraciones de la microglía en respuesta a la pérdida de sueño

La restricción y privación de sueño inducen un conjunto de cambios en el fenotipo microglial que incluyen activación transcripcional pro-inflamatoria, aumento de marcadores de fagocitosis y remodelado morfológico con disminución en el número de ramificaciones y el incremento del tamaño del soma [68-70]. En ratones, se ha descrito que la vigilia prolongada incrementa la expresión de genes del complemento (C1q, C3) y de receptores implicados en fagocitosis microglial, además, el bloqueo farmacológico o genético de la vía del complemento atenúa la pérdida sináptica inducida por privación de sueño [61, 62]. Bellesi et al. observaron activación microglial cortical y aumento en la fagocitosis, tanto en componentes pre y postsinápticos tras la privación aguda y crónica de sueño; sin embargo, los animales con restricción crónica muestran cambios morfológicos de activación microglial, así como una mayor cantidad de elementos sinápticos fagocitados, sugiriendo que la privación y la restricción crónica de sueño tienen efectos diferentes sobre la morfología y función microglial. Adicionalmente, otros protocolos de restricción crónica de sueño reportan el incremento en la expresión de citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la corteza después de la pérdida

de sueño [69, 71, 72]. Estos datos sugieren que la pérdida de sueño puede dirigir a la microglía no solamente a un estado proinflamatorio sino también a un estado fagocítico que pudiera estar asociado con una poda sináptica exacerbada y por ende con el deterioro cognitivo observado tras la restricción de sueño [61, 62, 70]. En modelos de privación de sueño, el aumento de señalización de la vía del complemento y la activación microglial se han asociado directamente con la reducción de marcadores pre y postsinápticos así como con déficits en la PLP y en tareas de memoria espacial, sugiriendo la vía causal activación microglial→pérdida sináptica→disfunción de la plasticidad sináptica [61, 62]. La pérdida de sueño aguda induce la disminución de los niveles de pERK en el hipocampo de ratas tras privación aguda [53]. Por otro lado, en un protocolo de RS de larga duración (hasta 6 meses) se reportó un incremento en los niveles de pERK en el cerebelo [73]. Estos datos sugieren que la respuesta del eje ERK puede ser regionalmente heterogénea (hipocampo vs cerebelo) y dependiente del paradigma (agudo vs crónico). En conjunto, la evidencia apoya que ERK es un regulador multifuncional que, en la microglía, es necesario para la vigilancia homeostática y de respuesta ante cualquier desafío incluyendo la pérdida de sueño.

4.11. Cambios morfológicos y funcionales de la microglía del hipocampo durante la reducción del sueño

El hipocampo muestra una respuesta microglial sensible al estrés, lesión y alteraciones del sueño. La combinación de análisis morfométricos estandarizados, inmunohistoquímica y ensayos de fagocitosis proporcionan evidencia para relacionar la morfología microglial con la función fagocítica [74, 75]. Los cambios morfológicos de la microglía sugieren cambios en su función. En protocolos de privación o restricción de sueño se ha reportado una reducción en el número promedio de intersecciones de las ramificaciones y un incremento en el tamaño del soma de las células microgliales en las regiones CA1 y GD del hipocampo, además, en algunos trabajos utilizan el aumento del soma (+25–60 %) y reducciones en el número intersecciones (–20–45 %) para sugerir la transición hacia morfología “bushy” o tipo ameboide asociados a mayor fagocitosis [74, 75]. Además, estos cambios morfológicos están acompañados de una mayor cantidad de sinaptosomas internalizados y aumento de marcadores lisosomales como CD68, lo que sugiere un incremento de la actividad fagocítica y de la capacidad de remodelado sináptico en el hipocampo tras protocolos de pérdida de sueño.

5. ANTECEDENTES

La restricción de sueño (RS) es un factor que no solo induce alteraciones de la función cognitiva de manera transitoria, sino que también induce alteraciones duraderas en regiones cerebrales críticas para el aprendizaje y la memoria, como el hipocampo [76, 77]. Diversos estudios han demostrado que la disminución en el tiempo de sueño altera múltiples procesos celulares, incluyendo la neurogénesis, la plasticidad sináptica y la señalización intracelular [78, 79]. Además, el hipocampo parece ser más vulnerable que otras regiones del encéfalo, esto se refleja en las alteraciones estructurales y funcionales que pueden persistir incluso tras diversos periodos de recuperación [80]. En humanos, se observó que después de una sola noche de privación completa de sueño, la concentración del péptido β -amiloide incrementó en el hipocampo de los participantes. También se observó que la memoria dependiente del hipocampo se encontraba alterada incluso después de dos días de recuperación [81, 82]. Adicionalmente, en ratones sujetos a 5 días consecutivos de restricción de sueño, el incremento cortical de las ondas delta asociados al rebote de sueño no se observó al final del periodo de RS sugiriendo que la restricción de sueño altera la respuesta homeostática que regula la presión de sueño. Por otro lado, ratones que fueron sometidos a un protocolo de restricción de sueño crónico se observó que un año después los ratones presentaban una reducción tanto en el volumen como en el número de neuronas en la región CA1 del hipocampo acompañado alteraciones en la memoria espacial, activación glial y aumento en la concentración de péptido β -amiloide y Tau fosforilado [83]. A pesar de estas evidencias, no se ha explorado el tiempo necesario para restaurar las alteraciones reportadas por los protocolos de restricción

de sueño o si los efectos observados después de los protocolos de RS persisten a largo plazo.

6. JUSTIFICACIÓN

La restricción de sueño representa una condición creciente en la vida moderna, especialmente en contextos urbanos y laborales donde se prioriza la vigilia prolongada sobre el descanso fisiológico. A pesar de su alta prevalencia, los estudios actuales presentan limitaciones metodológicas relevantes: muchos emplean modelos de privación aguda, descuidando que en humanos la RS suele ser subcrónica o crónica; otros no contemplan evaluaciones posteriores a un periodo de recuperación; y pocos integran de manera simultánea el análisis de actividad eléctrica y marcadores moleculares en regiones clave como el hipocampo. El presente proyecto busca abordar estas limitaciones mediante un enfoque experimental que evalúe, de forma integrada y temporal, el efecto de una RS subcrónica sobre la morfología microglial, la expresión sináptica, la señalización intracelular mediada por ERK/pERK, los patrones de actividad eléctrica hipocampal y el desempeño en tareas cognitivas dependientes del hipocampo, tanto inmediatamente después del protocolo como tras un periodo de recuperación de 4 horas. Esta aproximación permitirá establecer un panorama más completo de las consecuencias neurobiológicas de la RS. Considerando la creciente evidencia que vincula los trastornos del sueño con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el estudio de estos mecanismos resulta de gran relevancia no solo desde una perspectiva neurocientífica, sino también clínica y de salud pública.

7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la restricción de sueño (RS) sobre la expresión de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica, la actividad eléctrica hipocampal y la memoria dependiente de hipocampo inmediatamente después de 10 días de RS y después de 4 h de descanso?

8. HIPÓTESIS

La RS mediante el modelo de plataformas múltiples modificado (MPMM) durante diez días consecutivos inducirá alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica, en la actividad eléctrica hipocampal y en la memoria dependiente del hipocampo. Estas alteraciones no serán revertidas después de 4 h de oportunidad para dormir.

9. OBJETIVOS

9.1. *Objetivo general*

Determinar los efectos de la RS sobre la expresión de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica, la actividad eléctrica hipocampal y la memoria dependiente del hipocampo inmediatamente después de 10 días de RS y después de 4 h de oportunidad para dormir.

9.2. *Objetivos particulares*

Evaluar el efecto de 10 días de RS usando el MMPM en la expresión de IBA-1 en el hipocampo de rata, así como en el número y morfología de las células positivas a este marcador inmediatamente después de la restricción de sueño y después de un periodo de descanso de 4 h.

Determinar la expresión de la proteína presináptica sinaptofisina (Sin) en el hipocampo de los animales RS inmediatamente después de la restricción de sueño y después de un periodo de descanso de 4 h.

Cuantificar la expresión total de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) así como de su forma fosforilada (pERK) en el hipocampo de los animales inmediatamente después de la restricción de sueño y después de un periodo de descanso de 4 h.

Determinar la actividad eléctrica del hipocampo antes del protocolo de MPMM y durante las 4 h de oportunidad para dormir posteriores a la restricción de sueño.

Evaluar la memoria declarativa dependiente del hipocampo de los animales después de 4 h de oportunidad para dormir posteriores a la RS.

Determinar la concentración sérica de corticosterona en animales inmediatamente después de la restricción de sueño y después de 4 h de oportunidad para dormir posteriores a la RS.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. Animales

Este estudio fue conducido de acuerdo con los lineamientos y principios establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (1964) y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo el número de protocolo 032-2023 FM/OI/102/2023. Asimismo, todas las manipulaciones animales se realizaron conforme a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, con el fin de minimizar el sufrimiento animal. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (peso: 280–350 g; edad: 3 meses), provenientes de la Unidad Académica Bioterio (UAB) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio, con un ciclo luz–oscuridad de 12:12 h (luz encendida de 08:00 a 20:00 h; ZT 0–12), temperatura ambiente controlada a 22 ± 2 °C y flujo constante de aire filtrado. Durante todo el experimento, las ratas tuvieron acceso libre a agua potable y alimento estándar de laboratorio (5001 PMI Nutrition International Inc., Greenwood, MO).

Previo al inicio de los procedimientos experimentales, todos los animales fueron sometidos a un periodo de habituación de 7 días. Posteriormente, fueron asignados aleatoriamente a uno de los cuatro grupos experimentales, los cuales se describen en las siguientes secciones.

10.2. Restricción de sueño mediante el modelo de plataformas múltiples modificado

La RS se llevó a cabo utilizando el MPMM, un protocolo que evita el estrés por aislamiento social, ya que dos ratas del mismo grupo social se colocan juntas tanto en la caja de restricción como en su respectiva caja hogar. Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado que este protocolo de RS no incrementa los niveles séricos de corticosterona, al menos cuando se mide al final del décimo día durante las dos últimas horas de la fase de descanso [84]. Además, este procedimiento evita el estrés por inmovilización, ya que cada caja de restricción contiene tres plataformas. Se ha reportado que este método elimina completamente el sueño MOR y reduce el sueño NMOR en aproximadamente un 31% [85, 86] .

Para inducir la RS, las ratas del grupo experimental fueron colocadas en pares dentro de cajas de acrílico (53 x 43 x 20 cm) que contenían 3 cm de agua en el fondo. En cada jaula se ubicaron tres plataformas (7 x 6 cm, diámetro y altura, respectivamente) que permitían a los animales estar de pie, sentarse o recostarse. Sin embargo, al perder el tono muscular característico del sueño, los animales caían al agua, provocando su despertar. Las ratas permanecieron en estas cajas de restricción durante 20 horas continuas diarias (de 20:00 a 16:00 h) por 10 días consecutivos, y se les permitió descansar en sus cajas hogar durante las 4 horas restantes del día (de 16:00 a 20:00 h) (Figuras 10.3. A y B).

10.3. Diseño experimental

Se utilizaron cuatro grupos independientes de ratas Wistar macho para evaluar los efectos de la restricción de sueño sobre diferentes parámetros neurobiológicos y conductuales (Figura 10.3.).

10.3.1. Primer grupo: análisis de proteínas de plasticidad sináptica hipocampales inmediatamente después de 10 días de RS

El primer grupo estuvo conformado por 20 animales, divididos en un grupo control (CNT, n = 10), que permaneció en sus jaulas de hogar durante todo el protocolo, y un grupo con restricción de sueño (RS, n = 10). Al término del décimo día, tras las últimas 20 horas de RS, se dio eutanasia inmediatamente a los animales del grupo RS y también a sus respectivos controles pareados en el tiempo. Los cerebros fueron recolectados ya sea después de ser perfundidos para inmunofluorescencia (IF, n = 4 por condición) o por decapitación para análisis por Western blot (WB, n = 6 por condición) (Figura 10.3. C). Además, se obtuvieron muestras de sangre para la cuantificación de corticosterona; no fue posible obtener sangre de dos ratas del grupo RS.

10.3.2. Segundo grupo: análisis de proteínas hipocampales de plasticidad sináptica después del último periodo de descanso de 4 horas

El segundo grupo incluyó inicialmente a 20 animales (10 RS y 10 CNT). Los animales del grupo RS fueron sometidos al mismo protocolo de restricción de sueño, pero tras las últimas 20 horas de RS, se les permitió una recuperación de 4 horas de sueño en

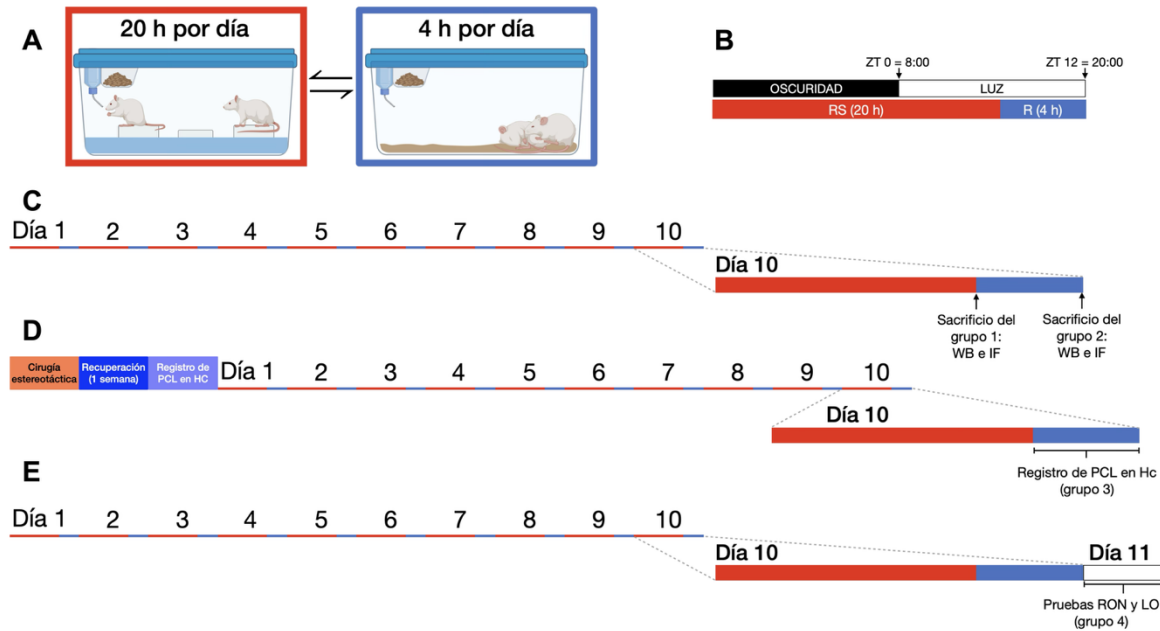


Figura 10.3. Diseño experimental del método modificado de plataformas múltiples (MPMM) para la restricción de sueño.

A) Diagrama del protocolo MPMM. Los animales fueron colocados en la caja de restricción de sueño (RS; borde rojo) durante 20 h por día y luego regresados a sus cajas hogar durante 4 h para darles oportunidad de dormir (R, borde azul). Este esquema se repitió durante 10 días consecutivos. B) Cronograma diario alineado con el ciclo luz–oscuridad. Las barras negras y blancas representan las fases de oscuridad y luz, respectivamente. El periodo de RS (barra roja) se realizó desde que las luces se apagaron (ZT 12 = 20:00 h) hasta ZT 8 = 16:00 h momento en el cual los animales fueron devueltos a sus cajas hogar para un periodo de recuperación de 4 h (barra azul, últimas 4 h de la fase de luz (ZT 8–ZT 12)). C) Diseño experimental de los grupos 1 y 2, destinados al análisis de proteínas hipocampales mediante Western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF). Los animales fueron sacrificados ya sea inmediatamente después de la RS (ZT 8, grupo 1) o tras un periodo de recuperación de 4 h (ZT 12, grupo 2). D) Diseño experimental del grupo 3, utilizado para el análisis de la actividad eléctrica hipocampal. Los animales fueron implantados con electrodos en la región CA1 del hipocampo (barra naranja) antes del inicio del protocolo de RS, se les permitió una semana de recuperación postquirúrgica (barra azul), y los potenciales de campo locales (PCL) se registraron de forma basal antes de la RS y durante las últimas 4 h del periodo de recuperación (ZT 8 – ZT 12, grupo 3). E) Diseño experimental del grupo 4, destinado a las pruebas conductuales. La prueba de reconocimiento de objeto nuevo (RON) y la prueba de localización de objeto (LO) se realizaron en el día 11, tras completar el protocolo de RS y después del último periodo de recuperación de 4 h.

sus cajas hogar. Los animales del grupo CNT permanecieron en sus cajas hogares durante todo el protocolo. Al finalizar el periodo de recuperación, se dio eutanasia a ambos grupos de forma simultánea y se recolectaron los cerebros para IF (n = 4 por condición) o WB (n = 6 por condición); sin embargo, una rata del grupo RS murió durante el protocolo y una muestra del grupo CNT fue descartada por degradación. También se obtuvieron muestras de sangre para análisis de corticosterona; en este caso, no fue posible obtener dos muestras del grupo CNT. Se incluyeron controles pareados en el tiempo en este grupo, dado que el hipocampo presenta oscilaciones circadianas en diversos marcadores moleculares y celulares [87-92]. En este diseño, los animales fueron sacrificados ya sea inmediatamente después de la RS (ZT8, fase de luz) o tras el periodo de recuperación (ZT12, inicio de la fase activa), lo que permitió distinguir los efectos propios de la restricción de sueño de las influencias circadianas (Figura 10.3. B y C).

10.3.3. Tercer grupo: registro de potenciales de campo locales hipocampales

El tercer grupo estuvo compuesto por 6 ratas implantadas con electrodos en el área CA1 del hipocampo para el registro de los PCL. El registro basal se realizó en el día 7 posterior a la cirugía, entre las 16:00 y 20:00 h, coincidiendo con el periodo de descanso utilizado posteriormente en el protocolo de RS. Después de los registros de PCL, se inició el protocolo MPMM durante 10 días consecutivos. Un segundo registro se efectuó durante las 4 horas de recuperación del día 10. En este diseño, cada animal sirvió como su propio control, permitiendo comparaciones pareadas de la actividad

hipocampal antes y después de la RS. Esta estrategia redujo la variabilidad interindividual y evitó las complicaciones técnicas asociadas al mantenimiento de electrodos en animales emparejados expuestos al agua durante la fase de restricción (Figura 10.3. D).

10.3.4. Cuarto grupo: evaluación de memoria declarativa dependiente de hipocampo después de las últimas 4 h de descanso

El cuarto grupo consistió en 34 ratas utilizadas para pruebas de memoria declarativa. Veinte animales fueron evaluados con la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON; grupo CNT, n = 10 y grupo RS, n = 10); una rata del grupo RS fue excluida por haber salido de la caja durante la prueba. Catorce animales adicionales fueron evaluados en la prueba de localización de objeto (LO; grupo CNT, n = 8, grupo RS n = 6); se excluyó el análisis conductual de una rata por grupo debido a registros de video incompletos (Figura 10.3. E).

10.4. Inmunofluorescencia

Se dio eutanasia a las ratas de los grupos 1 y 2 mediante la administración intraperitoneal de una sobredosis de pentobarbital sódico (Aranda, 200 mg/kg). Una vez alcanzada una anestesia profunda y justo antes del paro cardíaco, se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina al 0.9% durante 5 minutos (15 mL/min), enseguida, se realizó la perfusión con paraformaldehído (PFA) al 4% frío en buffer fosfato salino (PBS) durante 5 minutos. Los cerebros fueron extraídos, posfijados en PFA al 4% (a temperatura ambiente con agitación constante) durante 48 horas y posteriormente crioprotegidos en una solución de sacarosa al 30% con azida de sodio al 0.05% en PBS, a 4 °C, hasta su procesamiento. Se realizaron cortes coronales seriados de 30 µm de espesor del hipocampo (Bregma -2.52 mm a -3.24 mm, según Paxinos & Watson, 2007), utilizando un crióstato Leica CM1850 UV. Los cortes fueron recolectados en solución crioprotector y almacenados a 4 °C hasta su procesamiento para inmunofluorescencia (IF). Para cada animal, se seleccionaron cuatro cortes que contenían el hipocampo dorsal bilateral. Estos fueron preincubados durante 10 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% para bloquear la actividad de peroxidasas endógenas. Luego de un lavado en PBS, los cortes fueron incubados durante la noche a temperatura ambiente, bajo agitación constante, con los siguientes anticuerpos primarios: IBA-1 (Abcam, ab5076, 1:1000) y sinaptofisina (Sin; Santa Cruz Biotechnology, sc-17750, 1:2000). Al día siguiente, las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas durante 2 horas con los anticuerpos secundarios: anti-cabra conjugado con CY3 (Jackson ImmunoResearch, 705-165-147, 1:500) y anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, 715-545-150, 1:500).

Posteriormente, los cortes fueron lavados nuevamente con PBS y montados en portaobjetos recubiertos con gelatina. Tras el secado, se incubaron durante 10 minutos con solución de DAPI (Invitrogen, 4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato, D1306, 1 µg/mL) y se cubrieron con medio de montaje antifotoblanqueo para fluorescencia (Abcam, ab104135).

10.5. Análisis de la expresión de Sin e IBA-1 y análisis morfológicos para las células IBA-1+ del hipocampo

Se adquirieron micrografías confocales (20x) de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (3–4 campos por animal) utilizando un microscopio confocal ZEISS LSM 880. El análisis cuantitativo de la densidad óptica por corte se realizó con el software de libre acceso FIJI [93]. Dado que las imágenes contenían exclusivamente las regiones de interés, no fue necesario trazar regiones de interés adicionales; la DO se midió en toda la imagen completa. Los datos se expresan como porcentaje de DO normalizado respecto al grupo control, tanto para la inmunofluorescencia de Sin como para IBA-1. Para determinar el número de células IBA-1⁺, se analizaron de 3 a 4 micrografías de las regiones CA1 y CA3 por animal. Las células fueron contadas con base en los siguientes criterios: (1) se incluyeron únicamente células completas, y (2) se requirió la presencia simultánea de señal DAPI e IBA-1. En el análisis morfológico de células IBA-1⁺, se evaluaron 3–4 micrografías por región por animal. Se aplicó una cuadrícula de 10 x 10 en FIJI, y se seleccionaron 3 células aleatorias por región utilizando la función de aleatorización de Excel. Cada célula seleccionada fue recortada y procesada mediante un script estandarizado para generar imágenes. Las

imágenes se convirtieron a escala de grises de 8 bits, se aplicaron filtros para mejorar el contraste y eliminar el fondo, y posteriormente se transformaron a formatos binario y “esqueletonizado”. Este procesamiento fue realizado de forma independiente por dos investigadores ciegos a las condiciones experimentales. El análisis de Sholl se llevó a cabo en las imágenes binarias utilizando el complemento de *Neuroanatomy* de FIJI, con el fin de caracterizar la arborización glial. Se trazaron círculos concéntricos separados por 5 μm desde el soma, y se cuantificaron las intersecciones de los procesos celulares con dichas circunferencias [94]. El número de ramificaciones se evaluó en las imágenes “esqueletonizadas” mediante el complemento *Skeleton* de FIJI.

10.6. Western blot

Ya sea inmediatamente después del protocolo de restricción de sueño o tras 4 horas de sueño de recuperación, los animales fueron decapitados. Los hipocampos de los grupos CNT y con restricción de sueño RS fueron disecados y almacenados a -80°C hasta su procesamiento. El tejido fue homogeneizado en un amortiguador de lisis NP-40 suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y las muestras fueron centrifugadas a 13,500 rpm durante 10 minutos a 4°C . El sobrenadante fue recolectado y la concentración proteica fue determinada por espectrofotometría a 280 nm (Epoch BioTek). Para la inmunodetección, se separaron 50 μg de proteína en geles de SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% (p/v) en PBS con Tween 20 durante 45 minutos. Las membranas se incubaron toda

la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-sinaptofisina (Sin; Santa Cruz Biotechnology, sc-17750, 1:1000), anti-ERK (Cell Signaling, cat. 4695, 1:2000), anti-fosfo-ERK (Santa Cruz Biotechnology, sc-101760, 1:400) y anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-69879, 1:1000). Al día siguiente, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados: anti-ratón (Jackson ImmunoResearch, 715-065-150, 1:2000) o anti-conejo (Jackson ImmunoResearch, 711-065-152, 1:2000), seguidos por amplificación de la señal mediante el complejo avidina–biotina (Vectastain Elite ABC-HRP Kit, PK-6100, 2.5:1000). Las señales fueron visualizadas mediante un sistema de detección por quimioluminiscencia (Bio-Rad, 1705060). El análisis semicuantitativo se realizó utilizando la herramienta *Gel Analyzer* del software FIJI. La densidad óptica de β -actina se utilizó como control de carga para la normalización. La expresión proteica se calculó como la razón entre la proteína blanco y β -actina o para la expresión de la cinasa regulada por señales extracelulares se utilizó la razón pERK/ERK. Los cambios relativos se determinaron en función del grupo CNT (establecido en 1).

10.7. Registro y análisis de los potenciales de campo locales del hipocampo

Los PCL ofrecen una medida confiable de la actividad eléctrica cerebral [4, 5]. Para evaluar los efectos de la restricción de sueño (RS) sobre la función hipocampal, seis ratas macho fueron implantadas con un electrodo de registro mediante cirugía estereotáxica. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (90/10 mg/kg, i.p.) y posicionados en un aparato estereotáxico. Tras la exposición de Bregma, se implantó un electrodo de registro de acero inoxidable en la región CA1

dorsal izquierda del hipocampo utilizando las siguientes coordenadas: AP = -3.8 mm; L = 2.0 mm; V = 3.0 mm. La localización representativa del electrodo se muestra en la Figura 10.7. Se fijaron dos tornillos de acero inoxidable al cráneo: uno por encima de la duramadre de la corteza motora derecha (tierra monopolar indiferente) y otro en el hueso occipital izquierdo (para fijación). Los electrodos se conectaron a un conector micro-USB de 5 pines y se aseguraron con acrílico dental. La herida fue tratada con gentamicina tópica (0.3%) y suturada. Durante el periodo de recuperación, los animales fueron alojados individualmente en cajas de acrílico. Durante los tres primeros días postoperatorios, las ratas recibieron enrofloxacin (5 mg/kg, i.p., cada 24 h). Se obtuvieron dos registros de PCL por animal. El primero se realizó en el día 7 postquirúrgico, entre las 16:00 y 20:00 h, y sirvió como línea base. Esta ventana horaria coincidió con el periodo de descanso de 4 horas que posteriormente se aplicó en el protocolo de RS. Al día siguiente, las seis ratas comenzaron el protocolo MPM durante 10 días consecutivos. El segundo registro se obtuvo durante el periodo de recuperación de 4 h al final del protocolo de restricción. De este modo, cada animal funcionó como su propio control, lo que permitió minimizar la variabilidad y evitar los desafíos técnicos de mantener electrodos funcionales en animales apareados bajo condiciones de restricción con agua. Para los registros de PCL, las ratas fueron colocadas en cajas de acrílico (30 x 22 x 22 cm) y conectadas a un sistema de adquisición de video-PCL (BE Light, EB Neuro S.p.A., Florencia, Italia) mediante cables flexibles que permitían el libre movimiento. Los datos fueron muestreados a 256 Hz, con un filtro paso bajo a 0.3 Hz y paso alto a 70 Hz, utilizando el software Galileo

NT (EB Neuro, Italia). El análisis de la potencia relativa por bandas de frecuencia se realizó automáticamente mediante la Transformada Rápida de Fourier.

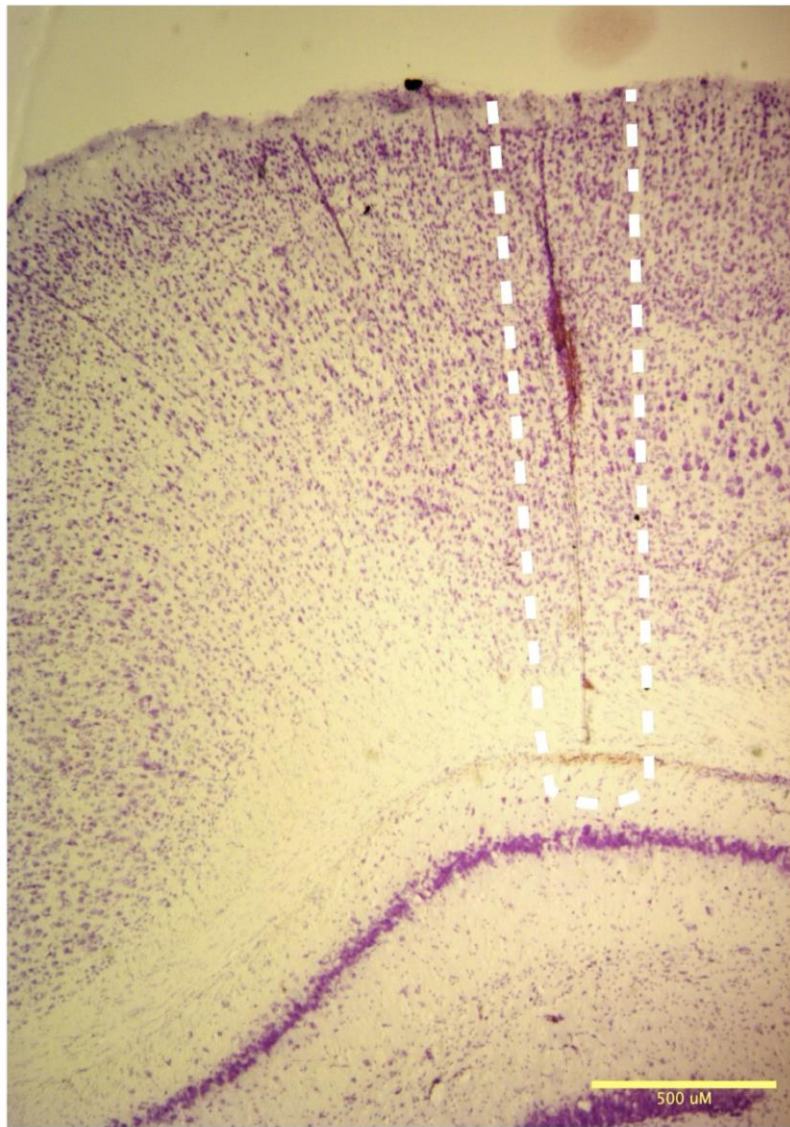


Figura 10.7. Sitio de implantación del electrodo en el hipocampo de los animales sometidos a RS.

Micrografía representativa de la región CA1 del hipocampo dorsal izquierdo observada mediante Nissl. El electrodo de registro está delimitado por las líneas punteadas.

10.8. Pruebas conductuales de reconocimiento de objeto novedoso y reconocimiento de localización de objeto

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON) y la prueba de localización de objeto (LO) son paradigmas ampliamente utilizados para evaluar la memoria declarativa dependiente del hipocampo [95, 96]. En este estudio se emplearon ambas pruebas con el objetivo de determinar los efectos de la restricción de sueño sobre este tipo de memoria. Para la prueba RON, 20 ratas fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos: animales control (CNT, $n = 10$), que permanecieron en sus cajas hogar durante los 10 días del protocolo de RS, y animales sometidos a la restricción de sueño (RS, $n = 10$; un animal fue excluido tras escapar del área de prueba durante los ensayos). Para la OL se utilizaron 14 ratas (CNT, $n = 8$; RS, $n = 6$); un animal de cada grupo fue excluido debido a grabaciones de video incompletas. Después del periodo final de RS, los animales del grupo RS regresaron a sus cajas hogar para el periodo de oportunidad para dormir de 4 h. Posteriormente, se realizó la prueba RON o la LO a las 20:00 h, coincidiendo con el inicio de la fase oscura (fase activa). Las pruebas no se realizaron inmediatamente después de la RS, ya que experimentos piloto indicaron que los animales tendían a quedarse dormidos en lugar de explorar los objetos (datos no mostrados). Las pruebas conductuales se realizaron en una caja abierta de madera de 45 x 45 x 45 cm (sin tapa) y constaron de tres fases: habituación, entrenamiento y prueba. Para minimizar la alteración del ciclo luz/oscuridad, todas las sesiones se realizaron bajo luz roja tenue. Las fases de habituación y entrenamiento fueron idénticas para ambas pruebas:

10.8.1. Habitación

Las ratas fueron trasladadas al cuarto de pruebas conductuales en sus propias cajas hogar y se dejaron en reposo durante 1 h para aclimatarse. Luego, cada rata fue colocada durante 5 minutos en una de dos cajas paralelas vacías para habituarse al entorno (un animal CNT y uno RS simultáneamente), antes de ser devuelta a su caja.

10.8.2. Entrenamiento

Una hora después, se colocaron dos objetos idénticos (ya sea un vaso de precipitados de vidrio de 100 mL invertido o un frasco de tinción Coplin de 60 mL; objetos A y A', respectivamente) en esquinas opuestas en diagonal dentro de la caja de prueba. Los animales pudieron explorar los objetos durante 5 minutos antes de regresar a sus cajas (Figura 10.8. A y C).

10.8.3. Prueba RON

Una hora después del entrenamiento, los animales fueron colocados nuevamente en la caja de prueba, esta vez con un objeto familiar (A) y un objeto nuevo (B, un objeto de vidrio de tamaño similar, pero de forma diferente al familiar). Ambos objetos se colocaron en las mismas ubicaciones usadas durante el entrenamiento. La exploración se permitió durante 5 minutos (Figura 10.8. B).

10.8.4. Prueba LO

Una hora después del entrenamiento, los animales fueron colocados en la caja de prueba con los mismos dos objetos idénticos utilizados en el entrenamiento. Uno de los objetos (A) permaneció en su ubicación original, mientras que el otro (A') fue reubicado a una nueva localización. La exploración también duró 5 minutos (Figura 10.8. D).

Todos los ensayos fueron videograbados para su análisis posterior. Los tiempos de exploración fueron evaluados por dos investigadores independientes en ciego a las condiciones experimentales. El porcentaje de tiempo de exploración durante el entrenamiento se calculó como:

" $TA'/(TA' + TA) \times 100$ ", donde TA' es el tiempo de exploración del objeto A' y TA el del objeto A.

En las pruebas, el porcentaje de exploración se calculó como:

" $TB/(TB + TA) \times 100$ ", donde TB corresponde al tiempo de exploración del objeto nuevo (RON) o reubicado (LO), y TA al del objeto familiar (RON) o no reubicado (LO).

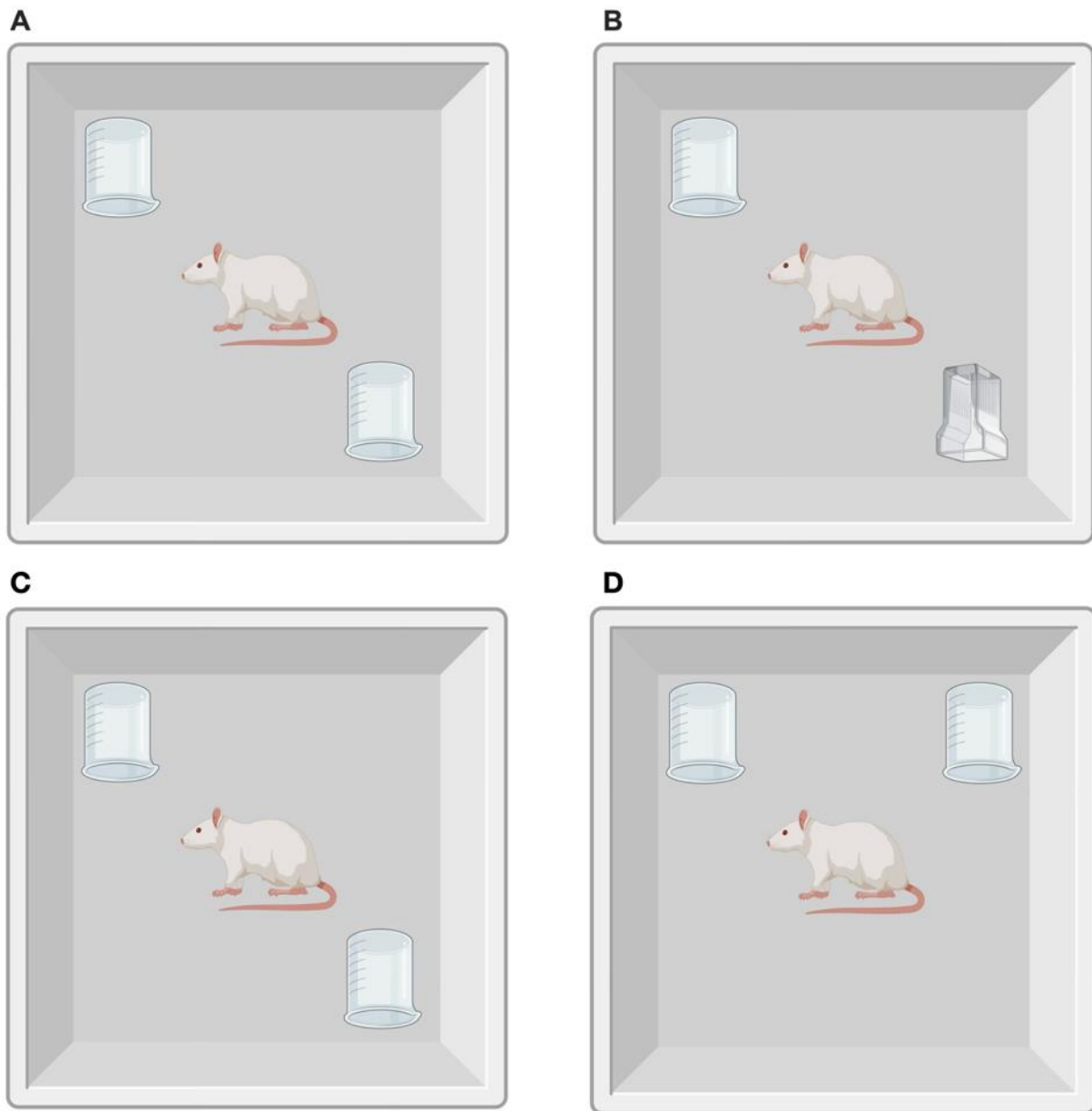


Figura 10.8. Pruebas conductuales reconocimiento de objeto novedoso y reconocimiento de localización de objeto.

Disposición de los objetos empleados en el entrenamiento para A) la prueba de reconocimiento de objetos novedoso RON y C) la prueba de localización de objeto LO. Disposición de los objetos durante la C) prueba RON y D) prueba LO.

10.9. Ensayo radioinmunológico para la detección de corticosterona

Las muestras de sangre de los animales eutanasiados fueron recolectadas en microtubos de 2.5 mL y centrifugadas a 11,700 rpm durante 15 minutos. El plasma fue alicuotado (60 µL) y almacenado a –80 °C hasta su análisis. Las concentraciones de corticosterona se determinaron utilizando el kit *Corticosterone Double Antibody RIA Kit* (MP Biomedicals, cat. 07120102), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En resumen, las muestras de plasma y los estándares de la curva se diluyeron 1:400 con el amortiguador RIA (PBS 50 mM con 0.1% de gelatina). Posteriormente, se añadió el trazador de corticosterona marcado con I¹²⁵ y el anticuerpo anti-corticosterona, y las muestras se incubaron durante 16 horas a 4 °C. Después de la incubación, se agregó solución precipitante y un volumen igual de polietilenglicol a cada muestra, las cuales se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y la radiactividad en el pellet fue cuantificada utilizando un contador gamma *Genesys* (LTI Laboratory Technologies). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, y las concentraciones de corticosterona en sangre se expresaron en ng/µL.

10.10. Análisis Estadístico

La normalidad de la distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de *Shapiro–Wilk*. Se aplicaron análisis paramétricos cuando los datos cumplieron con el supuesto de normalidad. Las pruebas conductuales, la densidad óptica de IBA-1 y el número de células IBA-1+ se analizaron con la *prueba t de Student para muestras independientes*. El número de ramificaciones inmediatamente después de la restricción se analizó con

la misma prueba, mientras que el número de intersecciones se evaluó con *ANOVA de dos vías*, seguido de la prueba post hoc de *Sidak*. Los datos paramétricos se presentan como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Cuando los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad, se utilizaron pruebas no paramétricas. Específicamente, el número de ramificaciones tras 4 h de descanso se analizó mediante la prueba *U* de *Mann–Whitney*. Los potenciales de campo locales hipocampales se analizaron con la *prueba t de Student*, excepto la potencia espectral total, que se evaluó mediante la prueba de rangos de *Wilcoxon*. Los datos no paramétricos se presentan como la mediana con rango. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *Prism 10 (GraphPad Software)*, y el nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0.05^{**}$. Los valores atípicos fueron identificados y excluidos mediante la *prueba de Grubb* con un valor alfa de 0.05.

11.RESULTADOS

11.1. Diez días de restricción de sueño inducen cambios específicos en la inmunorreactividad de IBA-1 y en la morfología microglial en el hipocampo

Dado que diferentes protocolos de privación o restricción de sueño inducen alteraciones en la expresión de numerosos marcadores de macrófagos/microglía [83, 97], evaluamos la IR de IBA-1 en el hipocampo al final del último período de restricción del MPMM, así como en el último período de 4 h de recuperación de sueño. En la región CA1 (Figura 11.1. A), los animales sometidos a restricción de sueño mostraron un aumento significativo de la IR de IBA-1 inmediatamente después de la restricción en comparación con el grupo CNT (prueba t de Student, $t = 3.046$, $df = 6$, $p = 0.0226$; Figura 11.1. B). En la región CA3, no se observaron diferencias en la IR (prueba t de Student, $t = 1.087$, $df = 6$, $p = 0.3186$; Figura 11.1 I). Cabe destacar que el incremento en la IR de IBA-1 en CA1 no se asoció con cambios en el número de células IBA-1⁺ (prueba t de Student, $t = 0.1823$, $df = 6$, $p = 0.4307$; Figura 11.1. C). En contraste, la región CA3 mostró un incremento significativo en el número de células IBA-1⁺ (prueba t de Student, $t = 3.698$, $df = 6$, $p = 0.0051$; Figura 11.1. J), pese a que no hubo cambios en la IR entre los grupos CNT y RS. El análisis *skeleton* reveló una reducción en el número de ramas en CA1 de ratas RS (prueba de Mann–Whitney, $U = 111.5$, $p = 0.0142$; Figura 11.1 F). Asimismo, el análisis de Sholl en CA1 indicó que las células IBA-1⁺ de ratas RS presentaron significativamente menos intersecciones que las del grupo CNT (ANOVA de dos vías, $F[1,40] = 4.706$, $p = 0.0360$; Figura 11.1.G), con diferencias significativas a los 15.4 μm ($p = 0.0271$) y 20.4 μm ($p = 0.0001$), lo que

sugiere que 10 días de restricción de sueño provocan cambios morfológicos en la microglía/macrófagos promoviendo procesos más cortos y menos ramificados en CA1. En contraste, las células IBA-1⁺ en CA3 no presentaron cambios ni en el número de ramas (Mann–Whitney $U = 281.5$, $p = 0.2891$; Figura 11.1. M) ni en el número de intersecciones (ANOVA de dos vías, $F[1,49] = 1.579$, $p = 0.2148$; Figura 11.1. N) tras la restricción. En conjunto, los análisis de IR y morfología de IBA-1 en CA1 y CA3 demuestran que la restricción de sueño altera la expresión de IBA-1 y la morfología microglial en el hipocampo de manera específica según la región.

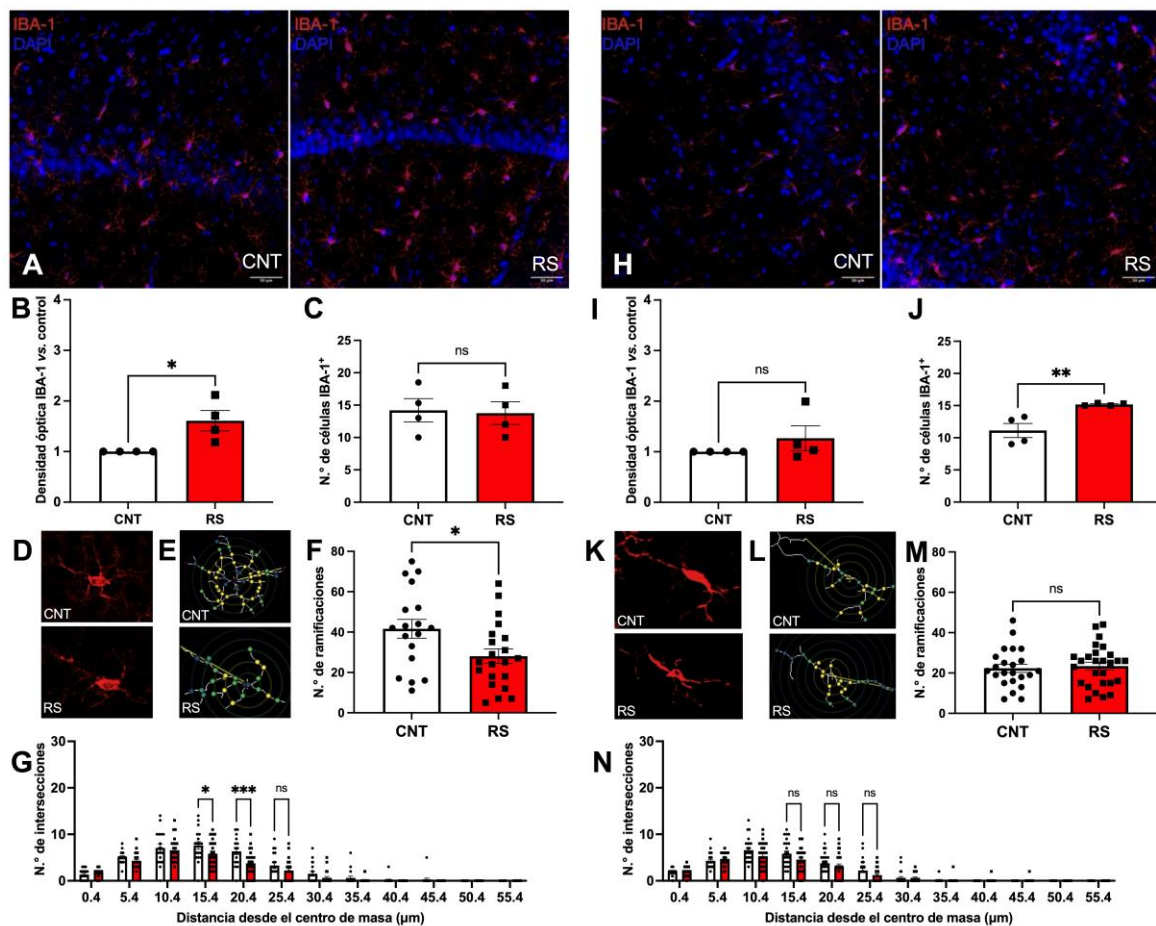


Figura 11.1. Diez días de restricción de sueño alteran el número y la morfología de las células positivas para IBA-1 en el hipocampo.

A) Imágenes representativas de células positivas para IBA-1 (IBA-1⁺, rojo) y núcleos celulares (DAPI, azul) en la región CA1 de animales control (CNT) y con restricción de sueño (RS). Barra de escala: 50 μm. B) Densidad óptica de la inmunorreactividad (IR) de IBA-1 en CA1 para animales CNT (barras blancas) y RS (barras rojas). C) Número de células IBA-1+DAPI positivas en CA1. D) Imágenes representativas de la morfología de las células IBA-1⁺ en CA1 de animales CNT y RS. E) Versiones binarias y “esqueletonizadas” de las imágenes en D. Se trazaron círculos concéntricos (separados 5 μm) alrededor del centro de masa celular; los círculos de colores indican intersecciones de ramas. F) Número de ramificaciones por célula IBA-1⁺ en CA1. G) Número de intersecciones por célula IBA-1⁺ en CA1. H) Imágenes representativas de células IBA-1⁺ y núcleos celulares en CA3. Barra de escala: 50 μm. I) Densidad óptica de la IR de IBA-1 en CA3. J) Número de células IBA-1+DAPI positivas en CA3. K) Imágenes representativas de células IBA-1⁺ en animales CNT y RS. L) Versiones binarias y “esqueletonizadas” de las imágenes en K. L) Círculos concéntricos alrededor del centro de masa celular. M) Número de ramificaciones por célula IBA-1⁺ en CA3. N) número de intersecciones por célula IBA-1⁺ en CA3. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar (SEM), excepto para el número de

ramificaciones, que se presenta como mediana con rango. Análisis estadístico: la densidad óptica, el número de células IBA-1⁺ y el número de intersecciones se analizaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes; el número de ramificaciones se analizó con la prueba de Mann–Whitney. El análisis de intersecciones de Sholl se realizó mediante ANOVA de dos vías. Los asteriscos indican significancia estadística: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

11.2. La inmunorreactividad de IBA-1 en el hipocampo se restablece parcialmente tras 4 h de descanso, aunque la morfología microglial permanece alterada

Posteriormente, evaluamos la IR y la morfología de las células IBA-1⁺ tras el último periodo de 4 h de oportunidad para dormir. En CA1, no se encontraron diferencias en la IR de IBA-1 entre los grupos CNT y RS (prueba t de Student, $t = 1.269$, $df = 6$, $p = 0.1258$; Figura 11.2. B) ni en el número de células IBA-1⁺ (prueba t de Student, $t = 0.5595$, $df = 6$, $p = 0.2980$; Figura 11.2. C). De forma similar, en CA3 no se observaron diferencias en la IR de IBA-1 (prueba t de Student, $t = 1.689$, $df = 6$, $p = 0.0711$; Figura 11.2. I). Sin embargo, en contraste con el aumento observado inmediatamente después de la restricción, el número de células IBA-1⁺ en CA3 fue menor en las ratas RS comparadas con los CNT tras 4 h de descanso (prueba t de Student, $t = 2.395$, $df = 6$, $p = 0.0268$; Figura 11.2. J). Los análisis morfológicos revelaron alteraciones persistentes a pesar del descanso. El análisis *skeleton* mostró que las células IBA-1⁺ en CA1 de ratas RS aún presentaban menor número de ramificaciones en comparación con los controles (Mann–Whitney $U = 320.5$, $p = 0.0220$; Figura 11.2. F). Del mismo modo, en CA3 las células IBA-1⁺ también exhibieron una reducción significativa de ramificaciones tras la restricción (Mann–

Whitney $U = 461.5$, $p < 0.0001$; Figura 11.2. M). El análisis de Sholl confirmó estos resultados: en CA1, las células IBA-1⁺ de ratas RS presentaron significativamente menos intersecciones que los controles tras 4 h de descanso (ANOVA de dos vías, $F[1,61] = 11.29$, $p = 0.0014$; Figura 11.2. G). De manera similar, en CA3 se observó una reducción pronunciada en el número de intersecciones comparado con los animales CNT (ANOVA de dos vías, $F[1,73] = 29.28$, $p < 0.0001$; Figura 11.2. N). En conjunto, estos resultados indican que, aunque la IR de IBA-1 en el hipocampo muestra una recuperación parcial tras un breve periodo de descanso, la morfología microglial continúa alterada, lo que sugiere que 4 h de sueño no son suficientes para normalizar los cambios estructurales inducidos por la restricción subcrónica de sueño.

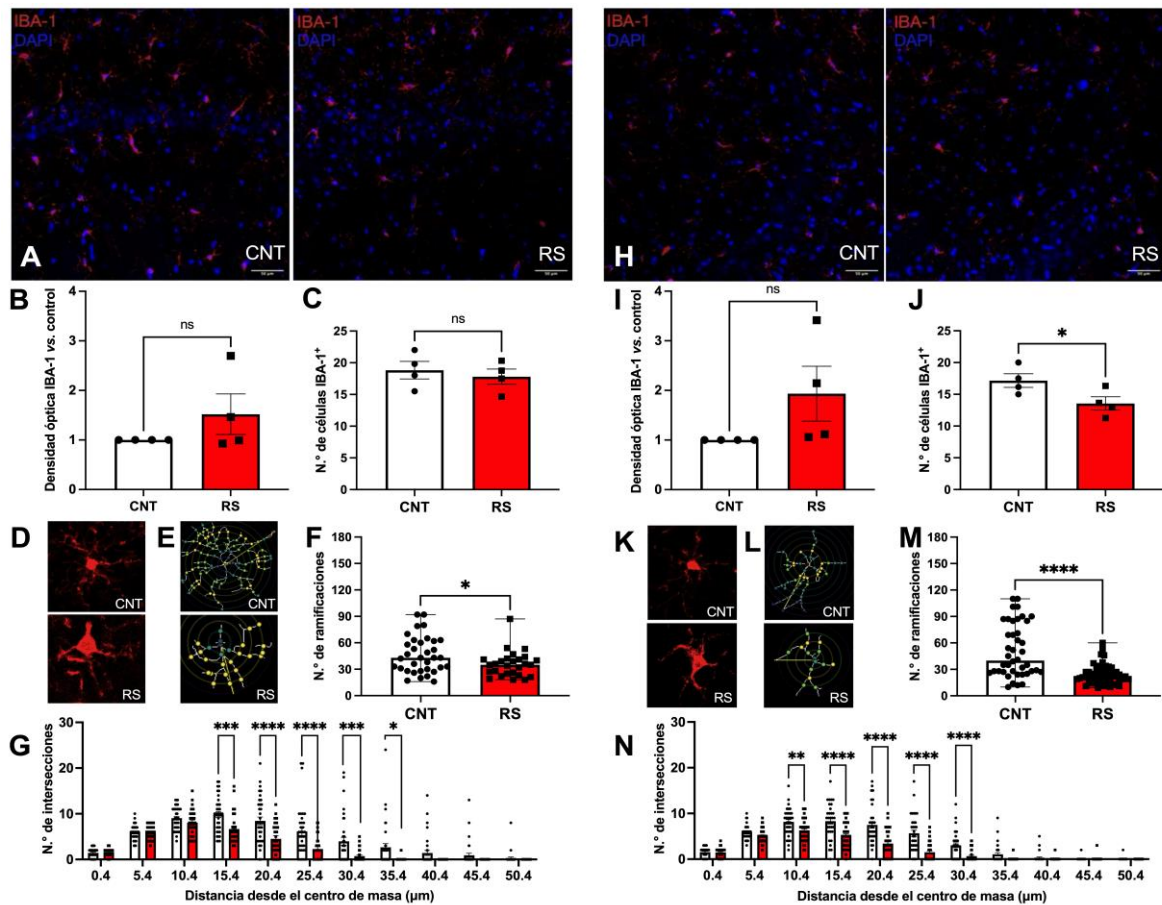


Figura 11.2. Las alteraciones en las células positivas para IBA-1 del hipocampo persisten después de 4 h de descanso tras 10 días de restricción de sueño.

A) imágenes representativas de células positivas para IBA-1 (IBA-1⁺, rojo) y núcleos celulares (DAPI, azul) en la región CA1 de animales control (CNT) y restringidos de sueño (RS). Barra de escala: 50 μ m. B) Densidad óptica de la inmunorreactividad (IR) de IBA-1 en CA1. C) Número de células IBA-1+DAPI positivas en CA1. D) Imágenes representativas de la morfología de las células IBA-1⁺ en CA1 de ratas CNT y RS. E) Versiones binarias y “esqueletonizadas” de las imágenes en D. Se trazaron círculos concéntricos (separados 5 μ m) alrededor del centro de masa celular; los círculos de colores indican intersecciones de las ramificaciones. F) Número de ramificaciones por célula IBA-1⁺ en CA1. G) Número de intersecciones de las células IBA-1⁺ de CA1. H) Imágenes representativas de células IBA-1⁺ y núcleos celulares en CA3. Barra de escala: 50 μ m. I) Densidad óptica de la IR de IBA-1 en CA3. J) Número de células IBA-1+DAPI positivas en CA3. K) Imágenes representativas de células IBA-1⁺ de ratas CNT y RS. L) Versiones binarias y “esqueletonizadas” de las imágenes en K, con círculos concéntricos alrededor del centro de masa celular; los círculos de colores indican intersecciones de las ramificaciones. M) Número de ramificaciones por célula IBA-1⁺ en CA3. N) Número de intersecciones de las células IBA-1⁺ de CA3. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar (SEM),

excepto el número de ramificaciones, que se presenta como la mediana con rango. La densidad óptica, el número de células IBA-1⁺ y las intersecciones se analizaron mediante pruebas t de Student no apareadas; el número de ramificaciones se analizó mediante la prueba de Mann–Whitney; las intersecciones se evaluaron mediante ANOVA de dos vías. Los asteriscos indican significancia estadística: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

11.3. La inmunorreactividad de la sinaptofisina en el hipocampo permanece reducida incluso tras 4 h de descanso

Las alteraciones en la IR de IBA-1 han sido asociadas a disfunción microglial. Estudios previos han evidenciado que, tras la RS, la microglía del SNC incrementa la fagocitosis de proteínas sinápticas [62] . Para evaluar si los cambios observados en IBA-1 podrían estar vinculados a alteraciones en la densidad sináptica, analizamos la expresión de la proteína de vesícula presináptica sinaptofisina (Sin). El análisis de WB de homogenados hipocámpales no reveló diferencias significativas en la expresión de Sin entre los grupos CNT y RS, inmediatamente después de la restricción (t de Student, $t = 1.402$, $df = 9$, $p = 0.1946$; Figura 11.3.1. B), ni tras 4 h de recuperación (t de Student, $t = 0.1018$, $df = 8$, $p = 0.9215$; Figura 11.3.2. B). Sin embargo, dado que los homogenados representan el hipocampo completo, evaluamos específicamente la expresión de Sin en CA1 y CA3 mediante inmunofluorescencia (IF). Encontramos que inmediatamente después de la restricción de sueño, la IR de Sin se redujo significativamente en ratas RS respecto al grupo CNT, tanto en CA1 (prueba t de Student, $t = 5.671$, $df = 5$, $p = 0.0024$; Figura 11.3.1. D) como en CA3 (prueba t de Student, $t = 4.950$, $df = 6$, $p = 0.0026$; Figura 11.3.1. F). Importante, la IR de Sin permaneció reducida incluso tras 4 h de descanso. Las ratas RS continuaron

mostrando niveles significativamente menores de Sin en CA1 (prueba t de Student, $t = 7.563$, $df = 6$, $p = 0.0001$; Figura 11.3.2. D) y CA3 (prueba t de Student, $t = 2.068$, $df = 6$, $p = 0.0420$; Figura 11.3.2. F) en comparación con los controles. En conjunto, estos hallazgos indican que la restricción de sueño induce una reducción persistente en la expresión de sinaptofisina de forma específica en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, que no se revierte con un breve periodo de recuperación, lo cual es coherente con la alteración de la integridad presináptica.

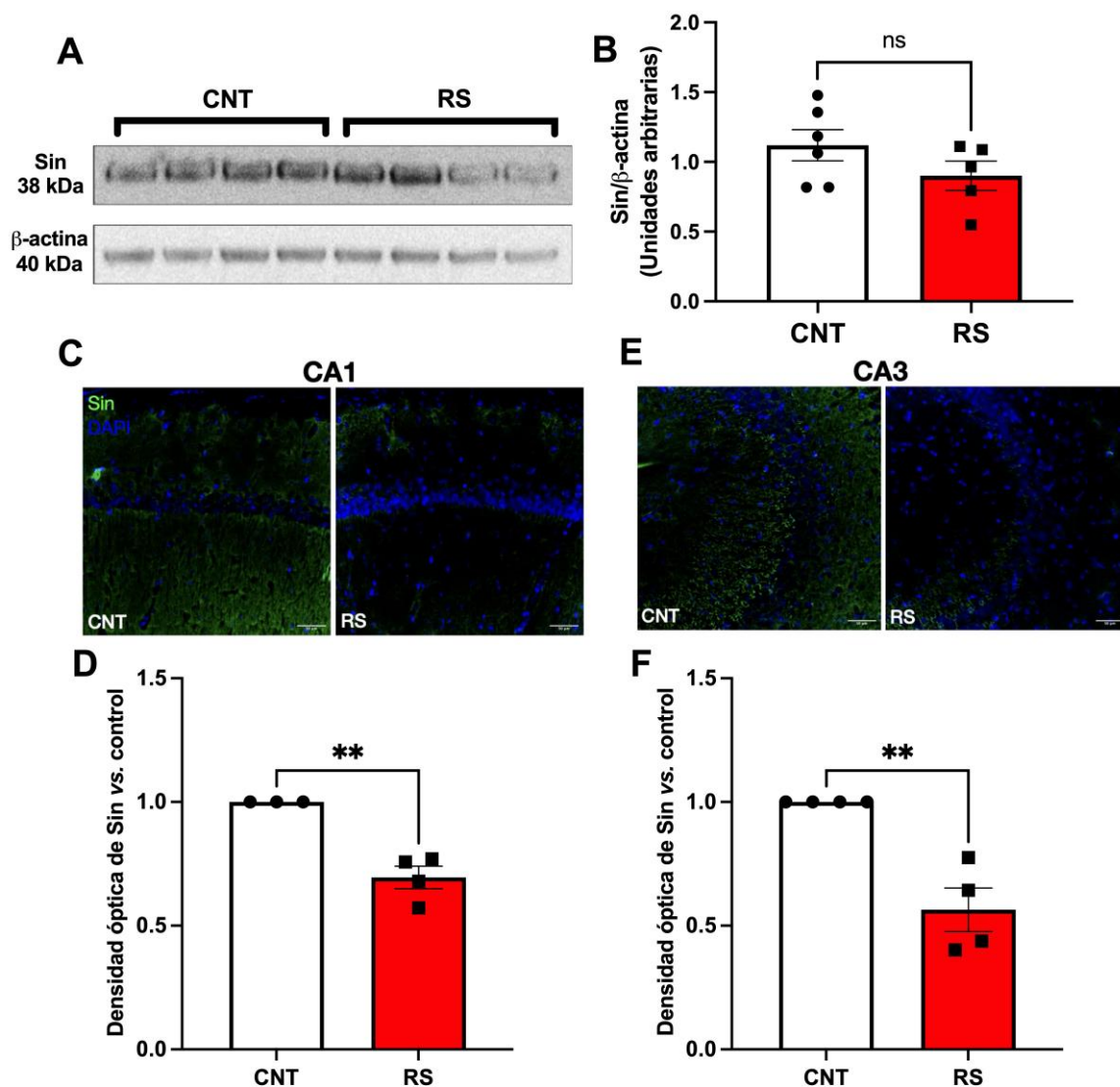


Figura 11.3.1 Diez días de restricción de sueño disminuyen los niveles de sinaptofisina en el hipocampo.

A) Inmunoblot representativo de sinaptofisina (Sin, 38 kDa) y β-actina (40 kDa) en animales control (CNT) y con restricción de sueño (RS). B) Cociente de la densidad óptica de Sin y β-actina en animales CNT (barras blancas) y RS (barras rojas). C) Imágenes representativas de inmunofluorescencia (IF) de Sin (verde) y núcleos celulares (DAPI, azul) en la región CA1 de ratas CNT y RS. Barra de escala: 50 μm. D) Cuantificación de la densidad óptica de Sin en CA1. E) Imágenes representativas de IF de Sin y núcleos celulares en la región CA3. Barra de escala: 50 μm. F) Cuantificación de la densidad óptica de Sin en CA3. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas t de Student no apareadas. Los asteriscos indican significancia estadística: **p < 0.01.

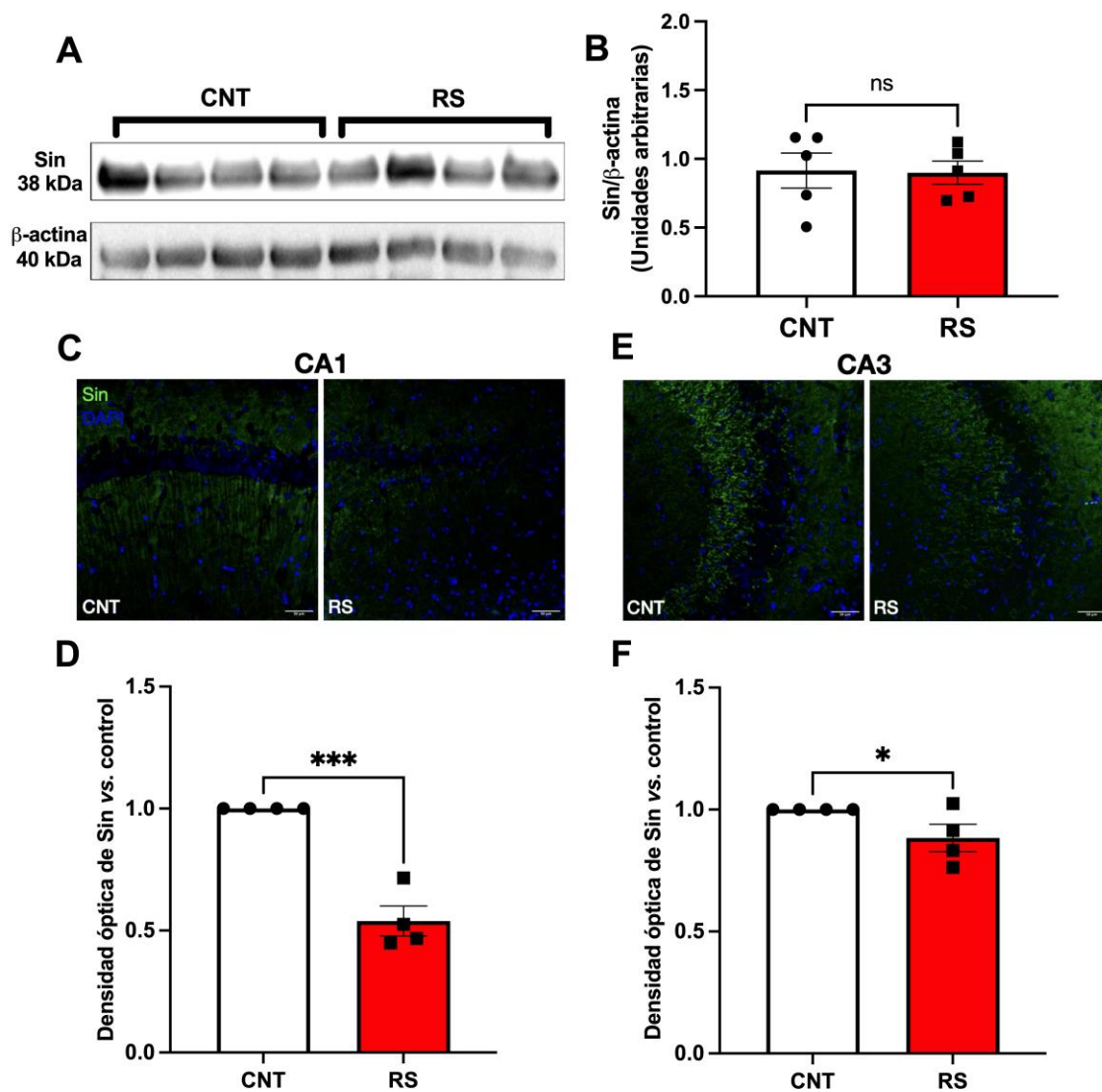


Figura 11.3.2. La disminución de los niveles de sinaptofisina en el hipocampo inducida por 10 días de restricción de sueño persiste después de 4 horas de descanso.

A) Inmunoblot representativo de sinaptofisina (Sin, 38 kDa) y β -actina (40 kDa) en animales control (CNT) y con restricción de sueño (RS). B) Cociente de la densidad óptica Sin y β -actina en animales CNT (barras blancas) y RS (barras rojas). C) Imágenes representativas de inmunofluorescencia (IF) de Sin (verde) y núcleos celulares (DAPI, azul) en la región CA1 de ratas CNT y RS. Barra de escala: 50 μ m. D) Cuantificación de la densidad óptica de Sin en CA1. E) Imágenes representativas de IF de Sin y núcleos celulares en la región CA3. Barra de escala: 50 μ m. F) Cuantificación de la densidad óptica de Sin en CA3. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas t de Student no apareadas. Los asteriscos indican significancia estadística: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

11.4. La fosforilación de ERK aumenta tras las últimas 4 h de descanso

Dado que la expresión de Sin disminuyó tras la restricción de sueño y permaneció reducida después del breve periodo de descanso, evaluamos si la expresión y fosforilación (activación) de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) se veían afectada. ERK se ha descrito como promotor de la plasticidad sináptica hipocampal y facilitador de la inducción de la PLP, además de que una mayor fosforilación de ERK (pERK/ERK) se asocia con una mayor inmunorreactividad de sinaptofisina, reflejando una mayor formación y/o maduración sináptica [98, 99]. Basados en esta evidencia y en nuestros hallazgos sobre Sin, se planteó la hipótesis de que la proporción pERK/ERK disminuiría tras la restricción y permanecería disminuida después del descanso. Contrario a esta hipótesis, el hipocampo de ratas RS no mostró un cambio significativo en la proporción pERK/ERK inmediatamente después de la restricción respecto a los CNT (prueba t de Student, $t = 0.8952$, $df = 10$, $p = 0.3917$; Figura 11.4. B). No obstante, tras 4 h de descanso, el grupo RS exhibió un aumento significativo en la proporción pERK/ERK comparado con los controles (prueba t de Student, $t = 4.105$, $df = 7$, $p = 0.0045$; Figura 11.4. D). Estos datos sugieren que el periodo de oportunidad para dormir indujo un efecto de rebote, posiblemente compensatorio, en la activación de ERK en el hipocampo de animales previamente restringidos.

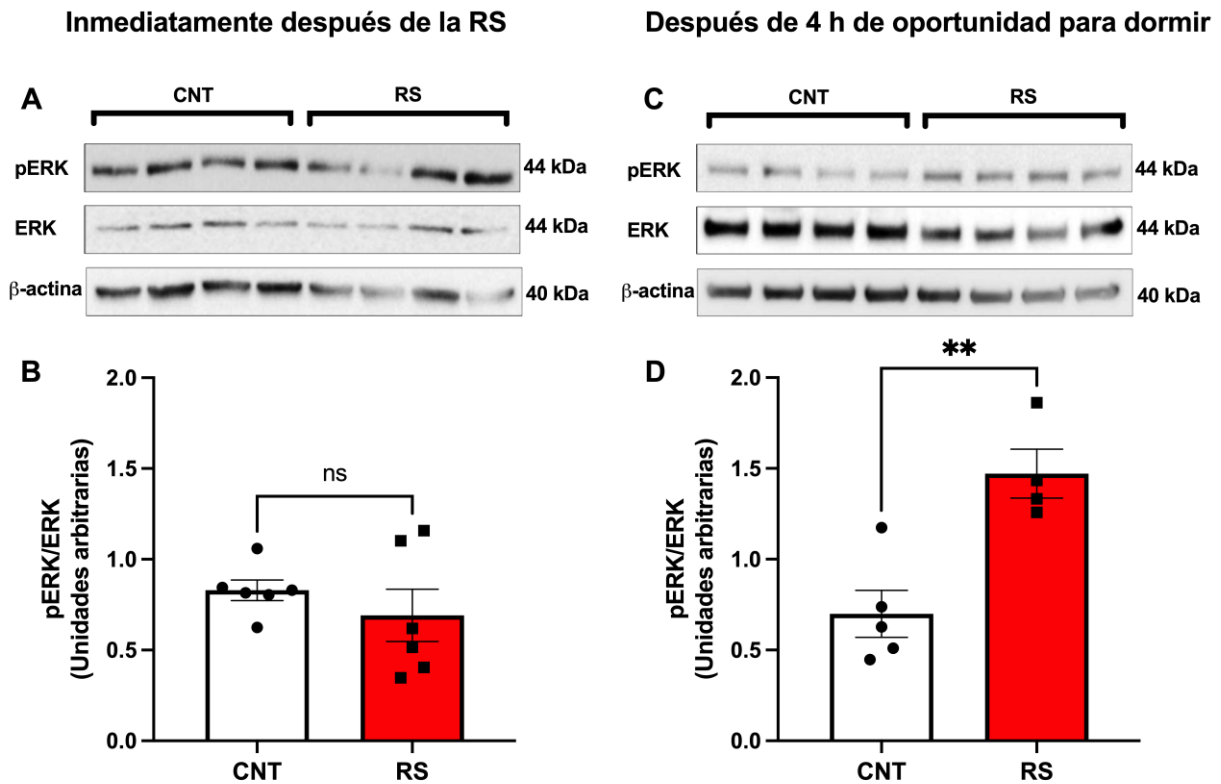


Figura 11.4. Cuatro horas de descanso después del protocolo de restricción de sueño incrementan la relación pERK/ERK en el hipocampo de los animales restringidos de sueño.

A) Inmunoblot representativo de ERK fosforilado (pERK, 42/44 kDa), ERK total (42/44 kDa) y β -actina (40 kDa) en animales control (CNT) y restringidos de sueño (RS) inmediatamente después del protocolo de RS. B) Cociente de la densidad óptica de pERK y ERK en los grupos CNT (barras blancas) y RS (barras rojas) inmediatamente después de la RS. C) Inmunoblot representativo de pERK, ERK total y β -actina en animales CNT y RS tras 4 horas de oportunidad para dormir. D) Cociente de la densidad óptica pERK/ERK en CNT y RS después de 4 horas de descanso. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas t de Student no apareadas. Los asteriscos indican significancia estadística: **p < 0.01.

11.5. La actividad eléctrica hipocampal está alterada durante las 4 h de descanso tras 10 días de RS.

Dado que la proporción pERK/ERK aumentó mientras que la IR de Sin y la morfología de las células IBA-1⁺ seguían alteradas tras 4 h de descanso, planteamos la hipótesis de que la actividad eléctrica hipocampal durante este periodo de recuperación también estaría comprometida. Para comprobarlo, implantamos un electrodo de registro en CA1, región final del circuito trisináptico donde se promueve PLP durante la consolidación de la memoria [18, 100]. La potencia espectral total en CA1 aumentó significativamente en los animales después de la RS respecto al registro basal (prueba de Wilcoxon, $W = 21$, $p = 0.0312$; Figura 11.5. B). Asimismo, la frecuencia total de la señal incrementó (prueba t de Student, $t = 6.045$, $df = 5$, $p = 0.0018$; Figura 11.5. C). El análisis de potencia relativa por bandas mostró una reducción significativa en la actividad de baja frecuencia: ondas delta (prueba t de Student, $t = 3.630$, $df = 5$, $p = 0.0151$; Figura 11.5. D) y theta (prueba t de Student, $t = 3.639$, $df = 5$, $p = 0.0149$; Figura 11.5. E). En contraste, las ondas de alta frecuencia alfa (prueba t de Student, $t = 3.394$, $df = 5$, $p = 0.0194$; Figura 11.5. F) y beta (prueba t de Student, $t = 6.580$, $df = 5$, $p = 0.0012$; Figura 11.5. G) aumentaron significativamente, mientras que la actividad gamma permaneció sin cambios (prueba t de Student, $t = 0.6334$, $df = 5$, $p = 0.5543$; Figura 11.5. H). En conjunto, estos resultados indican que la actividad eléctrica hipocampal está notablemente alterada durante las 4 h de descanso tras la restricción

subcrónica de sueño, con un desplazamiento de oscilaciones de baja frecuencia (delta/theta) hacia frecuencias más altas (alfa/beta).

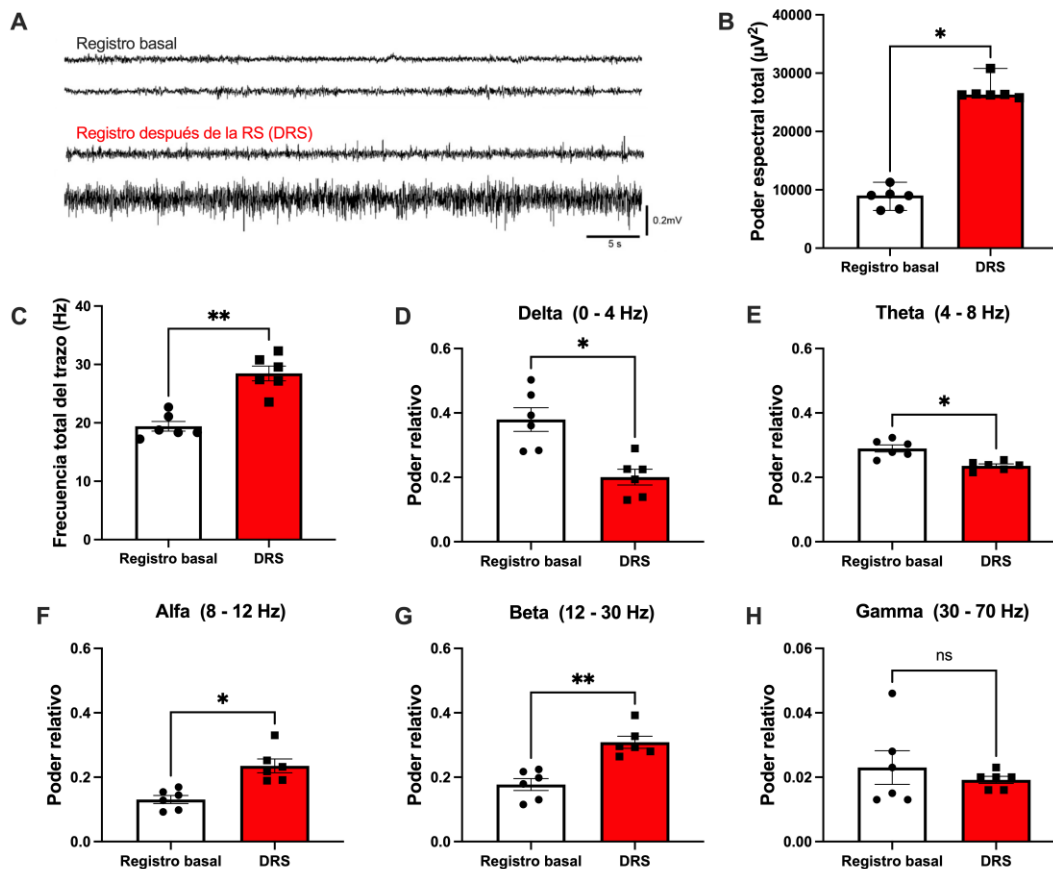


Figura 11.5. La restricción de sueño altera la actividad eléctrica del hipocampo durante el período de oportunidad para dormir de 4 h.

A) Trazos representativos de los potenciales de campo locales (PCL) del hipocampo antes del protocolo de restricción de sueño (registro basal) y durante el período de recuperación de 4 horas posterior a la restricción (DRS). B) Potencia espectral total. C) Frecuencia total del trazo para la línea base (barras blancas) y después de la RS (barras rojas). D–H) Potencia relativa de las ondas delta, theta, alfa, beta y gamma registradas durante el período de recuperación de 4 horas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de seis animales, excepto la potencia espectral total, que se presenta como mediana con rango. Los registros de PCL posteriores a la RS se compararon con los registros basales de los mismos animales. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Sidak, excepto para la potencia espectral total, que se analizó con la prueba de Wilcoxon. Los asteriscos indican significancia estadística: *p < 0.05, **p < 0.01.

11.6. La memoria declarativa se encuentra deteriorada tras 4 h de descanso después de 10 días de restricción de sueño

Habiendo observado que la actividad eléctrica en CA1 estaba alterada durante el periodo de descanso, formulamos la hipótesis de que los animales sometidos a restricción de sueño exhibirían un déficit en la memoria declarativa dependiente del hipocampo tras este periodo. Para evaluarlo, sometimos a los animales RS y sus CNT a las pruebas RON y LO. Durante la fase de entrenamiento de la prueba RON, tanto los animales CNT como los RS mostraron tiempos totales de exploración similares para los objetos A y A' (prueba t de Student, $t = 1.092$, $df = 16$, $p = 0.2910$; Figura 11.6. A), sin diferencias en el porcentaje de exploración del objeto A' (prueba t de Student, $t = 1.383$, $df = 17$, $p = 0.1845$; Figura 11.6. B). Esto indica que ambos grupos exploraron los objetos por igual durante el entrenamiento y que no hubo preferencia por ninguno. Una hora después del entrenamiento, durante la fase de prueba, los tiempos totales de exploración fueron comparables entre grupos (prueba t de Student, $t = 1.122$, $df = 17$, $p = 0.2775$; Figura 11.6. C). Sin embargo, los animales RS dedicaron significativamente menos tiempo a explorar el objeto nuevo (prueba t de Student, $t = 2.269$, $df = 17$, $p = 0.0366$; Figura 11.6. D), lo cual indica un deterioro en la memoria de reconocimiento a corto plazo. En la fase de entrenamiento de la prueba LO, no hubo diferencias entre los grupos en el tiempo total de exploración (prueba t de Student, $t = 2.063$, $df = 10$, $p = 0.0661$; Figura 11.6. E) ni en el porcentaje de exploración del objeto A' (prueba t de Student, $t = 0.4138$, $df = 10$, $p = 0.6878$; Figura 11.6. F). De manera similar, durante la fase de prueba, los tiempos totales de exploración no difirieron (prueba t de Student, $t = 0.1569$, $df = 10$, $p = 0.8785$; Figura 11.6. G). No

obstante, al analizar el tiempo de exploración del objeto reubicado (A'), las ratas RS dedicaron significativamente menos tiempo a explorarlo en comparación con los controles (prueba t de Student, $t = 2.398$, $df = 10$, $p = 0.0374$; Figura 11.6. H), lo que evidencia un deterioro en la memoria declarativa.

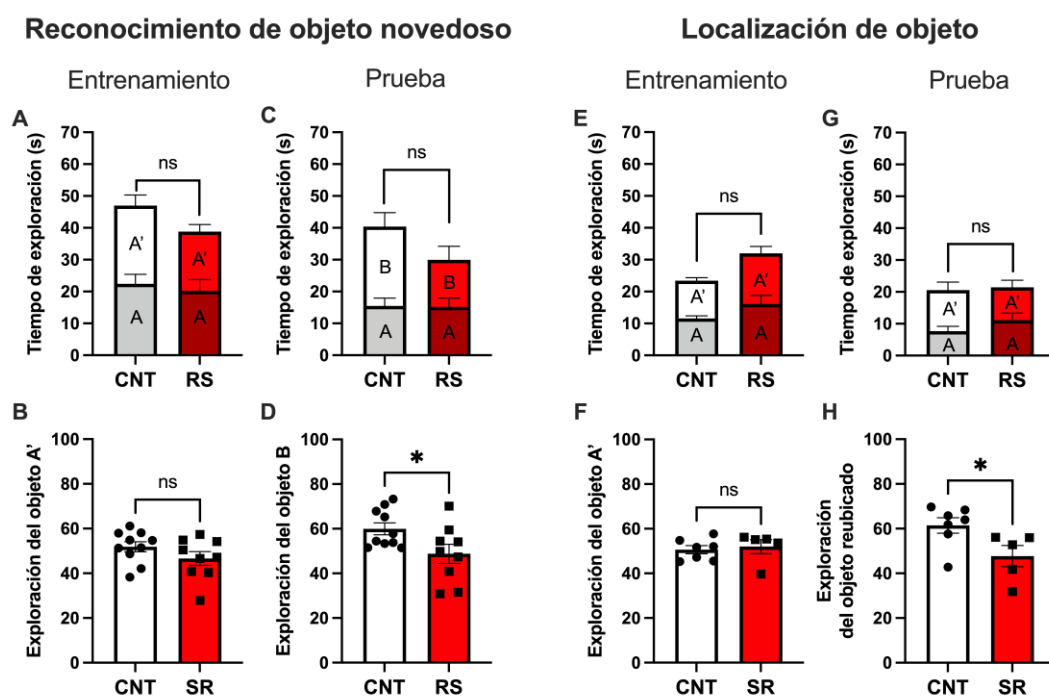


Figura 11.6. La memoria declarativa se ve afectada después de 4 horas de oportunidad para dormir tras 10 días de restricción de sueño.

A) Tiempo total de exploración durante la fase de entrenamiento en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso para los animales control (CNT, barras blancas) y con restringidos de sueño (RS, barras rojas). B) Porcentaje del tiempo de exploración del objeto A' durante la fase de entrenamiento. C) Tiempo total de exploración durante la fase de prueba. D) Porcentaje del tiempo de exploración del objeto nuevo B durante la fase de prueba. E) Tiempo total de exploración durante la fase de entrenamiento en la prueba de localización de objeto para los grupos CNT y RS. F) Porcentaje del tiempo de exploración del objeto A' durante la fase de entrenamiento. G) Tiempo total de exploración durante la fase de prueba. H) Porcentaje de tiempo de exploración del objeto reubicado A' durante la fase de prueba. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas t de Student no pareadas. Los asteriscos indican significancia estadística: * $p < 0.05$.

11.7. Los niveles de corticosterona sérica no se modificaron a los 10 días de restricción de sueño ni después de las últimas 4 horas de oportunidad para dormir

La restricción de sueño induce estrés debido a que, por definición, un estresor es un factor (ambiental, eventos, sustancias) que empuja fuera de la homeostasis a un individuo, activando sistemas neuroendocrinos en respuesta para tratar de mantener la integridad fisiológica del individuo [101] . La corticosterona (cortisol en humanos) es un glucocorticoide secretado por las glándulas suprarrenales en respuesta a un estresor [102] y puede alterar la función cognitiva debido a que el hipocampo es una región muy susceptible a la acción de los glucocorticoides [103, 104]. Para evaluar el efecto de la RS sobre los niveles de corticosterona en los animales sometidos a RS, evaluamos la concentración sérica de este glucocorticoide en los animales RS y sus controles inmediatamente al salir del último periodo de RS y después de las últimas 4 h de oportunidad para dormir. No observamos cambios en los niveles séricos de corticosterona entre los grupos inmediatamente después de la RS ni después de las 4 h de descanso (ANOVA de dos vías, $F[1,15] = 0,6477$; inmediatamente después de la RS, $p = 0,8605$; después de 4 h oportunidad para dormir, $p = 0,2170$, Figura 11.7.), lo que indica que la reducción en la exploración del objeto nuevo o reubicado en animales RS no se atribuye al estrés.

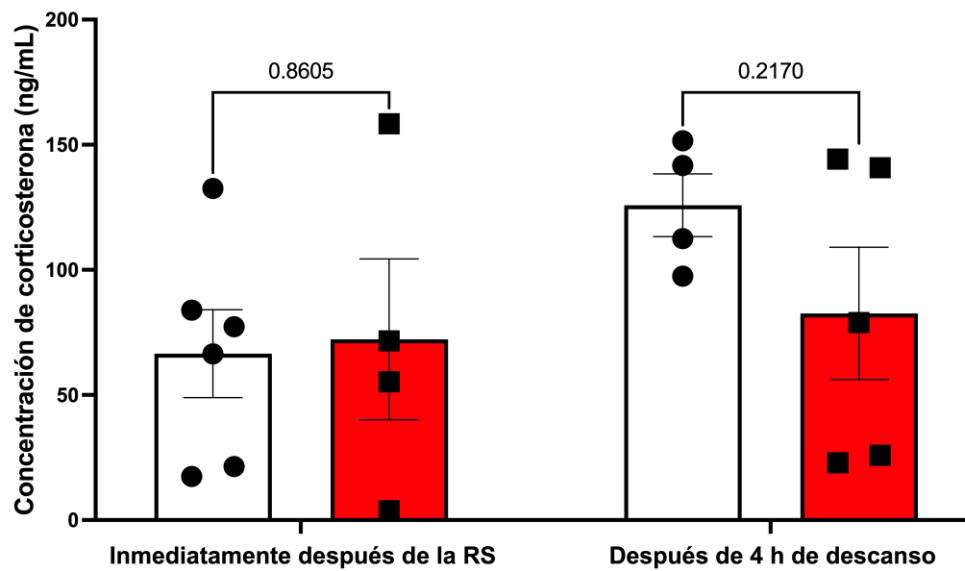


Figura 11.7. Los niveles de corticosterona sérica no se ven afectados después de 10 días de restricción de sueño ni después de 4 h de oportunidad para dormir.

Las concentraciones de corticosterona fueron determinadas inmediatamente después de la última RS en los animales del grupo control (CNT, barras blancas) y en los animales restringidos de sueño (RS, barras rojas) y después de las últimas 4 h de descanso. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías.

12.DISCUSIÓN

Los orígenes de las alteraciones inducidas por la RS en la actividad de las redes neuronales hipocampales y su relación con los déficits cognitivos observados tras alteraciones del sueño prolongadas aún no se comprenden completamente. En el presente trabajo, observamos que el hipocampo de ratas sometidas a 10 días de RS mediante el protocolo MPMM presenta alteraciones microgliales que persisten incluso después de 4 h de oportunidad para dormir. Además, la expresión de Sin, una proteína presináptica, y la proporción de ERK fosforilado, ambas vinculadas con la PLP hipocampal, se alteraron aún tras un breve periodo de oportunidad para dormir. Estos resultados podrían asociarse con las modificaciones en la actividad eléctrica hipocampal durante el último periodo de descanso del protocolo de 10 días de RS.

12.1. La memoria dependiente del hipocampo se ve afectada por la restricción del sueño

Los efectos perjudiciales de la restricción del sueño han sido ampliamente estudiados [105], mientras que el proceso de recuperación ha recibido mucha menos atención. En ratas sometidas a RS, la permeabilidad de la BHE se ve comprometida en regiones como el hipocampo, el tálamo, los ganglios basales, el cerebelo, la corteza insular y otras áreas tras 10 días de RS. Un breve periodo de recuperación de 2 h restauró la función de la BHE en regiones como el cíngulo, la corteza parietal e insular, el hipotálamo, los núcleos basales, la amígdala, el septo y el área preóptica [86], aunque en otras regiones, entre ellas el hipocampo, no se recuperaron. Además, un metaanálisis en ratones privados de sueño indicó que 3 h de recuperación no son

suficientes para restablecer la expresión génica basal hipocampal [106]. En humanos, se ha comprobado que dos días de recuperación tras una noche de privación de sueño no restauran la memoria episódica, a pesar de que la conectividad del hipocampo parece retornar a niveles basales [82]. Otra investigación que evaluó los efectos de la RS a temprana edad empleando el modelo MPMM (20 h de RS diarias durante 14 días iniciando en el día postnatal 28) encontró déficits en la memoria a largo plazo, pero no en memoria a corto plazo, al día postnatal 42. Este efecto persistió hasta la adultez (día postnatal 85) y se relacionó con una neurogénesis hipocampal disminuida y menor inmunorreactividad de aquaporina 4 astrocítica [107]. Algunas similitudes entre estos estudios incluyen alteraciones en el número de neuronas y neurogénesis, disminución en la expresión de proteínas sinápticas, y menor rendimiento en pruebas de aprendizaje y memoria. Estos datos sugieren que la RS induce efectos en la memoria que podrían persistir en periodos prolongados e indeterminados. Comparar estos datos entre estudios resulta desafiante debido a las diferencias en modelos animales, métodos de RS, duración del protocolo de RS, momentos del día en el que se realiza la restricción, y momentos de evaluación cognitiva [108]. Evaluaciones secuenciales en múltiples puntos temporales posteriores a los protocolos de RS podrían ser necesarias para determinar los mecanismos involucrados y sus consecuencias a corto y largo plazo.

12.2. La restricción de sueño altera la función microglial en modelos animales

La función fisiológica, la morfología y la dinámica microglial están reguladas por la actividad neuronal espontánea y evocada, y *viceversa*. Estudios han demostrado que

el sueño modula la morfo-dinámica microglial a través de interacciones dependientes de contacto, como el receptor CX3CR1, mientras que la señalización microglial mediada por los receptores P2Y12 regula la arquitectura del sueño [109, 110] . En nuestro estudio, tras 10 días de RS, las células microgliales del hipocampo presentaron un número significativamente menor de ramificaciones, alteración que persistió tras 4 h de oportunidad para dormir, lo que indica que dicho periodo no es suficiente para normalizar su morfología. Un perfil microglial menos ramificado está asociado con mayor actividad fagocítica [111-115]. Estudios previos han reportado, 24 h después de RS, un aumento en el número de células microgliales en el hipocampo, mayor expresión de marcadores como CD68 (proteína que se localiza en lisosomas y endosomas de células fagocíticas) y el receptor a la molécula C3 del complemento (C3aR), y disminución en la colocalización de las proteínas sinápticas Sin (presináptica)/PSD95 (postsináptica) en CA1, señalando una reducción de contactos sinápticos por aumento de actividad microglial fagocítica [62]. En nuestro estudio, aunque la IR de IBA-1 y el número de células IBA-1⁺ no permanecieron elevados tras 4 h de descanso, observamos una reducción de la ramificación de células IBA-1⁺, lo que sugiere un estado reactivo. Además, la disminución significativa en la IR de Sin en CA1 y CA3, tanto inmediatamente después de RS como tras 4 h de descanso, podría estar vinculada a esa actividad fagocítica aumentada. Estudios futuros deberían evaluar si los cambios morfológicos microgliales tras 4 h de descanso están asociados con la actividad fagocítica elevada y contribuyen a la reducción de la expresión de Sin. Un fenotipo microglial menos ramificado también se ha asociado con neuroinflamación mediada por la microglía [111]. Modelos de neuroinflamación como infartos cerebrales

o inyecciones de LPS intracerebroventricular inducen morfología microglial menos ramificada [116, 117]. De forma similar, otro estudio mostró una reducción en la longitud de ramificación de la microglía cortical en modelos de RS [69]. Además, se ha reportado un aumento en la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el hipocampo y/o corteza prefrontal de ratones con RS [71, 72], lo que sugiere que los cambios morfológicos observados podrían asociarse con un perfil proinflamatorio. La morfología microglial también ha sido relacionada con oscilaciones neuronales. En ratones sometidos a vigilia prolongada (3 h más de vigilia), se observó aumento de frecuencia theta/gamma cortical, incremento en el estado de alerta y mayor ramificación microglial en la corteza somatosensorial e hipocampo. Al extender la vigilia a 9 h, las ramificaciones disminuyeron en ambas regiones y este cambio estuvo asociado con el aumento progresivo de la actividad delta [92]. Estos hallazgos concuerdan con los nuestros, que muestran disminución de ramificación tras RS prolongada asociada a reducción de la frecuencia theta hipocampal. Por otro lado, se sabe que la activación microglial P2Y₁₂-Gi promueve el sueño NMOR al reducir la transmisión cortical de noradrenalina [110]. Dado que la pérdida de función homeostática microglial ocurre durante RS, planteamos la hipótesis de que los cambios en la actividad eléctrica hipocampal observados después de la RS podrían estar asociados con modificaciones en la actividad microglial, especialmente con la activación P2Y₁₂-Gi. Estudios posteriores deberían evaluar si la señalización microglial Gi en el hipocampo se altera durante RS y si su restauración pudiera prevenir los déficits cognitivos observados.

12.3. Alteración de la actividad eléctrica hipocampal tras la restricción del sueño

Las oscilaciones hipocampales se caracterizan por actividad rítmica lenta, principalmente representada por el ritmo theta (4-8 Hz), que organiza la tasa de disparo neuronal y se asocia con el procesamiento de señales ambientales y codificación de memoria [84, 118, 119]. Estudios previos indican que el ritmo theta en la vía CE–CA1 es necesario para la codificación, y en las colaterales de Schaffer para la consolidación y recuperación de la memoria [33]. En nuestro estudio, las ratas RS no pudieron reconocer el objeto novedoso incluso después de 4 h de sueño tras el protocolo MPM. Este efecto podría estar relacionado con la reducción del ritmo theta registrada en el periodo de descanso. La frecuencia gamma hipocampal, es fundamental para la transferencia de información entre CA3 y CA1 durante la consolidación y recuperación de memoria [36, 120]. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron alteraciones en potencia relativa gamma durante el último periodo de descanso. Aunque no existen estudios que aborden explícitamente el acoplamiento theta-gamma durante el sueño, futuros análisis deberían evaluar si la RS interfiere en dicho acoplamiento en tareas exploratorias y en las etapas del sueño. Además, se sabe que la estimulación de la CE a frecuencias bajas (1 Hz) o altas (20 Hz) no induce PLP en CA1, a diferencia de la estimulación theta (5 Hz) [33], ya que el circuito GD–CA3 actúa como filtro. Adicionalmente, observamos que la RS aumentó los ritmos alfa y beta (8-12 Hz y 12-30 Hz, respectivamente) durante el periodo de descanso, lo que podría contribuir a la disminución del rendimiento conductual. Se ha demostrado que el ritmo theta hipocampal induce PLP en CA1 [33], y que su inhibición optogenética durante el

sueño MOR deteriora el desempeño en la prueba RON [18]. Estudios futuros deberían investigar si la reducción del ritmo theta tras RS es responsable de los déficits de memoria y los cambios en la expresión de Sin y ERK. Por otro lado, el control homeostático del sueño incrementa la presión de sueño proporcionalmente a la duración de la vigilia; cuando el tiempo de sueño se reduce, el organismo compensa mediante un rebote de sueño [121]. En roedores, se observa un aumento compensatorio inmediato de la potencia delta cortical durante NMOR y del porcentaje de este estado tras la privación total aguda de sueño [121-123]. Sin embargo, esta respuesta deja de observarse en restricción repetida del sueño: tras 5 días consecutivos de RS, los ratones no mostraron aumento compensatorio de la potencia delta en NMOR, permaneciendo por debajo de los niveles basales incluso dos días después [124]. A nivel cortical, el ritmo theta normalmente se eleva durante NMOR [125], mientras que durante MOR es fundamental para la consolidación de la memoria del olvido selectivo [126]. En estudios con 6 días de privación del sueño, el EEG hipocampal mostró un aumento transitorio del ritmo theta en el grupo RS en los primeros dos días de entrenamiento, mientras que los controles mantuvieron este aumento durante la vigilia prolongada [127]. No existen, hasta la fecha, estudios que documenten el rebote delta/theta en registros de PCL hipocampales tras RS, pero nuestros datos muestran que no hay aumento en delta o theta luego de 10 días de RS, sugiriendo que la pérdida repetida de sueño altera los mecanismos compensatorios durante el aprendizaje y entre estados del sueño. Estudios prospectivos son necesarios para determinar si protocolos subcrónicos similares inducen efectos persistentes comparables a los descritos en paradigmas crónicos, como en el estudio

de Owen et al. [83], donde déficits de memoria espacial a largo plazo y patología hipocampal se evidenciaron meses después del periodo de restricción de sueño.

Otro factor que modula la actividad eléctrica son las citocinas proinflamatorias. La administración IL-1 β y TNF- α induce alteraciones significativas de la excitabilidad neuronal, la frecuencia de disparo y la vulnerabilidad a procesos excitotóxicos. En un estudio ex vivo en el que se administró IL-1 β a cultivos organotípicos de médula espinal de rata se observó el incremento de la inhibición sináptica en neuronas piramidales del hipocampo de rata, modificando la propiedad de disparo de estas células [145]. Además, la administración de IL-1 β (1 μ g, i.p.) a ratas indujo un aumento agudo (<30 min) de la frecuencia de disparo espontáneo en neuronas del núcleo basal de la amígdala basolateral, sugiriendo que la inflamación periférica modula rápidamente la actividad neuronal central [146]. También se observó que la aplicación de TNF- α en baño a neuronas del órgano subfornical indujo despolarización y aumento de la frecuencia de potenciales de acción, evidenciando que TNF- α incrementa la excitabilidad neuronal intrínseca [147]. En cultivos de neuronas corticales de ratón observaron que TNF- α (100 pg/mL, 24 h) incrementó corrientes de Na⁺ dependientes de canales de voltaje, redujo el umbral de disparo y elevó la tasa de disparo, implicando un mecanismo directo de modulación de excitabilidad [148]. Tomando en cuenta que en otros protocolos de restricción de sueño se reporta el incremento en la expresión IL-1 β y TNF- α y que se ha demostrado que estas citocinas pueden alterar la función de la actividad neuronal, este factor podría contribuir en la modificación de la actividad eléctrica del hipocampo registrada después de nuestro protocolo de RS. Estudios posteriores deberían evaluar si efectivamente se observa un incremento en las

citocinas proinflamatorias y si inhibir o bloquear la acción de estas puede rescatar la función eléctrica del cerebro después del protocolo de RS.

12.4. Cambios en sinaptofisina y ERK durante la restricción de sueño

La Sin es una proteína de vesícula presináptica implicada en la transmisión sináptica, cuya expresión se correlaciona positivamente con el aprendizaje y la memoria [128-130]. La PLP se asocia con el aumento de Sin y la actividad de ERK [46, 131]. En ratones knock-out para el gen *Ndufs4* que codifica para subunidad 4 de la proteína Ubiquinona oxidorreductasa, se ha reportado la disminución de actividad de ERK y menor expresión de Sin en el hipocampo [132]. Esto indica una estrecha relación entre la actividad de ERK y Sin. En nuestro estudio, observamos una reducción en la expresión de Sin y un aumento de pERK tras un periodo de descanso de 4 h, lo que refleja alteraciones en la transmisión sináptica. La activación de ERK es esencial para la inducción y mantenimiento de la PLP al modular el tráfico de receptores AMPA [131]. La administración de U0126, un inhibidor de ERK, deteriora la PLP hipocampal inducida por la estimulación mediante una frecuencia theta (5 Hz) [98], lo que sugiere que la PLP dependiente de theta es ERK-dependiente. Por lo tanto, el aumento de pERK tras RS podría estar asociado con procesos distintos a la PLP. La vía ERK también participa en la regulación del ciclo sueño–vigilia. La eliminación específica de ERK1/2 o su inhibición farmacológica incrementan la vigilia tras 6 h de privación del sueño en ratones [133], lo que sugiere que la fosforilación de ERK contribuye a la presión de sueño. En el presente estudio, los niveles de pERK aumentaron significativamente tras 4 h de descanso, lo que podría representar un efecto

compensatorio que intensifica la presión de sueño, aunque no explica por qué pERK no incrementó inmediatamente después de la restricción. Los efectos de la RS sobre la modulación de ERK parecen depender de la duración del protocolo. En ratas Sprague–Dawley, la privación o restricción aguda reduce la fosforilación de ERK en el hipocampo [53, 134, 135], lo que contrasta con nuestros resultados. Esta discrepancia podría explicarse por la naturaleza aguda de los protocolos utilizados en esos estudios frente al carácter subcrónico del nuestro. Esta interpretación se respalda por datos en protocolos de RS de larga duración (hasta 6 meses) que muestran aumento de pERK en el cerebelo [73] , así como en el hipocampo de ratones epilépticos que presentan niveles elevados de pERK [136, 137]. Todas estas intervenciones implican alteraciones homeostáticas profundas, incluyendo la regulación a la alza de mediadores inflamatorios en el SNC [138, 139], lo que sugiere que el aumento de pERK responde a desafíos fisiológicos prolongados o extremos. La activación de la vía ERK también es necesaria para desencadenar cascadas inflamatorias en células gliales. La microglía aislada de ratones 5xFAD presenta pERK elevado [68], regulador crítico de la activación proinflamatoria microglial [140] . Asimismo, la activación de ERK favorece la migración microglial y la proliferación en modelos de dolor neuropático [141], y estimula la actividad fagocítica de células BV2 en cultivo [142]. Dado que los protocolos de RS promueven procesos proinflamatorios en el SNC, el aumento de pERK observado podría estar relacionado también con la activación de rutas inflamatorias.

13.LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Si bien nuestros hallazgos aportan nuevo conocimiento sobre los efectos de la restricción del sueño, existen varias limitaciones importantes. En primer lugar, únicamente se incluyeron ratas macho, dado que nuestros trabajos previos y las referencias directas se realizaron en machos, lo que facilitó la comparación entre estudios. No obstante, reconocemos que los sujetos femeninos han estado históricamente subrepresentados en la investigación del sueño, y es imperativo determinar si la RS y el proceso de recuperación afectan de manera diferencial al hipocampo femenino. En segundo lugar, no se registraron señales de EMG debido al alto riesgo de infección durante el protocolo MPMM y a la complejidad técnica que implica mantener electrodos funcionales en un entorno de restricción en presencia de agua. Como consecuencia, no fue posible calificar formalmente las etapas del sueño ni relacionar directamente los ritmos hipocampales con las distintas fases del mismo, por lo que nuestras conclusiones se limitan a los registros de los PCL hipocampales obtenidos durante el periodo de recuperación. En tercer lugar, los PCL hipocampales no se registraron durante las fases de restricción de 20 horas, sino únicamente durante las últimas 4 horas de cada ciclo. Esto se debió a que el protocolo MPMM requería que los animales permanecieran en jaulas de restricción en pares para minimizar el estrés por aislamiento. Sin embargo, el alojamiento en parejas introdujo la posibilidad de desplazamiento de los electrodos debido a la interacción entre los animales. En consecuencia, no fue posible evaluar la dinámica de la red hipocampal a lo largo de las fases de restricción. En cuarto lugar, nuestro análisis se restringió al periodo de descanso inmediato de 4 horas posterior a los 10 días de RS. Por tanto, no podemos

determinar si las alteraciones observadas persisten, se normalizan o progresan en puntos temporales posteriores. En quinto lugar, aunque observamos relación entre la actividad eléctrica hipocampal, la morfología microglial, la expresión de Sin y ERK, el diseño del estudio no permite establecer relaciones causales. Finalmente, el alcance mecanístico fue limitado: no evaluamos de manera directa la fagocitosis microglial, los niveles de mediadores inflamatorios ni otras vías de señalización que podrían contribuir a los resultados observados. Asimismo, el análisis se restringió al marcador presináptico Sin y a la fosforilación de ERK como correlato molecular de plasticidad. Futuros estudios deberían incluir parámetros adicionales, como otras proteínas involucradas en plasticidad sináptica, mediadores inflamatorios y análisis extendidos tanto de PCL/EEG como de conducta, con el fin de proporcionar una comprensión más integral de las alteraciones hipocampales inducidas por la restricción del sueño.

14. CONCLUSIÓN

En el presente estudio, observamos que la actividad eléctrica del hipocampo se ve alterada tras 10 días de restricción del sueño. El análisis de los PCL hipocampales durante el periodo inmediato de descanso reveló un aumento de los ritmos alfa y beta, junto con una disminución de las ondas delta y theta en comparación con las ratas no restringidas, lo que sugiere que los efectos a largo plazo de la RS podrían estar asociados con una desregulación sostenida de los circuitos neuronales y gliales hipocampales. Este estudio también demuestra la persistencia de alteraciones en la morfología microglial, una disminución en la inmunorreactividad a Sin, y un aumento en la relación pERK/ERK después del descanso, factores que podrían contribuir a los déficits cognitivos observados. Aunque los efectos a largo plazo de la RS en el hipocampo han sido reportados previamente, nuestro trabajo aporta evidencia que vincula estos cambios con la actividad eléctrica hipocampal. No podemos establecer una relación causal entre las oscilaciones hipocampales y los déficits cognitivos inducidos por la RS; sin embargo, identificamos posibles dianas celulares y moleculares, conocidas por influir en la actividad hipocampal, que deberían explorarse en futuros estudios para prevenir tanto las consecuencias a corto como a largo plazo de la restricción del sueño. Esto resulta especialmente relevante considerando que la reducción crónica del sueño en humanos se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, una condición promovida por la actividad proinflamatoria microglial y la degeneración neuronal.

15.REFERENCIAS

1. Zielinski, M.R., J.T. McKenna, and R.W. McCarley, *Functions and Mechanisms of Sleep*. AIMS Neurosci, 2016. **3**(1): p. 67-104.
2. Xie, L., et al., *Sleep drives metabolite clearance from the adult brain*. Science, 2013. **342**(6156): p. 373-7.
3. Benveniste, H., et al., *Glymphatic System Function in Relation to Anesthesia and Sleep States*. Anesth Analg, 2019. **128**(4): p. 747-758.
4. McShane, B.B., et al., *Characterization of the bout durations of sleep and wakefulness*. J Neurosci Methods, 2010. **193**(2): p. 321-33.
5. Sauvet, F., et al., *Lengthening of the photoperiod influences sleep characteristics before and during total sleep deprivation in rat*. J Sleep Res, 2019. **28**(3): p. e12709.
6. Berry, R.B., et al., *AASM Scoring Manual Updates for 2017 (Version 2.4)*. J Clin Sleep Med, 2017. **13**(5): p. 665-666.
7. Rayan, A., et al., *Sleep scoring in rodents: Criteria, automatic approaches and outstanding issues*. Eur J Neurosci, 2024. **59**(4): p. 526-553.
8. Hirshkowitz, M., *Normal human sleep: an overview*. Med Clin North Am, 2004. **88**(3): p. 551-65, vii.
9. Franken, P., A. Malafosse, and M. Tafti, *Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice*. Am J Physiol, 1998. **275**(4): p. R1127-37.

10. Simasko, S.M. and S. Mukherjee, *Novel analysis of sleep patterns in rats separates periods of vigilance cycling from long-duration wake events*. Behav Brain Res, 2009. **196**(2): p. 228-36.
11. Brown, R.E., et al., *Control of sleep and wakefulness*. Physiol Rev, 2012. **92**(3): p. 1087-187.
12. Franken, P., et al., *Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature*. Am J Physiol, 1991. **261**(1 Pt 2): p. R198-208.
13. Steriade, M., D.A. McCormick, and T.J. Sejnowski, *Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain*. Science, 1993. **262**(5134): p. 679-85.
14. Wilson, M.A. and B.L. McNaughton, *Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep*. Science, 1994. **265**(5172): p. 676-9.
15. Keeble, L., et al., *Slow-wave sleep as a key player in offline memory processing: insights from human EEG studies*. Front Behav Neurosci, 2025. **19**: p. 1620544.
16. Diekelmann, S. and J. Born, *The memory function of sleep*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(2): p. 114-26.
17. Luppi, P.H., et al., *The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder*. Sleep Med Rev, 2011. **15**(3): p. 153-63.
18. Boyce, R., et al., *Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation*. Science, 2016. **352**(6287): p. 812-6.

19. Tononi, G. and C. Cirelli, *Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration*. Neuron, 2014. **81**(1): p. 12-34.
20. Hanson, J.A. and M.R. Huecker, *Sleep Deprivation*, in *StatPearls*. 2025: Treasure Island (FL).
21. Van Dongen, H.P., et al., *The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation*. Sleep, 2003. **26**(2): p. 117-26.
22. Tartar, J.L., et al., *Experimental sleep fragmentation and sleep deprivation in rats increases exploration in an open field test of anxiety while increasing plasma corticosterone levels*. Behav Brain Res, 2009. **197**(2): p. 450-3.
23. Beaulieu, I. and R. Godbout, *Spatial learning on the Morris Water Maze Test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat*. Brain Cogn, 2000. **43**(1-3): p. 27-31.
24. Kesner, R.P. and E.T. Rolls, *A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments*. Neurosci Biobehav Rev, 2015. **48**: p. 92-147.
25. O'Keefe, J. and J. Dostrovsky, *The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat*. Brain Res, 1971. **34**(1): p. 171-5.
26. Fanselow, M.S. and H.W. Dong, *Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?* Neuron, 2010. **65**(1): p. 7-19.

27. Hasselmo, M.E., C. Bodelon, and B.P. Wyble, *A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning*. Neural Comput, 2002. **14**(4): p. 793-817.
28. Siegle, J.H. and M.A. Wilson, *Enhancement of encoding and retrieval functions through theta phase-specific manipulation of hippocampus*. Elife, 2014. **3**: p. e03061.
29. Chauhan, P., et al., *The Anatomy of the Hippocampus*, in *Cerebral Ischemia*, R. Pluta, Editor. 2021: Brisbane (AU).
30. Lauri, S.E., et al., *Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release*. Neuron, 2006. **50**(3): p. 415-29.
31. von Wolff, G., et al., *Voltage-sensitive dye imaging demonstrates an enhancing effect of corticotropin-releasing hormone on neuronal activity propagation through the hippocampal formation*. J Psychiatr Res, 2011. **45**(2): p. 256-61.
32. Yoshida, H., et al., *State-specific asymmetries in EEG slow wave activity induced by local application of TNFalpha*. Brain Res, 2004. **1009**(1-2): p. 129-36.
33. Stepan, J., et al., *Entorhinal theta-frequency input to the dentate gyrus trisynaptically evokes hippocampal CA1 LTP*. Front Neural Circuits, 2012. **6**: p. 64.
34. Rayan, A., et al., *Learning shifts the preferred theta phase of gamma oscillations in CA1*. Hippocampus, 2022. **32**(9): p. 695-704.
35. Tamura, M., et al., *Hippocampal-prefrontal theta-gamma coupling during performance of a spatial working memory task*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 2182.

36. Shirvalkar, P.R., P.R. Rapp, and M.L. Shapiro, *Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(15): p. 7054-9.
37. Malenka, R.C. and M.F. Bear, *LTP and LTD: an embarrassment of riches*. Neuron, 2004. **44**(1): p. 5-21.
38. Hayashi, Y., *Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - Towards multiscale understanding of learning and memory*. Neurosci Res, 2022. **175**: p. 3-15.
39. Goncalves, J.T., S.T. Schafer, and F.H. Gage, *Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior*. Cell, 2016. **167**(4): p. 897-914.
40. Sweatt, J.D., *Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory*. Curr Opin Neurobiol, 2004. **14**(3): p. 311-7.
41. English, J.D. and J.D. Sweatt, *A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19103-6.
42. Atkins, C.M., et al., *The MAPK cascade is required for mammalian associative learning*. Nat Neurosci, 1998. **1**(7): p. 602-9.
43. Thomas, G.M. and R.L. Huganir, *MAPK cascade signalling and synaptic plasticity*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(3): p. 173-83.
44. Kelly, A., S. Laroche, and S. Davis, *Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 5354-60.

45. Bluthgen, N., et al., *Profiling the MAPK/ERK dependent and independent activity regulated transcriptional programs in the murine hippocampus in vivo*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45101.
46. Bozdagi, O., et al., *Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 245-59.
47. Wiedenmann, B. and W.W. Franke, *Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles*. Cell, 1985. **41**(3): p. 1017-28.
48. Masliah, E. and R. Terry, *The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system*. Brain Pathol, 1993. **3**(1): p. 77-85.
49. Glantz, L.A., et al., *Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood*. Neuroscience, 2007. **149**(3): p. 582-91.
50. Tartar, J.L., et al., *Hippocampal synaptic plasticity and spatial learning are impaired in a rat model of sleep fragmentation*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(10): p. 2739-48.
51. Hajnik, T., A. Toth, and L. Detari, *Characteristic changes in the slow cortical waves after a 6-h sleep deprivation in rat*. Brain Res, 2013. **1501**: p. 1-11.
52. Suzuki-Abe, H., et al., *Metabolomic and pharmacologic analyses of brain substances associated with sleep pressure in mice*. Neurosci Res, 2022. **177**: p. 16-24.

53. Guan, Z., X. Peng, and J. Fang, *Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus*. Brain Res, 2004. **1018**(1): p. 38-47.
54. Kincheski, G.C., et al., *Chronic sleep restriction promotes brain inflammation and synapse loss, and potentiates memory impairment induced by amyloid-beta oligomers in mice*. Brain Behav Immun, 2017. **64**: p. 140-151.
55. Gaine, M.E., et al., *Altered hippocampal transcriptome dynamics following sleep deprivation*. Mol Brain, 2021. **14**(1): p. 125.
56. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
57. Petry, P., A. Oswald, and K. Kierdorf, *Microglial tissue surveillance: The never-resting gardener in the developing and adult CNS*. Eur J Immunol, 2023. **53**(7): p. e2250232.
58. Tremblay, M.E., R.L. Lowery, and A.K. Majewska, *Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience*. PLoS Biol, 2010. **8**(11): p. e1000527.
59. Lehrman, E.K., et al., *CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development*. Neuron, 2018. **100**(1): p. 120-134 e6.
60. Schafer, D.P., et al., *Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner*. Neuron, 2012. **74**(4): p. 691-705.
61. Chung, H.Y., et al., *Microglia mediate neurocognitive deficits by eliminating C1q-tagged synapses in sepsis-associated encephalopathy*. Sci Adv, 2023. **9**(21): p. eabq7806.

62. Zhai, Q., et al., *Reducing complement activation during sleep deprivation yields cognitive improvement by dexmedetomidine*. Br J Anaesth, 2023. **131**(3): p. 542-555.
63. Paolicelli, R.C., et al., *Synaptic pruning by microglía is necessary for normal brain development*. Science, 2011. **333**(6048): p. 1456-8.
64. Cornell, J., et al., *Microglía regulation of synaptic plasticity and learning and memory*. Neural Regen Res, 2022. **17**(4): p. 705-716.
65. Kim, S.H., C.J. Smith, and L.J. Van Eldik, *Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(4): p. 431-9.
66. Zhou, D., et al., *Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 predominantly enhanced in the microglía of the rat spinal cord following lipopolysaccharide injection*. Cell Mol Neurobiol, 2008. **28**(6): p. 867-74.
67. Ham, J.E., et al., *Differential expression profiles and roles of inducible DUSPs and ERK1/2-specific constitutive DUSP6 and DUSP7 in microglía*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **467**(2): p. 254-60.
68. Chen, M.J., et al., *Extracellular signal-regulated kinase regulates microglial immune responses in Alzheimer's disease*. J Neurosci Res, 2021. **99**(6): p. 1704-1721.
69. Bellesi, M., et al., *Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex*. J Neurosci, 2017. **37**(21): p. 5263-5273.
70. Gentry, N.W., et al., *Microglía are involved in the protection of memories formed during sleep deprivation*. Neurobiol Sleep Circadian Rhythms, 2022. **12**: p. 100073.

71. Zhao, B., et al., *Chronic Sleep Restriction Induces Abeta Accumulation by Disrupting the Balance of Abeta Production and Clearance in Rats*. *Neurochem Res*, 2019. **44**(4): p. 859-873.
72. Zhao, X., et al., *Sleep restriction promotes brain oxidative stress and inflammation, and aggravates cognitive impairment in insulin-resistant mice*. *Psychoneuroendocrinology*, 2024. **166**: p. 107065.
73. Wang, X., et al., *Chronic Sleep Deprivation Altered the Expression of Memory-Related Genes and Caused Cognitive Memory Dysfunction in Mice*. *Int J Mol Sci*, 2024. **25**(21).
74. Tuan, L.H. and L.J. Lee, *Microglia-mediated synaptic pruning is impaired in sleep-deprived adolescent mice*. *Neurobiol Dis*, 2019. **130**: p. 104517.
75. Green, T.R.F., S.M. Murphy, and R.K. Rowe, *Comparisons of quantitative approaches for assessing microglial morphology reveal inconsistencies, ecological fallacy, and a need for standardization*. *Sci Rep*, 2022. **12**(1): p. 18196.
76. Havekes, R., et al., *Sleep deprivation causes memory deficits by negatively impacting neuronal connectivity in hippocampal area CA1*. *Elife*, 2016. **5**.
77. Krause, A.J., et al., *The sleep-deprived human brain*. *Nat Rev Neurosci*, 2017. **18**(7): p. 404-418.
78. Prince, T.M. and T. Abel, *The impact of sleep loss on hippocampal function*. *Learn Mem*, 2013. **20**(10): p. 558-69.
79. Lo, J.C., et al., *Sleep deprivation increases formation of false memory*. *J Sleep Res*, 2016. **25**(6): p. 673-682.

80. He, J., et al., *Sleep restriction impairs blood-brain barrier function*. J Neurosci, 2014. **34**(44): p. 14697-706.
81. Shokri-Kojori, E., et al., *beta-Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(17): p. 4483-4488.
82. Chai, Y., et al., *Two nights of recovery sleep restores hippocampal connectivity but not episodic memory after total sleep deprivation*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 8774.
83. Owen, J.E., et al., *Late-in-life neurodegeneration after chronic sleep loss in young adult mice*. Sleep, 2021. **44**(8).
84. Busche, M.A., et al., *Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(22): p. 8740-5.
85. Machado, R.B., et al., *Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery*. Brain Res, 2004. **1004**(1-2): p. 45-51.
86. Gomez-Gonzalez, B., et al., *REM sleep loss and recovery regulates blood-brain barrier function*. Curr Neurovasc Res, 2013. **10**(3): p. 197-207.
87. Eckel-Mahan, K.L., et al., *Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAmp: implications for memory persistence*. Nat Neurosci, 2008. **11**(9): p. 1074-82.
88. Amir, S. and J. Stewart, *Motivational Modulation of Rhythms of the Expression of the Clock Protein PER2 in the Limbic Forebrain*. Biol Psychiatry, 2009. **65**(10): p. 829-34.

89. Eckel-Mahan, K.L., *Circadian Oscillations within the Hippocampus Support Memory Formation and Persistence*. Front Mol Neurosci, 2012. **5**: p. 46.
90. Yoo, S.H. and K. Eckel-Mahan, *Hippocampal PER1: a circadian sentinel controlling RSKy activity during memory formation*. J Neurochem, 2016. **138**(5): p. 650-2.
91. Debski, K.J., et al., *The circadian dynamics of the hippocampal transcriptome and proteome is altered in experimental temporal lobe epilepsy*. Sci Adv, 2020. **6**(41).
92. Steffens, S., et al., *Microglial morphology aligns with vigilance stage-specific neuronal oscillations in a brain region-dependent manner*. Glia, 2024. **72**(12): p. 2344-2356.
93. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
94. Gonzalez-Gonzalez, S., et al., *Maternal exposure to dim light at night induces behavioral alterations in the adolescent and adult offspring Wistar rat*. Front Physiol, 2024. **15**: p. 1520160.
95. Lueptow, L.M., *Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice*. J Vis Exp, 2017(126).
96. Denninger, J.K., B.M. Smith, and E.D. Kirby, *Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget*. J Vis Exp, 2018(141).
97. Zielinski, M.R. and A.J. Gibbons, *Neuroinflammation, Sleep, and Circadian Rhythms*. Front Cell Infect Microbiol, 2022. **12**: p. 853096.

98. Winder, D.G., et al., *ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 715-26.
99. Kushner, S.A., et al., *Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway*. J Neurosci, 2005. **25**(42): p. 9721-34.
100. Stepan, J., J. Dine, and M. Eder, *Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 160.
101. Ulrich-Lai, Y.M. and J.P. Herman, *Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(6): p. 397-409.
102. Segerstrom, S.C. and G.E. Miller, *Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry*. Psychol Bull, 2004. **130**(4): p. 601-30.
103. Lupien, S.J., et al., *Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits*. Nat Neurosci, 1998. **1**(1): p. 69-73.
104. Kelemen, E., et al., *Hippocampal corticosterone impairs memory consolidation during sleep but improves consolidation in the wake state*. Hippocampus, 2014. **24**(5): p. 510-5.
105. Diao, H., et al., *REM sleep deprivation induced by the modified multi-platform method has detrimental effects on memory: A systematic review and meta-analysis*. Behav Brain Res, 2023. **454**: p. 114652.

106. Lyons, L.C., Y. Vanrobaeys, and T. Abel, *Sleep and memory: The impact of sleep deprivation on transcription, translational control, and protein synthesis in the brain*. J Neurochem, 2023. **166**(1): p. 24-46.
107. Chen, P., et al., *The Devastating Effects of Sleep Deprivation on Memory: Lessons from Rodent Models*. Clocks Sleep, 2023. **5**(2): p. 276-294.
108. Wright, C.J., S. Milosavljevic, and A. Pocivavsek, *The stress of losing sleep: Sex-specific neurobiological outcomes*. Neurobiol Stress, 2023. **24**: p. 100543.
109. Hristovska, I., et al., *Sleep decreases neuronal activity control of microglial dynamics in mice*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 6273.
110. Ma, C., et al., *Microglia regulate sleep through calcium-dependent modulation of norepinephrine transmission*. Nat Neurosci, 2024. **27**(2): p. 249-258.
111. Morrison, H.W. and J.A. Filosa, *A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 4.
112. Doorn, K.J., et al., *Increased amoeboid microglial density in the olfactory bulb of Parkinson's and Alzheimer's patients*. Brain Pathol, 2014. **24**(2): p. 152-65.
113. York, E.M., et al., *3DMorph Automatic Analysis of Microglial Morphology in Three Dimensions from Ex Vivo and In Vivo Imaging*. eNeuro, 2018. **5**(6).
114. Savage, J.C., M. Carrier, and M.E. Tremblay, *Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease*. Methods Mol Biol, 2019. **2034**: p. 13-26.
115. Green, T.R.F., et al., *Age-At-Injury Influences the Glial Response to Traumatic Brain Injury in the Cortex of Male Juvenile Rats*. Front Neurol, 2021. **12**: p. 804139.

116. Karperien, A., H. Ahammer, and H.F. Jelinek, *Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 3.
117. Fernandez-Arjona, M.D.M., et al., *Microglía Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 235.
118. Pena-Ortega, F., *Amyloid Beta-Protein and Neural Network Dysfunction*. J Neurodegener Dis, 2013. **2013**: p. 657470.
119. Hefter, D., et al., *Amyloid, APP, and Electrical Activity of the Brain*. Neuroscientist, 2020. **26**(3): p. 231-251.
120. Villette, V., et al., *Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat*. J Neurosci, 2010. **30**(33): p. 10991-1003.
121. Rechtschaffen, A., et al., *Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat*. Sleep, 1999. **22**(1): p. 11-31.
122. Tobler, I. and A.A. Borbely, *The effect of 3-h and 6-h sleep deprivation on sleep and EEG spectra of the rat*. Behav Brain Res, 1990. **36**(1-2): p. 73-8.
123. Franken, P., I. Tobler, and A.A. Borbely, *Effects of 12-h sleep deprivation and of 12-h cold exposure on sleep regulation and cortical temperature in the rat*. Physiol Behav, 1993. **54**(5): p. 885-94.
124. Kim, Y., et al., *Repeated sleep restriction in rats leads to homeostatic and allostatic responses during recovery sleep*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(25): p. 10697-702.

125. Bjorness, T.E., V. Booth, and G.R. Poe, *Hippocampal theta power pressure builds over non-REM sleep and dissipates within REM sleep episodes*. Arch Ital Biol, 2018. **156**(3): p. 112-126.
126. Poe, G.R., et al., *Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep*. Brain Res, 2000. **855**(1): p. 176-80.
127. Yang, R.H., et al., *Sleep deprivation impairs spatial learning and modifies the hippocampal theta rhythm in rats*. Neuroscience, 2011. **173**: p. 116-23.
128. Schmitt, U., et al., *Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin*. Neuroscience, 2009. **162**(2): p. 234-43.
129. Zhang, F.X., et al., *Abnormal expression of synaptophysin, SNAP-25, and synaptotagmin 1 in the hippocampus of kainic acid-exposed rats with behavioral deficits*. Cell Mol Neurobiol, 2014. **34**(6): p. 813-24.
130. Lee, C.C., et al., *Exercise intensities modulate cognitive function in spontaneously hypertensive rats through oxidative mediated synaptic plasticity in hippocampus*. J Cell Mol Med, 2021. **25**(17): p. 8546-8557.
131. Baudry, M., et al., *Multiple cellular cascades participate in long-term potentiation and in hippocampus-dependent learning*. Brain Res, 2015. **1621**: p. 73-81.
132. Shil, S.K., et al., *Ndufs4 ablation decreases synaptophysin expression in hippocampus*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 10969.
133. Mikhail, C., et al., *ERK signaling pathway regulates sleep duration through activity-induced gene expression during wakefulness*. Sci Signal, 2017. **10**(463).
134. Ravassard, P., et al., *Paradoxical (REM) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate*

receptor protein levels, and ERK/MAPK activation in the dorsal hippocampus. *Sleep*, 2009. **32**(2): p. 227-40.

135. Wang, L., et al., *Effects of Sleep Deprivation (SD) on Rats via ERK1/2 Signaling Pathway*. *Med Sci Monit*, 2019. **25**: p. 2886-2895.

136. Houser, C.R., C.S. Huang, and Z. Peng, *Dynamic seizure-related changes in extracellular signal-regulated kinase activation in a mouse model of temporal lobe epilepsy*. *Neuroscience*, 2008. **156**(1): p. 222-37.

137. Xu, Z.C., et al., *Epileptiform discharge upregulates p-ERK1/2, growth-associated protein 43 and synaptophysin in cultured rat hippocampal neurons*. *Seizure*, 2009. **18**(10): p. 680-5.

138. Garcia-Aviles, J.E., et al., *Metabolic Disturbances Induced by Sleep Restriction as Potential Triggers for Alzheimer's Disease*. *Front Integr Neurosci*, 2021. **15**: p. 722523.

139. Foiadelli, T., et al., *Neuroinflammation and status epilepticus: a narrative review unraveling a complex interplay*. *Front Pediatr*, 2023. **11**: p. 1251914.

140. Xia, Q., et al., *Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia*. *Cell Death Dis*, 2015. **6**(3): p. e1702.

141. Calvo, M., et al., *Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain via the MEK/ERK pathway*. *Glia*, 2011. **59**(4): p. 554-68.

142. Fu, P., et al., *Rho-Associated Kinase Inhibitors Promote Microglial Uptake Via the ERK Signaling Pathway*. *Neurosci Bull*, 2016. **32**(1): p. 83-91.

143. Corsi, G., et al., *Microglia modulate hippocampal synaptic transmission and sleep duration along the light/dark cycle*. *Glia*, 2022 **70**(1), 89–105.
144. Nebeling, F. C., et al., *Microglial motility is modulated by neuronal activity and correlates with dendritic spine plasticity in the hippocampus of awake mice*. *eLife*, **12**.
145. Gustafson-Vickers, S. L., et al., *Long-term actions of interleukin-1beta on delay and tonic firing neurons in rat superficial dorsal horn and their relevance to central sensitization*. *Molecular pain*, 2008. **4**, 63.
146. Munshi, S., & Rosenkranz, J. A. *Effects of Peripheral Immune Challenge on In Vivo Firing of Basolateral Amygdala Neurons in Adult Male Rats*. *Neuroscience*, 2018. **390**, 174–186.
147. Simpson, N. J., & Ferguson, A. V. *The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α excites subfornical organ neurons*. *Journal of neurophysiology*, 2017. **118**(3), 1532–1541.
148. Chen, W., et al., *Tumor necrosis factor- α enhances voltage-gated Na⁺ currents in primary culture of mouse cortical neurons*. *Journal of neuroinflammation*, **12**, 126.

16. ANEXOS Y PROBATORIOS

Neurochemical Research (2025) 50:311
https://doi.org/10.1007/s11064-025-04561-1

RESEARCH



A Sleeping Opportunity Does Not Restore Hippocampal Alterations Induced by 10 Days of Sleep Restriction in Rats

Jesús Enrique García-Aviles^{1,2,3} · Jessica J. Avilez-Aviles^{1,2,3} · Josué Sánchez-Hernández¹ · Camila Patlán-Márquez¹ · Javier Rodríguez-Alpizar¹ · Fernanda Michell Becerril-Mercado¹ · Adriana Jiménez⁴ · Natalí N. Guerrero-Vargas⁵ · Jean-Pascal Morin¹ · Melissa Rodríguez-García¹ · Joaquín Manjarrez-Marmolejo⁶ · Beatriz Gómez-González² · Rosalinda Guevara-Guzmán^{1,7} · Mara A. Guzmán-Ruiz^{1,7}

Received: 27 July 2025 / Revised: 29 August 2025 / Accepted: 11 September 2025
© The Author(s) 2025, modified publication 2025

Abstract

Sleep loss has been implicated in age-related cognitive decline. Experimental sleep restriction (SR) alters the physiology of multiple brain regions and increases blood–brain barrier (BBB) permeability. Among these regions, the hippocampus of both humans and rodents shows alterations that endure longer than in other areas such as the basal ganglia and hypothalamus. In the present study, adult male rats were subjected to 10 days of SR using the modified multiple platform method (MMPM). Immediately after restriction, SR animals exhibited increased IBA-1 immunoreactivity (IR) and cell number, consistent with microglial activation; these morphological changes persisted after a 4 h recovery period. Synaptophysin (Syn) expression was significantly reduced after SR and remained decreased following rest, while the pERK/ERK ratio was significantly increased by the end of the recovery window. These molecular alterations were accompanied by disrupted hippocampal local field potentials (LFPs), characterized by increased alpha and beta activity and reduced delta and theta power. Importantly, SR rats showed impaired short-term memory in the novel object and object location recognition tests after the recovery period. Together, these findings demonstrate that subchronic SR induces persistent microglial and synaptic alterations and abnormal ERK signaling that remain after short rest, correlating with hippocampal network dysfunction and memory impairment.

Keywords Hippocampus · Sleep restriction · Local-field potentials · Microglia · ERK

Rosalinda Guevara-Guzmán and Mara A. Guzmán-Ruiz are joint corresponding authors.

✉ Rosalinda Guevara-Guzmán
rguevara@unam.mx

✉ Mara A. Guzmán-Ruiz
mara_alaide@comunidad.unam.mx

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

² Área de neurociencias, Departamento de biología de la reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Mexico City, Mexico

³ Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Mexico City, Mexico

⁴ División de Investigación, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico

⁵ Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

⁶ Laboratorio de Fisiología de la Formación Reticular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico

⁷ Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 3004, Copilco Universidad, Delegación Coyoacán, 04510 Ciudad de México, CDMX, Mexico

Published online: 29 September 2025

Springer

Introduction

The total or partial loss of sleep, defined as sleep restriction (SR), represents a health problem that increases the risk for developing conditions such as overweight, obesity, infectious and cardiovascular diseases, diabetes and hypertension [1]. Many processes aimed at maintaining homeostasis take place preferentially during sleep. For example, central nervous system (CNS) debris clearance, and several synaptic plasticity processes involved in memory consolidation and cognition take place during specific phases of the sleep cycle [2–4]. In addition, there is growing evidence suggesting that SR may be a risk factor for the development of neurodegenerative diseases [5]. Human studies indicate that short sleep duration (< 7 h per night) is associated with a higher incidence of neurodegenerative conditions [6, 7]. The hippocampus (Hc) is sensitive to SR and sleep deprivation with changes in cellular signaling, protein synthesis, and neuronal connectivity following sleep loss [8]. Sleep loss in rodents induces a decrease in hippocampal synaptic proteins, postsynaptic protein 95 (PSD-95) and synaptophysin (Syn), as well as a decrease in the phosphorylation levels of extracellular signal-regulated kinase (ERK), a kinase involved in memory formation, consolidation, and retrieval [9–11]. Sleep loss also increases the expression of the macrophage marker ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (IBA-1) and promotes the expression of inflammatory cytokines in the CNS [8, 12–17].

Sleep loss induces hippocampal long-lasting effects. In humans, one night of sleep deprivation impairs hippocampal dependent memory even after two days of sleep recovery [15]. In rodents, the increased hippocampal BBB permeability remains impaired after 2 h of resting opportunity [16, 18]. A meta-analysis of several studies performed in sleep deprived mice indicated that 3 h of sleep recovery is not enough time to restore the basal hippocampal gene expression of *cirpb* and *rbm3* [19], which are associated with altered expression of stress response and cell survival genes, suggesting that sleep loss has persistent effects in the hippocampus after short resting periods.

There are few studies determining the effects of resting in hippocampal protein expression and electrical activity. The aim of the present study is to determine the molecular, cellular and behavioral effects of 4 h sleeping opportunity following 10 days of SR induced by the modified multiple platform method (MMPM). With this aim in mind, we analyzed the molecular footprint of SR, with or without the recovery period, by using immunofluorescence analysis of neuroplasticity and neuroinflammation markers along with Western Blot analysis of memory-related kinase ERK phosphorylation levels, in the hippocampus. In addition, in a different set of animals, we assessed the effect of SR and

the following recovery opportunity in hippocampal rhythms using LFP recordings. Finally, we assess how MMPM affects context and object recognition memory. We discuss the data in terms of how SR-induced molecular and cellular alterations could explain short-term and, possibly, long-term cognitive alterations.

Materials and Methods

Animals

This study was conducted in accordance with the guidelines and requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki (1964), approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine, UNAM (protocol 032-2023 FM/OI/102/2023 Facultad de Medicina, UNAM), and regulated by the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999 to minimize animal suffering.

Male Wistar rats (280–350 g weight, 3 months old) were obtained from the *Unidad Académica Bioterio* (UAB) from the Faculty of Medicine, *Universidad Nacional Autónoma de México*. Animals were maintained under a 12:12 h light–dark cycle (lights were on from 8:00=ZT 0 to 20:00=ZT 12) with access to tap water and standard laboratory chow (5001 PMI Nutrition International Inc., Greenwood, MO) *ad libitum* throughout the experiments. Room temperature was maintained at 22 ± 2 °C with constant filtered air flow. All animals were habituated for 7 days prior to randomly assigning them into one of the four different experimental cohorts that will be described later.

Sleep Restriction by the Modified Multiple Platform Method (MMPM)

To induce SR, we performed the modified multiple platform method (MMPM). The MMPM method prevents social isolation stress, as two rats from the same social group are placed together in both the restriction cage and their respective home cage. In addition, we previously showed that this SR protocol does not increase serum corticosterone levels, at least when measured on the tenth day, at the end of the last two hours of the resting phase [53], this procedure avoids immobilization stress since each restriction cage presents three platforms. and that is known to completely abolish REM sleep and to reduce NREM sleep by approximately 31% [18, 20].

To induce SR, rats (SR) were kept awake by placing them in pairs inside of acrylic cages (53 cm x 43 cm x 20 cm) filled with 3 cm of water and inside of which three platforms of 7 x 6 cm each (diameter and height, respectively) were placed in order to allow the rats to stand, sit and lie down;

however whenever the animals lost muscle tone, they fell into the water, thus, waking them up. Rats remained in these restriction cages for 20 h (20:00–16:00 h) during 10 consecutive days and were allowed to rest in their home cages for the remaining 4 h (16:00–20:00 h) (Fig. 1A and B).

Experimental Design

The first cohort included 20 rats, divided into a control group (CNT, $n = 10$), which remained in their home cages throughout the protocol, and a sleep-restricted group (SR, $n = 10$). After the final 20 h of sleep restriction on day 10, SR animals were euthanized immediately upon removal from the restriction cage, along with time-matched CNT counterparts. Brains were collected either after perfusion for immunofluorescence (IF, $n = 4$ per condition) or after decapitation for Western blot (WB, $n = 6$ per condition) (Fig. 1C). Trunk blood samples from decapitated animals were collected to

determine corticosterone concentrations (blood could not be collected from 2 SR rats).

The second cohort initially included 20 rats (10 SR and 10 CNT). SR animals underwent the same sleep restriction protocol but, following the last 20 h of restriction on day 10, were allowed 4 h of recovery sleep in their home cages. CNT rats remained in their home cages for the entire protocol. At the end of the 4 h recovery period, both groups were sacrificed simultaneously. Brains were collected either after perfusion for IF ($n = 4$ per condition) or after decapitation for WB ($n = 6$ per condition; one SR rat died during the protocol, and one CNT sample degraded) (Fig. 1C). Trunk blood was also obtained from decapitated animals to determine corticosterone concentrations (two CNT samples could not be obtained). Paired time-matched controls were included in this cohort because the hippocampus exhibits circadian oscillations in molecular and cellular markers [21–26]. In our design, animals were sacrificed either immediately after sleep restriction (ZT8, light phase) or after a 4 h recovery period coinciding with the onset of the dark phase (ZT12,

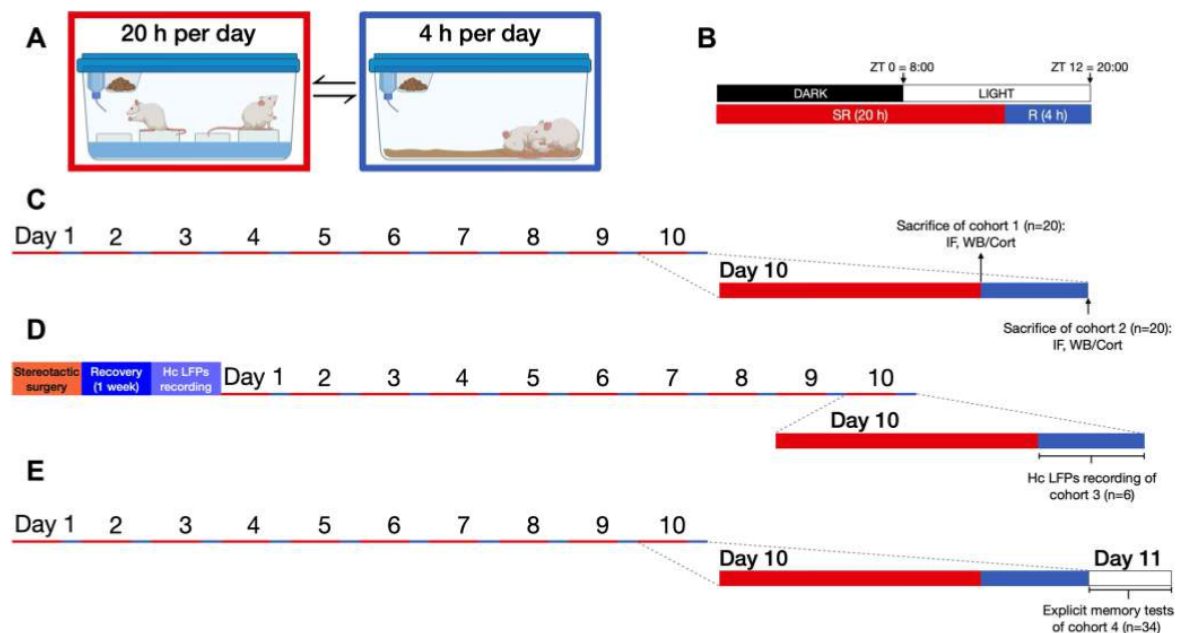


Fig. 1 Experimental design of the modified multiple-platform method (MMPM) for sleep restriction. **A** Diagram of the MMPM protocol. Animals were placed in the SR cage (red border) for 20 h/day and then returned to their home cages for 4 h/day to allow recovery sleep (blue border). This schedule was repeated for 10 consecutive days. **B** Daily timeline aligned with the light–dark cycle. Black and white bars represent the dark and light phases, respectively. The SR period (red bar) was conducted from lights on (ZT0=08:00) to ZT8=16:00, continuing until ZT12=20:00, when animals were returned to their home cages for a 4 h recovery opportunity (blue bar) during the onset of the dark phase (ZT8–ZT12). **C** Experimental design for cohorts 1 and 2, designated for hippocampal protein analysis by Western blot (WB)

and immunofluorescence (IF). Animals were sacrificed either immediately after SR (ZT8, cohort 1) or after a 4 h recovery period (ZT12, cohort 2). **D** Experimental design for cohort 3, used for hippocampal electrical activity analysis. Animals were implanted with hippocampal electrodes (orange bar) prior to the SR protocol, allowed one week for recovery (blue bar), and then local field potentials (LFPs) were recorded during the final 4 h recovery opportunity (ZT8–ZT12, cohort 3). **E** Experimental design for cohort 4, designated for behavioral testing. The novel object recognition test (NORT) and object location test (OLT) were performed on day 11, following completion of the SR protocol and a 4 h recovery opportunity (ZT8–ZT12, white bar)

active phase). Including time-matched controls ensured that the effects of sleep restriction could be distinguished from circadian influences.

A third cohort consisted of 6 rats implanted with hippocampal electrodes in CA1 to record local field potentials (LFPs) before (non-restricted baseline) and after the SR protocol (Fig. 1D). The baseline recording was obtained on day 7 after surgery, between 16:00 and 20:00 h, corresponding to the 4 h resting period later used in the SR protocol. The following day, all animals began the MMPM protocol for 10 consecutive days. A second recording was obtained during the 4 h recovery opportunity at the end of the restriction protocol. In this design, each animal served as its own control, allowing paired comparisons of hippocampal activity before and after SR. This approach also minimized variability and avoided the technical complications of maintaining electrodes in paired animals housed under water-exposure conditions during the restriction phase.

Finally, a fourth cohort consisted of 34 rats used for explicit memory testing: 20 for the NORT (CNT n 10, SR n 10; one SR rat was excluded because it jumped out of the testing box) and 14 for the OLT (CNT n 8, SR n 6; one CNT and one SR were excluded because their video recording were incomplete).

Immunofluorescence

Animals were euthanized either immediately after the SR protocol or following 4 h of recovery sleep by intraperitoneal injection of an overdose of sodium pentobarbital (Aranda, 200 mg/kg). Once deeply anesthetized, and just before cardiac arrest, animals underwent transcardial perfusion with 0.9% saline solution for 5 min (15 mL/min), followed by 4% ice-cold paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min.

Brains were collected, post-fixed in 4% ice-cold PFA for 48 h at room temperature under continuous gentle agitation, and subsequently cryoprotected in 30% sucrose/0.05% sodium azide in PBS at 4 °C until use. Serial coronal Sect. (30 μ m thick) of the hippocampus (Hc; Bregma -2.52 mm to -3.24 mm, Paxinos & Watson, 2007) were obtained with a Leica CM1850 UV cryostat, collected in cryoprotectant solution, and stored at 4 °C until immunofluorescence (IF) processing.

For each animal, four sections containing the bilateral dorsal Hc were pre-incubated for 10 min in 1% H_2O_2 to block endogenous peroxidase activity. After a PBS wash, sections were incubated overnight at room temperature under constant agitation with the following primary antibodies: IBA-1 (Abcam, ab5076, 1:1000) and Synaptophysin (Syn; Santa Cruz Biotechnology, sc-17750, 1:2000).

The next day, sections were washed with PBS and incubated for 2 h with secondary antibodies: CY3-conjugated donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch, 705-165-147, 1:500) and Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 715-545-150, 1:500). Sections were then washed with PBS and mounted on gelatin-coated slides. After drying, slides were incubated for 10 min with DAPI solution (Invitrogen, 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, D1306, 1 μ g/mL) and cover-slipped using anti-fade fluorescence mounting medium (Abcam, ab104135).

Syn and IBA-1 Immunoreactivity and Morphological Analyses

Confocal micrographs (20 $\times$) of the hippocampal CA1 and CA3 regions (3–4 fields per animal) were acquired using a ZEISS LSM 880 confocal microscope. Quantitative analysis of optical density (OD) per section was performed in FIJI software [27]. Since the images exclusively contained the regions of interest, no additional ROI tracing was required; OD was measured across the entire image. Data are presented as OD percentage normalized to controls for both Synaptophysin (Syn) and IBA-1 immunofluorescent staining.

To determine the number of IBA-1-positive cells, 3–4 micrographs from CA1 and CA3 regions were analyzed per animal. Cells were counted based on the following criteria: (1) only complete cells were included, and (2) both DAPI and IBA-1 signals were required.

For morphological analysis of IBA-1-positive cells, 3–4 micrographs per region per animal were evaluated. A 10 $\times$ 10 grid was applied in FIJI, and 3 random cells per region were selected using the Excel randomization function. Each selected cell was cropped and processed with a standardized script to generate binary and skeletonized images. Images were converted to 8-bit grayscale, filtered to improve contrast and remove background, and then transformed into binary and skeletonized formats. This processing was performed independently by two researchers blinded to the experimental conditions.

Sholl analysis was carried out on binary images with the FIJI Neuroanatomy plugin to characterize glial arborization. Concentric circles (5 μ m apart) were drawn from the soma, and intersections of processes with the shells were quantified [28]. Branch number was assessed on skeletonized images using the FIJI Skeleton plugin.

Western Blot

Either immediately after sleep restriction or following 4 h of recovery sleep in the MMPM protocol, animals were

euthanized by decapitation. Hippocampi from CNT and SR groups were collected and stored at -80°C until processing. Tissue was homogenized in NP-40 lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors, and samples were centrifuged at 13,500 rpm for 10 min at 4°C . The supernatant was collected, and protein concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm (Epoch BioTek).

For immunoblotting, 50 μg of protein were resolved on 10% SDS-PAGE gels, transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, and blocked with 5% (w/v) nonfat milk in PBS-Tween 20 for 45 min. Membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-Synaptophysin (Syn; Santa Cruz Biotechnology, sc-17750, 1:1000), anti-ERK (Cell Signaling, cat. 4695, 1:2000), anti-phospho-ERK (Santa Cruz Biotechnology, sc-101760, 1:400), and anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-69879, 1:1000).

The next day, membranes were incubated with biotinylated secondary antibodies donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 715-065-150, 1:2000) or donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, 711-065-152, 1:2000), followed by avidin-biotin complex amplification (Vectastain Elite ABC-HRP Kit, PK-6100, 2.5:1000). Signals were visualized using a chemiluminescence detection system (Bio-Rad, 1705060).

Semi-quantitative analysis was performed using the Gel Analyzer tool in FIJI. β -actin optical density was used as the loading control for normalization. Protein expression was calculated as the ratio of the target protein to β -actin, and fold changes were determined relative to the CNT group (set to 1). Original PVDF membrane images used for analysis are provided in Supplementary Figs. 1–4.

Hippocampal Local Field Potentials

Local field potentials (LFPs) provide a reliable measure of brain electrical activity [29, 30]. To assess the effects of SR on hippocampal function, six male rats were implanted with a recording electrode during stereotaxic surgery. Animals were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (90/10 mg/kg, i.p.) and positioned in a stereotaxic frame. After exposing Bregma, a stainless-steel recording electrode was implanted in the left dorsal CA1 region of the hippocampus at the following coordinates: AP = -3.8 mm; L = 2.0 mm; V = 3.0 mm. The representative electrode location is shown in Supplementary Figure S5.

Two stainless-steel screws were anchored to the skull: one above the dura mater of the right motor cortex (indifferent monopolar ground) and another on the left occipital bone (fixation). Electrodes were connected to a 5-pin micro-USB connector and secured with dental acrylic. The wound

was treated with topical gentamicin (0.3%) and sutured. Animals were housed individually in acrylic cages during recovery. For the first three postoperative days, rats received enrofloxacin (5 mg/kg, i.p., every 24 h).

Two LFP recordings were obtained from the same animal. The first was performed on day 7 after surgery, between 16:00 and 20:00 h, serving as a baseline (BL). This time window corresponded to the 4 h resting period later used in the SR protocol. The following day, all six rats began the MMPM protocol for 10 consecutive days. The second recording was obtained during the 4 h recovery opportunity at the end of the SR protocol. In this way, each animal served as its own control, minimizing variability and avoiding the technical challenges of maintaining electrodes in paired animals housed under MMPM conditions.

For LFP recordings, rats were placed in acrylic boxes ($30 \times 22 \times 22$ cm) and connected to a video-LFP acquisition system (BE Light, EB Neuro S.p.A., Florence, Italy) via flexible cables that allowed free movement. Data were sampled at 256 Hz, low-pass filtered at 0.3 Hz, and high-pass filtered at 70 Hz using Galileo NT software (EB Neuro, Italy). Relative power across frequency bands was calculated using automated Fast Fourier Transform analysis.

Novel Object Recognition and Object Location Test

The novel object recognition test (NORT) and the object location test (OLT) are widely used paradigms to assess explicit memory [25, 26]. We employed both tests to evaluate the effects of SR on this type of memory.

For the NORT, 20 rats were randomly assigned to two groups: control animals (CNT, $n=10$), which remained in their home cages for 10 days, and sleep-restricted animals (SR, $n=10$; one animal was excluded after escaping from the testing arena during trials). For the OLT, 14 rats were used (CNT, $n=8$; SR, $n=6$); one animal from each group was excluded due to incomplete video recordings.

After the final restriction period, SR animals were returned to their home cages for a 4 h resting opportunity. Thereafter, either the NORT or the OLT was performed at 20:00 h, corresponding to the beginning of the dark/activity phase. Tests were not conducted immediately after SR, as pilot experiments indicated that animals tended to fall asleep rather than explore the objects (data not shown).

Behavioral testing was conducted in a $45 \times 45 \times 45$ cm open wooden box (without lid) and consisted of three phases: habituation, training, and test. To minimize disruption of the light/dark cycle, all sessions were conducted under red light. The habituation and training phases were identical for both NORT and OLT:

1. Habituation: Rats were transferred to the behavioral testing room in their own home cages and left undisturbed for 1 h to acclimate. Next, each rat was placed in one of two parallel empty arenas for habituation (one CNT and one SR animal simultaneously) for 5 min before being returned to its home cage.
2. Training: One hour later, two identical objects (either an upside-down 100 mL glass beaker or a 60 mL Coplin staining jar; objects A and A' respectively) were placed at diagonally opposite corners of the testing box. Animals were allowed to explore the objects for 5 min before being returned to their home cages.
3. NORT trial: One hour after training, animals were placed in the testing box with one familiar object (A) and one novel object (B, a glass object of similar size but different shape from the familiar object). Both objects were positioned in the same locations as during training. Exploration was allowed for 5 min.
4. OLT trial: One hour after training, animals were placed in the testing box with the same two identical objects used during training. One object (A) remained in its original location, while the other (A') was displaced to a new location. Exploration lasted 5 min.

All trials were video-recorded for later analysis. Exploration times were scored by two independent researchers blind to the experimental conditions. The percentage of investigation time during training was calculated as $TA'/(TA'+TA) \times 100$, where TA' is the exploration time of object A' and TA is the exploration time of object A. For the test trials, the percentage of investigation time was calculated as $TB/(TB+TA) \times 100$, where TB is the exploration time of the novel (NORT) or relocated (OLT) object, and TA is the exploration time of the familiar (NORT) or non-relocated (OLT) object.

Corticosterone Radioimmunoassay

Blood samples from euthanized animals were collected in 2.5 mL microtubes and centrifuged at 11,700 rpm for 15 min. Plasma was aliquoted (60 μ L) and stored at -80°C until analysis. Corticosterone concentrations were determined using the Corticosterone Double Antibody RIA Kit (MP Biomedicals, cat. 07120102), following the manufacturer's instructions. Briefly, plasma and standard curve samples were diluted 1:400 with RIA buffer (50 mM PBS containing 0.1% gelatin). Corticosterone- I^{125} tracer and anti-Corticosterone antibody were then added, and samples were incubated for 16 h at 4°C . Subsequently, precipitant solution and an equal volume of polyethylene glycol were added to each sample, which was centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4°C . The supernatant was discarded, and

radioactivity in the pellet was quantified using a Genesys (LTI Laboratory Technologies) γ -counter. All samples were analyzed in duplicate, and blood corticosterone concentrations are expressed in ng/ μ L.

Statistical Analysis

Normality of the data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test. Parametric analyses were applied when data met the assumption of normality. Behavioral tests, hippocampal IBA-1 optical density (OD), and the number of IBA-1+ cells were analyzed by unpaired Student's *t*-test. The number of branches immediately after restriction was analyzed by unpaired Student's *t*-test, while the number of intersections was evaluated by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test. Parametric data are presented as mean $\pm$ standard error (SEM).

When data did not meet the assumption of normality, non-parametric tests were used. Specifically, the number of branches after 4 h of rest was analyzed by the Mann–Whitney U test. Hippocampal LFPs were analyzed by Student's *t*-test, except for total spectral power, which was analyzed using the Wilcoxon signed-rank test. Non-parametric data are presented as median with range.

All statistical analyses were performed with Prism 10 (GraphPad Software), and statistical significance was set at $p < 0.05$. Grubb's test with $\alpha = 0.05$ was used to determine outliers that were excluded.

Results

Ten Days of Sleep Restriction Induce Region-Specific Changes in Hippocampal IBA-1 Immunoreactivity and Microglial Morphology

Since different sleep deprivation and sleep restriction protocols induce changes in the expression of several macrophage/microglial markers [31, 32], we evaluated hippocampal IBA-1 immunoreactivity (IR) immediately after the MMPM protocol and after 4 h of recovery sleep.

In the CA1 region (Fig. 2A), SR animals showed a significant increase in IBA-1 IR immediately after restriction compared with controls (Student's *t*-test, $t = 3.046$, $df = 6$, $p = 0.0226$; Fig. 2B). In contrast, no differences were observed in CA3 IR (Student's *t*-test, $t = 1.087$, $df = 6$, $p = 0.3186$; Fig. 2I). Notably, the increase in CA1 IBA-1 IR was not associated with changes in the number of IBA-1+ cells (Student's *t*-test, $t = 0.1823$, $df = 6$, $p = 0.4307$; Fig. 2C). Conversely, the CA3 region displayed a significant increase in IBA-1+ cell number (Student's *t*-test, $t = 3.698$,

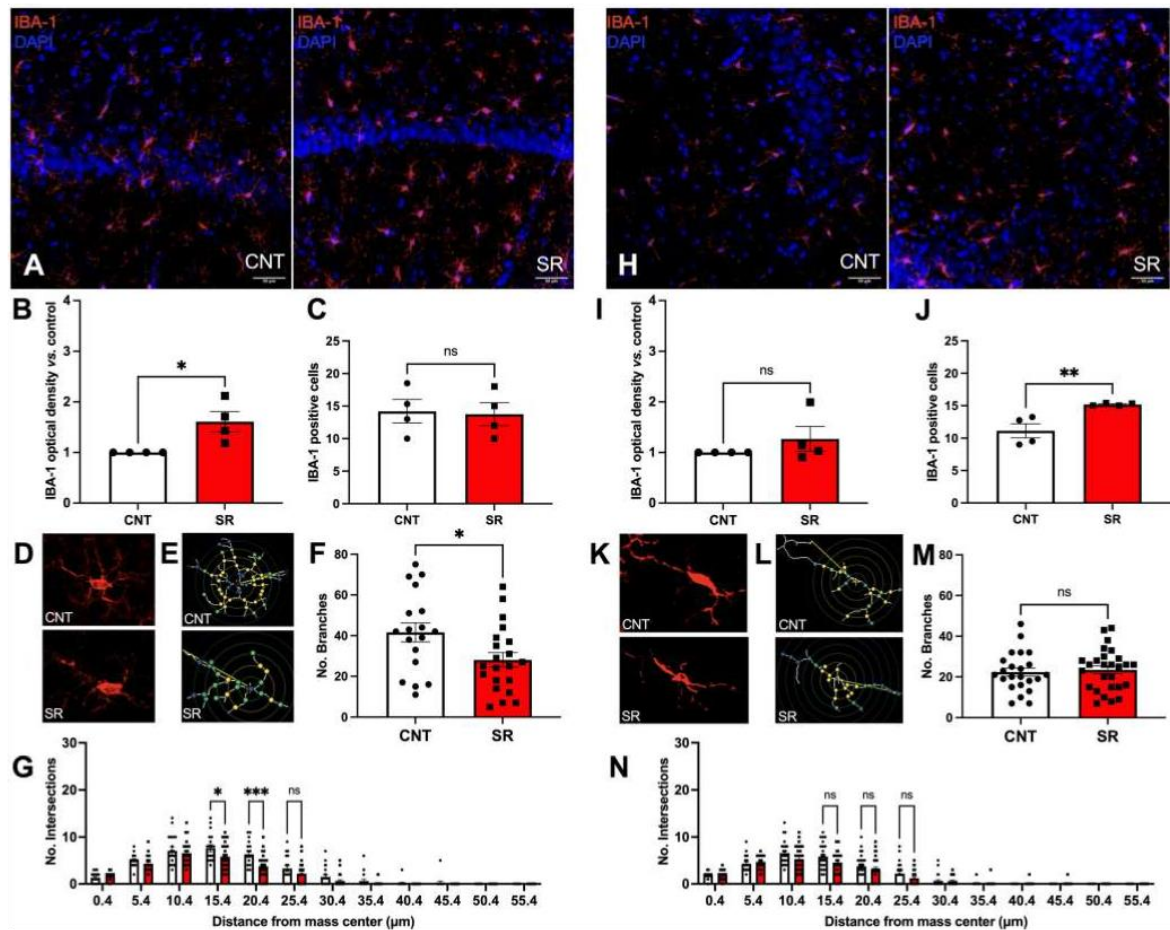


Fig. 2 Ten days of sleep restriction alters hippocampal IBA-1 positive cells immediately after the MMPM protocol. **A** Representative images of IBA-1 positive cells (red) and cell nuclei (DAPI, blue) in the CA1 region of control (CNT) and sleep-restricted (SR) animals. Scale bar: 50 μ m. **B** Optical density (OD) of IBA-1 immunoreactivity in CA1 for CNT (white bars) and SR (red bars) animals. **C** Number of IBA-1+DAPI positive cells in CA1. **D** Representative images of IBA-1 positive cells from CNT and SR animals. **E** Binary and skeletonized versions of the images in D. Concentric circles (5 μ m apart) were plotted around the cell center of mass, with colored circles indicating branch intersections. **F** Number of branches per CA1 IBA-1 positive cell. **G** Number of intersections per CA1 IBA-1 positive cell. **H** Representative images of IBA-1 positive cells (red) and nuclei (blue) in CA3. Scale bar: 50 μ m. **I** Optical density of IBA-1 immuno-

reactivity in CA3. **J** Number of IBA-1+DAPI positive cells in CA3. **K** Representative images of IBA-1 positive cells in CNT and SR animals. **L** Binary and skeletonized versions of the images in K, with concentric circles (5 μ m apart) plotted around the cell center of mass; colored circles indicate branch intersections. **M** Number of branches per CA3 IBA-1 positive cell. **N** Number of intersections per CA3 IBA-1 positive cell. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, except for the number of branches, which is shown as median with range. Statistical analysis: optical density, IBA-1 positive cells, and intersections were analyzed with unpaired Student's t-tests; the number of branches was analyzed with the Mann-Whitney test. Two-way ANOVA was used for Sholl intersection analysis. Asterisks represent statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

df=6, $p = 0.0051$; Fig. 2J), despite no changes in IR between CNT and SR animals.

Skeleton analysis revealed a reduction in branch number in CA1 of SR rats (Mann-Whitney $U = 111.5$, $p = 0.0142$; Fig. 2F). In addition, Sholl analysis in CA1 showed that SR IBA-1 + cells had significantly fewer intersections than those of the CNT group (Two-way ANOVA, $F [1, 40] = 4.706$, $p = 0.0360$; Fig. 2G), with differences at 15.4 μ m ($p =$

0.0271) and 20.4 μ m ($p = 0.0001$), indicating that 10 days of SR induced morphological changes consistent with shorter and less ramified processes in CA1 microglia/macrophages.

In contrast, CA3 IBA-1 + cells showed no changes in either branch number (Mann-Whitney $U = 281.5$, $p = 0.2891$; Fig. 2M) or number of intersections (Two-way ANOVA, $F [1, 49] = 1.579$, $p = 0.2148$; Fig. 2N) after SR. Taken together, our CA1 and CA3 IBA-1 IR and morphological analyses

demonstrate that SR alters hippocampal IBA-1 expression and microglial morphology in a region-specific manner.

Hippocampal IBA-1 Immunoreactivity is Partially Restored After 4 h of Resting Opportunity, While Microglial Morphology Remains Altered

Next, we evaluated hippocampal IBA-1 IR and morphology after 4 h of recovery sleep. In CA1, no differences were found between CNT and SR groups in IBA-1 IR (Student's t-test,

$t=1.269$, $df=6$, $p=0.1258$; Fig. 3B) or in the number of IBA-1+ cells (Student's t-test, $t=0.5595$, $df=6$, $p=0.2980$; Fig. 3C). Similarly, CA3 IBA-1 IR did not differ between groups (Student's t-test, $t=1.689$, $df=6$, $p=0.0711$; Fig. 3I). However, in contrast to the increase observed immediately after SR, the number of IBA-1+ cells in CA3 was lower in SR animals compared to controls after 4 h of rest (Student's t-test, $t=2.395$, $df=6$, $p=0.0268$; Fig. 3J).

Morphological analyses revealed persistent alterations despite the resting period. Skeleton analysis showed that

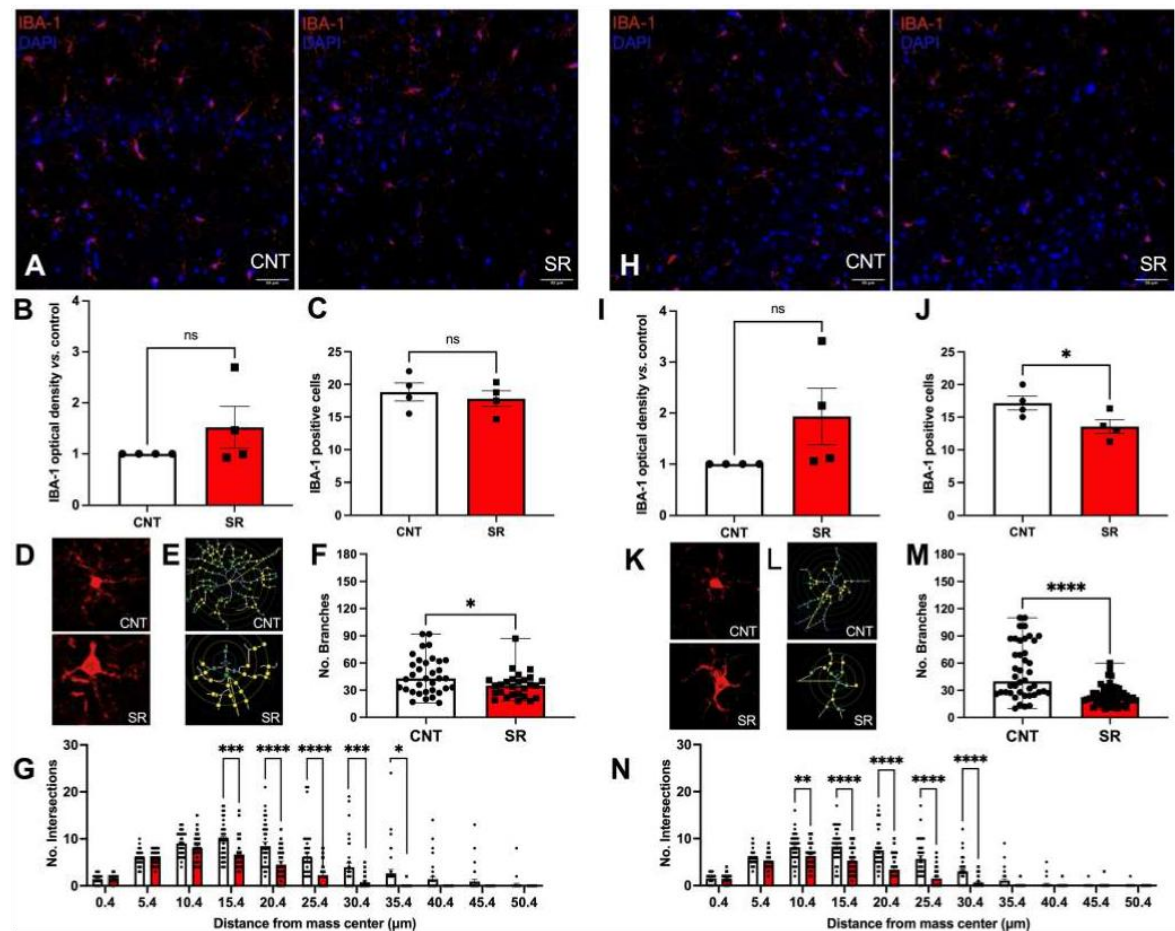


Fig. 3 Alterations in hippocampal IBA-1 positive cells persist after 4 h of rest following 10 days of sleep restriction. **A** Representative images of IBA-1 positive cells (red) and nuclei (DAPI, blue) in CA1 of CNT and SR animals. Scale bar: 50 μ m. **B** Optical density of IBA-1 immunoreactivity in CA1. **C** Number of IBA-1+DAPI positive cells in CA1. **D** Representative IBA-1 positive cells from CNT and SR rats. **E** Binary and skeletonized versions of D. Concentric circles (5 μ m apart) plotted around the cell center of mass; colored circles indicate branch intersections. **F** Number of branches in CA1 IBA-1 positive cells. **G** Sholl analysis showing number of intersections in CA1. **H** Representative images of IBA-1 positive cells (red) and nuclei (blue) in CA3. Scale bar: 50 μ m. **I** Optical density of IBA-1 immunoreac-

ity in CA3. **J** Number of IBA-1+DAPI positive cells in CA3. **K** Representative IBA-1 positive cells from CNT and SR rats. **L** Binary and skeletonized versions of K, with concentric circles (5 μ m apart); colored circles indicate branch intersections. **M** Number of branches in CA3 IBA-1 positive cells. **N** Sholl analysis showing number of intersections in CA3. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, except for branch number (median with range). Statistical analysis: optical density, IBA-1 positive cells, and intersections were analyzed with unpaired Student's t-tests; branch number with the Mann-Whitney test; intersections with two-way ANOVA. Asterisks indicate statistical significance: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

CA1 IBA-1 + cells in SR rats still had fewer branches compared to controls (Mann–Whitney $U = 320.5$, $p = 0.0220$; Fig. 3F). Likewise, CA3 IBA-1 + cells also exhibited a significant reduction in branch number after SR (Mann–Whitney $U = 461.5$, $p < 0.0001$; Fig. 3M). Sholl analysis further confirmed these findings. In CA1, SR IBA-1 + cells had significantly fewer intersections than controls after 4 h of rest (Two-way ANOVA, $F [1, 61] = 11.29$, $p = 0.0014$; Fig. 3G). Similarly, CA3 IBA-1 + cells showed a pronounced reduction in intersections compared to controls (Two-way ANOVA, $F [1, 73] = 29.28$, $p < 0.0001$; Fig. 3N).

Together, these results indicate that although IBA-1 IR in the hippocampus shows partial recovery after a short resting opportunity, microglial morphology remains altered, suggesting that 4 h of sleep is insufficient to normalize the structural changes induced by subchronic SR.

Hippocampal Synaptophysin Immunoreactivity is Down-Regulated Even After 4 h of Resting Opportunity

Changes in hippocampal IBA-1 IR have been associated with alterations in microglial function. Previous studies have shown that after SR, CNS microglia increase the phagocytosis of synaptic proteins [17]. To assess whether the changes in IBA-1 expression observed here could be linked to alterations in synaptic density, we next analyzed the expression of the presynaptic vesicle protein synaptophysin (Syn).

Western blot analysis of hippocampal homogenates revealed no significant differences in Syn expression between CNT and SR animals, either immediately after restriction (Student's t -test, $t = 1.402$, $df = 9$, $p = 0.1946$; Fig. 4B) or after 4 h of recovery sleep (Student's t -test, $t = 0.1018$, $df = 8$, $p = 0.9215$; Fig. 5B).

Because homogenates represent the entire hippocampus, we next evaluated Syn expression specifically in CA1 and CA3 using immunofluorescence (IF). Immediately after SR, Syn IR was significantly decreased in SR rats compared to controls in both CA1 (Student's t -test, $t = 5.671$, $df = 5$, $p = 0.0024$; Fig. 4D) and CA3 (Student's t -test, $t = 4.950$, $df = 6$, $p = 0.0026$; Fig. 4F).

Importantly, Syn IR remained reduced even after 4 h of rest. SR rats continued to show significantly lower Syn levels in CA1 (Student's t -test, $t = 7.563$, $df = 6$, $p = 0.0001$; Fig. 5D) and CA3 (Student's t -test, $t = 2.068$, $df = 6$, $p = 0.0420$; Fig. 5F) compared to controls.

Together, these findings indicate that SR leads to a persistent reduction in hippocampal Syn expression that is not reversed by a short recovery period, consistent with disrupted presynaptic integrity.

ERK Phosphorylation Increased After the Last 4 h of Resting

Since Syn expression was reduced after the SR protocol and remained decreased after a short resting opportunity, we next evaluated whether extracellular signal-regulated kinase (ERK) expression and phosphorylation (activation) were affected by SR. ERK has previously been shown to enhance hippocampal synaptic plasticity and promote long-term potentiation induction, while increased ERK phosphorylation correlates with higher synaptophysin immunoreactivity, reflecting enhanced synapse formation and/or maturation [33, 34]. Based on this evidence and our Syn results, we hypothesized that a reduction in the pERK/ERK ratio would be observed in the hippocampus after SR and would persist after the resting opportunity.

Contrary to this hypothesis, the hippocampus of SR rats showed no significant change in the pERK/ERK ratio immediately after the restriction compared with CNT animals (Student's t -test, $t = 0.8952$, $df = 10$, $p = 0.3917$; Fig. 6B). Furthermore, after 4 h of rest, the SR group exhibited a significant increase in the pERK/ERK ratio relative to controls (Student's t -test, $t = 4.105$, $df = 7$, $p = 0.0045$; Fig. 6D). These data indicate that recovery sleep induces a rebound—possibly compensatory—ERK activation in the hippocampus of SR animals.

Hippocampal Electrical Activity is Impaired During the 4 h of Rest Following 10 Days of SR

Since the hippocampal pERK/ERK ratio increased while Syn IR and IBA-1 morphology remained altered after 4 h of rest, we hypothesized that hippocampal electrical activity during this recovery period would also be impaired. To test this, we implanted a recording electrode in CA1, the final relay of the trisynaptic pathway, where LTP is promoted during memory consolidation [35, 36].

CA1 total spectral power was significantly increased in SR animals compared to controls (Wilcoxon test, $W = 21$, $p = 0.0312$; Fig. 7B). The total signal frequency was also elevated (Student's t -test, $t = 6.045$, $df = 5$, $p = 0.0018$; Fig. 7C). Analysis of spectral relative power revealed a significant reduction in low-frequency activity: delta (Student's t -test, $t = 3.630$, $df = 5$, $p = 0.0151$; Fig. 7D) and theta waves (Student's t -test, $t = 3.639$, $df = 5$, $p = 0.0149$; Fig. 7E). In contrast, high-frequency alpha (Student's t -test, $t = 3.394$, $df = 5$, $p = 0.0194$; Fig. 7F) and beta waves (Student's t -test, $t = 6.580$, $df = 5$, $p = 0.0012$; Fig. 7G) were significantly increased, while gamma activity remained unchanged (Student's t -test, $t = 0.6334$, $df = 5$, $p = 0.5543$; Fig. 7H).

Together, these results indicate that hippocampal electrical activity is markedly altered during the 4-h rest period

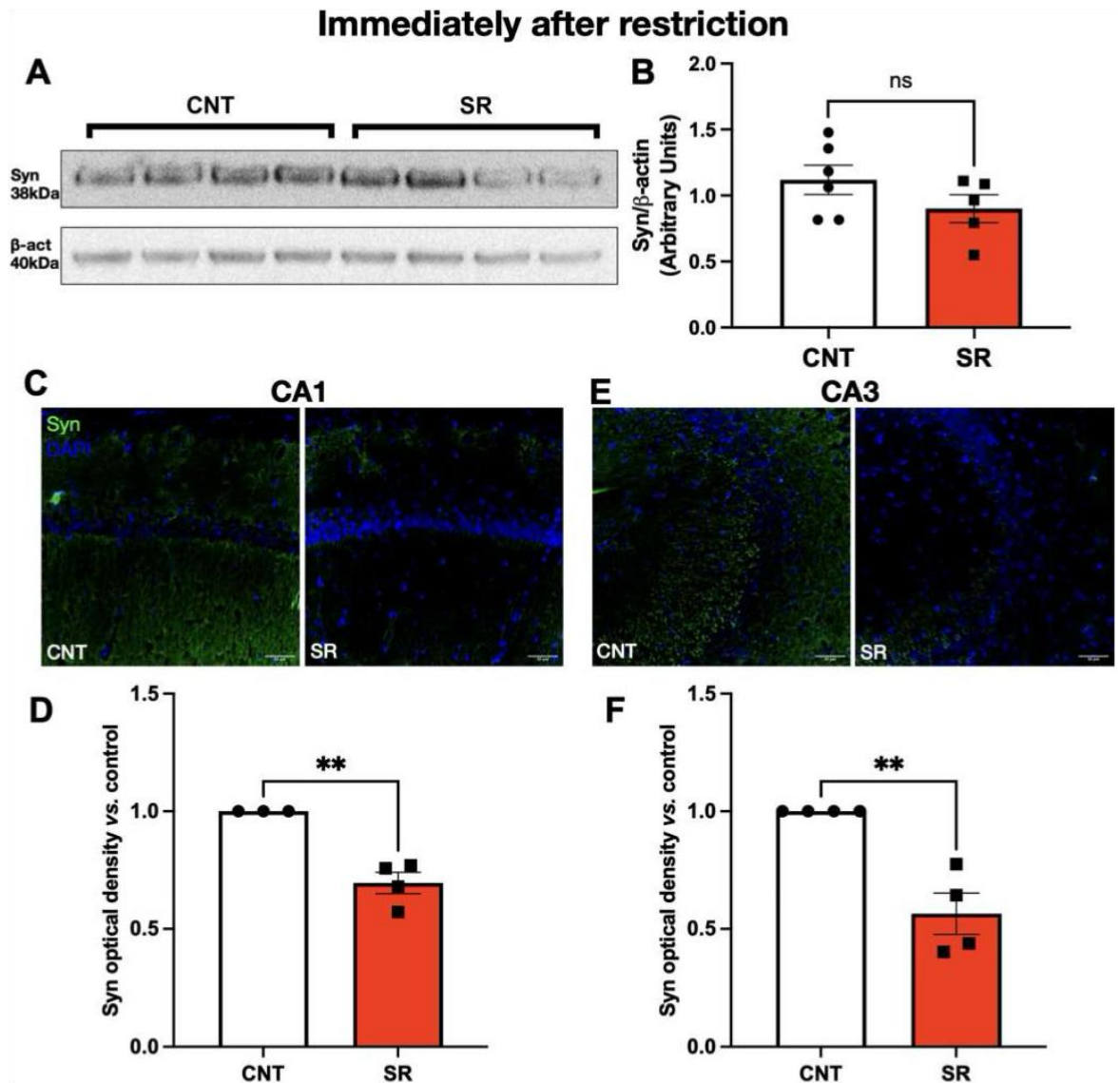


Fig. 4 Ten days of sleep restriction decreases hippocampal synaptophysin levels immediately after the MMPM protocol. **A** Representative Western blot of synaptophysin (Syn, 38 kDa) and β -actin (40 kDa) from control (CNT) and sleep-restricted (SR) animals. **B** Quantification of Syn/ β -actin optical density ratio in CNT (white bars) and SR (red bars). **C** Representative immunofluorescence images of Syn (green) and nuclei (DAPI, blue) in the CA1 region of CNT and SR rats.

Scale bar: 50 μ m. **D** Quantification of Syn optical density in CA1. **E** Representative immunofluorescence images of Syn (green) and nuclei (blue) in the CA3 region. Scale bar: 50 μ m. **F** Quantification of Syn optical density in CA3. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with unpaired Student's *t*-tests. Asterisks indicate statistical significance: ***p* < 0.01

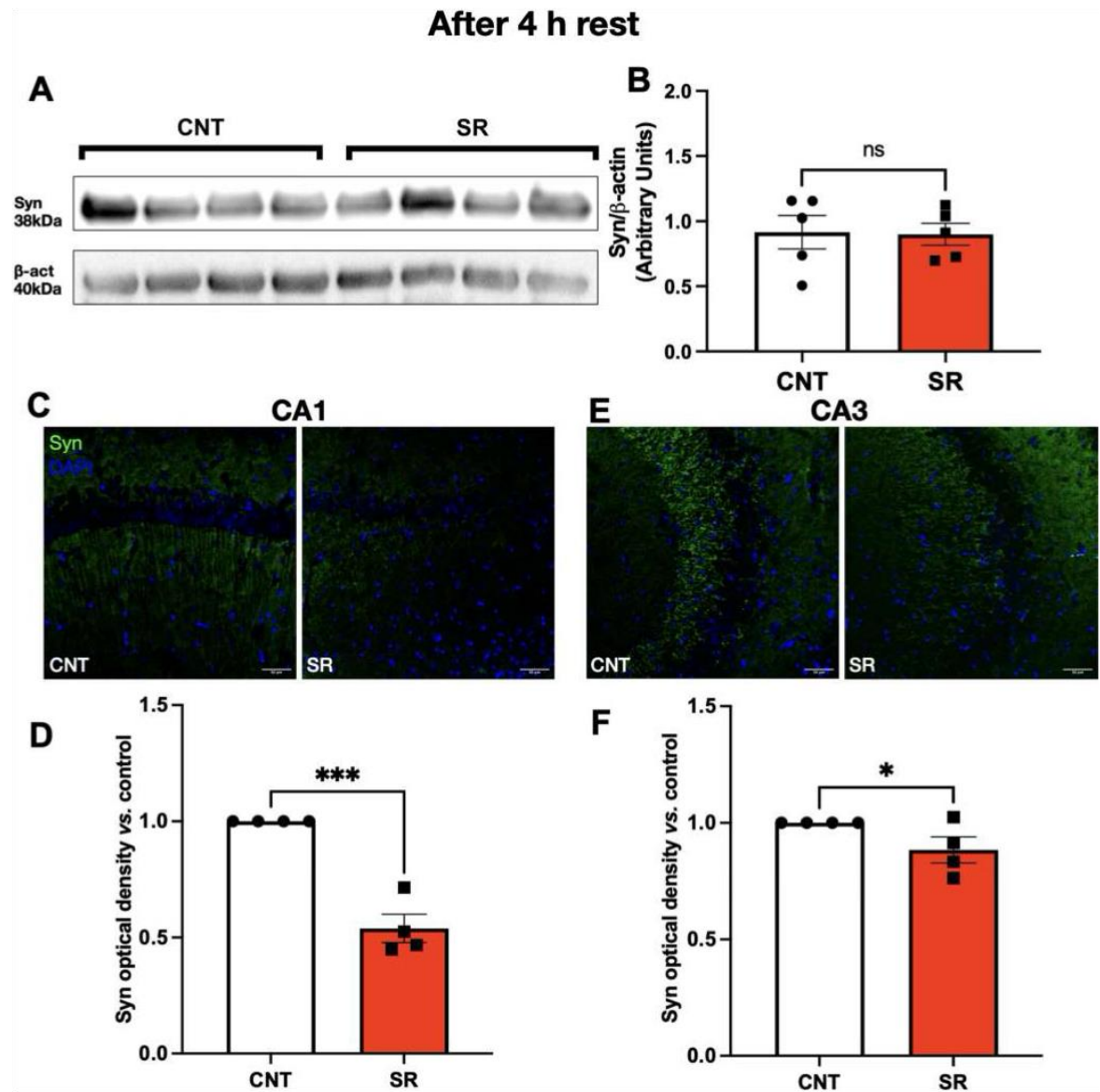


Fig. 5 Decrease in hippocampal synaptophysin levels induced by 10 days of sleep restriction persists after 4 h of rest. **A** Representative Western blot of synaptophysin (Syn, 38 kDa) and β -actin (40 kDa) from control (CNT) and sleep-restricted (SR) animals. **B** Quantification of Syn/ β -actin optical density ratio in CNT (white bars) and SR (red bars). **C** Representative immunofluorescence images of Syn (green) and nuclei (DAPI, blue) in the CA1 region of CNT and SR rats.

Scale bar: 50 μ m. **D** Quantification of Syn optical density in CA1. **E** Representative immunofluorescence images of Syn (green) and nuclei (blue) in the CA3 region. Scale bar: 50 μ m. **F** Quantification of Syn optical density in CA3. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with unpaired Student's t-tests. Asterisks indicate statistical significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

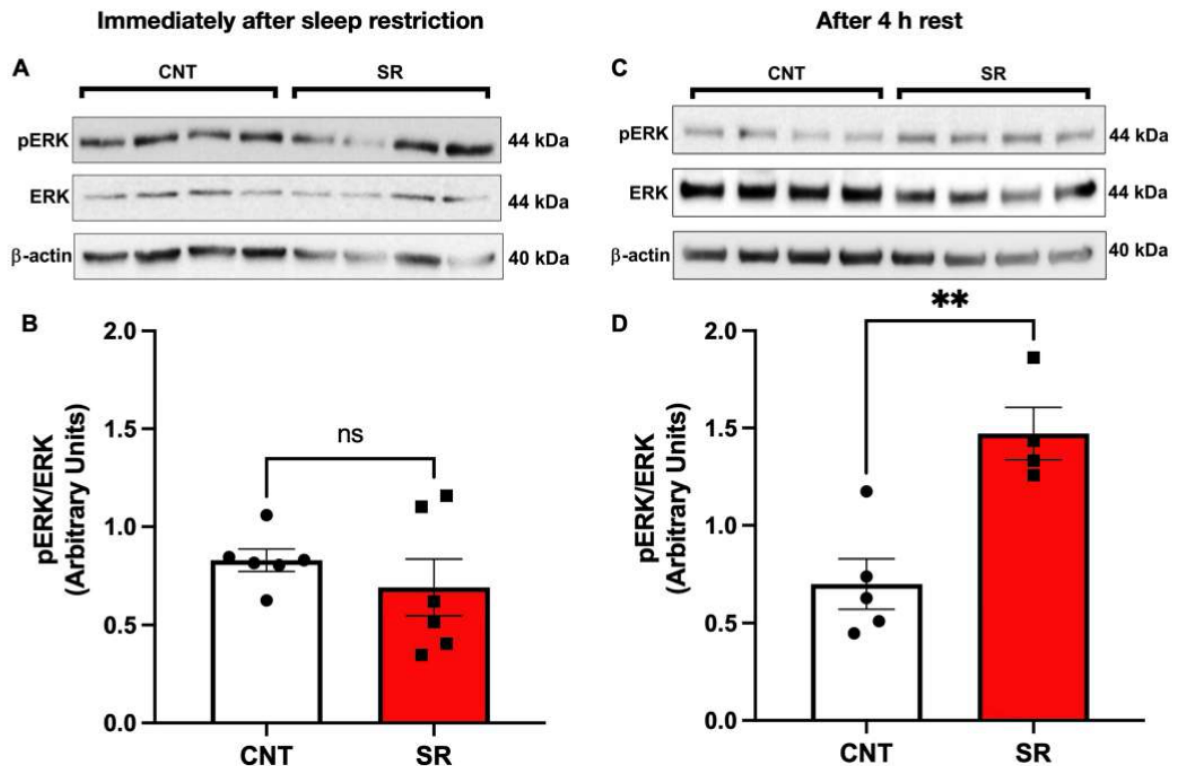


Fig. 6 Sleep restriction increases the hippocampal pERK/ERK ratio after 4 h of rest. **A** Representative Western blot of phosphorylated ERK (pERK, 42/44 kDa), total ERK (42/44 kDa), and β -actin (40 kDa) from control (CNT) and sleep-restricted (SR) animals immediately after the SR protocol. **B** Quantification of pERK/ERK optical density ratio in CNT (white bars) and SR (red bars) immediately after SR. **C** Repre-

sentative Western blot of pERK, total ERK, and β -actin from CNT and SR animals after 4 h of recovery. **D** Quantification of pERK/ERK optical density ratio in CNT and SR after 4 h of rest. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with unpaired Student's *t*-tests. Asterisks indicate statistical significance: ***p* < 0.01

following subchronic SR, with a shift from low-frequency (delta/theta) to higher-frequency (alpha/beta) oscillations.

Explicit Memory is Impaired After 4 h of Rest Following 10 Days of SR

Having observed that hippocampal CA1 electrical activity was altered during the 4-h rest opportunity, we hypothesized that SR animals would exhibit deficits in explicit memory after this period. To test this, we evaluated memory performance using the novel object recognition test (NORT) and the object location test (OLT).

During NORT training, CNT and SR animals showed similar total exploration times for objects A and A' (Student's *t*-test, *t* = 1.092, *df* = 16, *p* = 0.2910; Fig. 8A) and no differences in the percentage of exploration of object A' (Student's *t*-test, *t* = 1.383, *df* = 17, *p* = 0.1845; Fig. 8B). This indicates that both groups explored the objects equally during training and that neither object was preferred.

One hour after training, during the test phase, both groups displayed comparable total exploration times (Student's *t*-test, *t* = 1.122, *df* = 17, *p* = 0.2775; Fig. 8C). However, SR animals spent significantly less time exploring the novel object (Student's *t*-test, *t* = 2.269, *df* = 17, *p* = 0.0366; Fig. 8D), indicating impaired short-term recognition memory formation.

In the OLT training session, no differences were observed between groups in total exploration time (Student's *t*-test, *t* = 2.063, *df* = 10, *p* = 0.0661; Fig. 8E) or in the percentage of exploration of object A' (Student's *t*-test, *t* = 0.4138, *df* = 10, *p* = 0.6878; Fig. 8F). Similarly, during the OLT test trial, total exploration times did not differ (Student's *t*-test, *t* = 0.1569, *df* = 10, *p* = 0.8785; Fig. 8G). In contrast, when analyzing exploration time for the relocated object A', SR rats spent significantly less time exploring it compared to controls (Student's *t*-test, *t* = 2.398, *df* = 10, *p* = 0.0374; Fig. 8H), indicating impaired contextual memory.

Importantly, neither total exploration times during training and testing nor corticosterone levels (Figure S6) differed

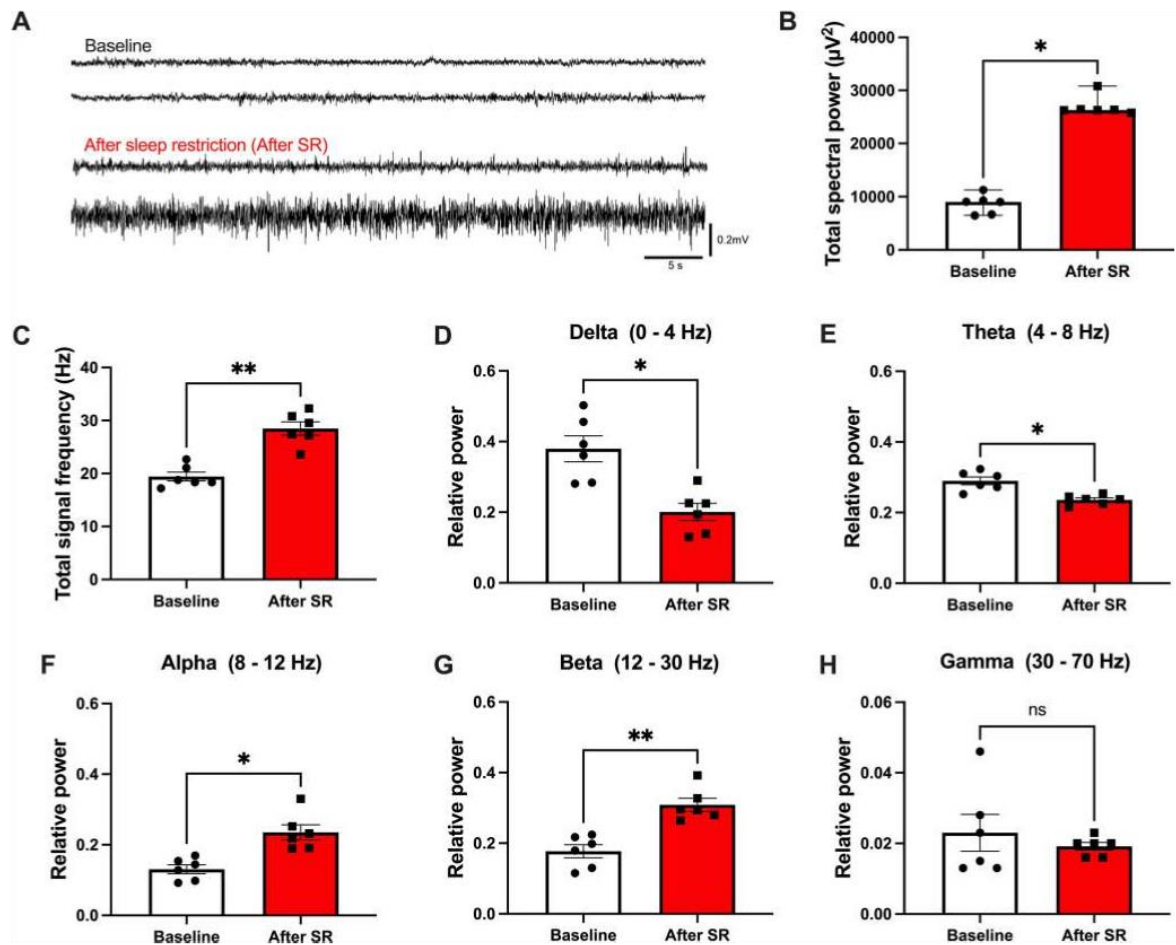


Fig. 7 Sleep restriction alters hippocampal electrical activity during the 4 h recovery period. **A** Representative local field potential (LFP) traces of the hippocampus at baseline (before the 10-day SR protocol) and during the 4 h recovery period after SR. **B** Total spectral power. **C** Total signal frequency for baseline (white bars) and after SR (red bars). **D–H** Relative power of delta, theta, alpha, beta, and gamma waves recorded during the 4 h recovery period. Results are expressed

as mean $\pm$ SEM for six animals, except for total spectral power, which is expressed as median with range. LFP recordings after SR were compared with baseline recordings from the same animals. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test, except for total spectral power, which was analyzed with the Wilcoxon test. Asterisks indicate statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

between groups, indicating that reduced exploration of the novel or relocated object in SR animals was not attributable to decreased arousal, sleepiness, or stress.

Discussion

The origins of SR-induced alterations in hippocampal neural network activity and how they relate to cognitive impairments observed after prolonged sleep disturbances remain poorly understood. In the present work, we found that the hippocampus of rats subjected to 10 days of SR using the MMPM protocol presents microglial alterations that persist

after 4 h of sleep opportunity. In addition, the expression of synaptophysin, a presynaptic protein, and the ERK phosphorylation ratio, both involved in hippocampal long-term potentiation, were impaired after a short resting period. These results may be associated with alterations in hippocampal electrical activity during the last resting period of the 10-day SR protocol.

Hippocampal-Dependent Memory is Affected by SR

The detrimental effects of sleep restriction have been widely studied [37], whereas the recovery process has received far less attention.

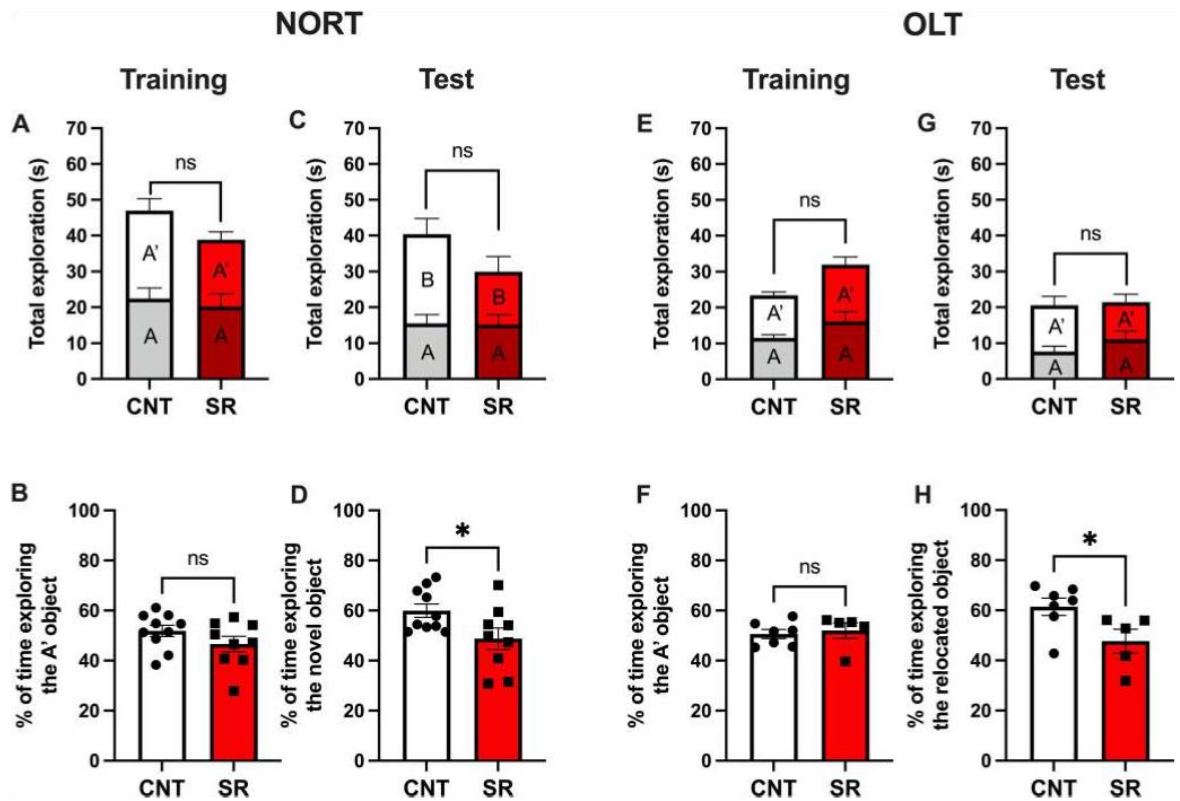


Fig. 8 Explicit memory is impaired after 4 h of recovery following 10 days of sleep restriction. **A** Total exploration time during the training trial in the novel object recognition test (NORT) for control (CNT, white bars) and sleep-restricted (SR, red bars) animals. **B** Percentage of exploration time of object A' during the training trial. **C** Total exploration time during the testing trial. **D** Percentage of exploration time of the novel object B during the testing trial. **E** Total exploration time

during the training trial of the object location test (OLT) for CNT and SR animals. **F** Percentage of exploration time of object A' during the training trial. **G** Total exploration time during the testing trial. **H** Percentage of exploration time of the relocated object A' during the testing trial. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with unpaired Student's t-tests. Asterisks indicate statistical significance: * $p < 0.05$

In SR rats, BBB permeability is impaired in areas such as the insular cortex, hippocampus, hypothalamus, basal ganglia, and cerebellum after 10 days of SR. A brief 2 h sleep recovery period restored BBB function in the cingulate gyrus, parietal and insular cortices, hypothalamus, basal nuclei, amygdala, thalamus, septal, and preoptic areas [18]. However, other regions including the hippocampus, rhinal, somatosensory, motor, auditory, orbitofrontal, and retrosplenial cortices did not recover [18].

Furthermore, a meta-analysis of sleep-deprived mice indicated that 3 h of sleep recovery is not enough to restore basal hippocampal gene expression [19]. In humans, two days of sleep recovery after one night of acute sleep deprivation did not restore episodic memory, despite hippocampal connectivity returning to baseline [15].

Another study tracked the effects of early-life SR induced by the MMPM, 20 h SR per day for 14 days beginning at postnatal day (PND) 28, observed impairments in long-term,

but not short-term, memory at PND 42. This effect persisted until adulthood (PND 85) and was associated with reduced hippocampal neurogenesis and significantly less astrocytic aquaporin-4 (AQP4) immunoreactivity [38].

Some of the similarities among the above mentioned studies include alterations in neuronal counts and neurogenesis, reductions in the expression of synaptic proteins, and decreased performance in tests that evaluate learning and memory. Taken together, these data suggest that SR induces effects on memory that might persist over unknown time periods.

One challenge for comparing the available data is that each study employs different animal models, SR methods, durations, times of day, and moments of cognitive and mechanistic evaluations [39]. These differences complicate cross-study comparisons. Sequential evaluations at multiple time points following SR protocols may be necessary to

determine the mechanisms involved in SR-induced cognitive impairments and their short- and long-term consequences.

Microglial Function is Altered After SR

Microglial physiological function, morphology, and dynamics are regulated by spontaneous and evoked neuronal activity and vice versa. Studies have found that sleep modulates microglial morphodynamics through contact-dependent interactions such as CX3CR1, while Gi microglial signaling mediated by P2Y12 receptors regulates sleep architecture [40, 41]. In the present study, we observed that after 10 days of SR, hippocampal microglia showed significantly fewer branches. This decrease persisted after 4 h of sleep opportunity, indicating that this resting period is not sufficient to normalize microglial morphology.

A less ramified microglial profile is associated with phagocytosis [42–46]. Previous studies have shown that 24 h after SR, mice exhibit increased hippocampal microglial cell number, upregulated vesicular CD68 and C3aR, and decreased Syn and PSD-95 co-localization in CA1, which indicates reduced synaptic contacts due to increased phagocytic microglial activity [17]. In our study, IBA-1 IR and IBA-1 + cells did not remain elevated after a 4-h resting opportunity; instead, we observed a reduction in ramification of IBA-1 + cells, indicating a shift toward a reactive phenotype. Furthermore, we observed a significant decrease in both CA1 and CA3 Syn immunoreactivity immediately after SR, which persisted after 4 h of rest. We did not assess whether SR microglia contained Syn engulfments; however, the observed reduction in Syn could be associated with increased microglial phagocytic activity. Future studies should assess whether microglial morphological changes after 4 h of rest are associated with increased phagocytic activity and contribute to Syn reduction.

A less ramified phenotype has also been associated with microglial-mediated neuroinflammation [47]. Neuroinflammatory models such as brain infarcts or intracerebroventricular lipopolysaccharide injections are known to induce a less ramified microglial morphology [48, 49]. Similarly, studies have shown reduced ramification length of cortical microglia in SR mice [50]. Furthermore, IL-1 β , IL-6, and TNF- α increase in the hippocampus and/or prefrontal cortex of SR mice [51, 52], indicating that the microglial morphological changes observed in the present study may be associated with a pro-inflammatory profile.

Microglial morphology has also been associated with neuronal oscillations. In mice subjected to extended waking, keeping animals awake for 3 h during their usual resting phase enhanced cortical theta/gamma frequency, which was associated with increased alertness and microglial ramification in the somatosensory cortex and hippocampus.

When waking was extended to 9 h, microglial ramifications decreased in both regions, which was associated with a gradual increase in slow wave activity (delta) [26]. These results in two acute paradigms are consistent with our data, which show a decrease in ramification after prolonged SR associated with reduced hippocampal theta frequency. Although the two studies differed in duration and in the signals recorded (cortical EEGs vs. hippocampal LFPs), both converge on the association between microglial ramification and theta activity, indicating that this rhythm may be important for maintaining microglial homeostasis, or conversely, that microglial state may influence theta activity.

Microglial P2Y12–Gi activation promotes NREM sleep by reducing norepinephrine cortical transmission [41]. As mentioned before, the loss of microglial homeostatic function is observed during SR; therefore, we hypothesize that changes in hippocampal electrical activity after SR could be associated with changes in microglial activity, specifically with Gi activation. Future studies should assess whether hippocampal microglial Gi signaling is altered during SR and whether its restoration could prevent the cognitive impairments observed.

Hippocampal Electrical Activity is Altered After SR

Hippocampal LFPs are characterized by slow rhythmic activity, mainly represented by the theta (4–8 Hz) rhythm that organizes neuronal firing rate and is associated with the processing of environmental signals and memory encoding [53–55]. Previous studies have determined that theta rhythm in the entorhinal–CA1 pathway is necessary for memory encoding, while theta rhythm in the Schaffer collateral pathway underlies memory consolidation and retrieval [53]. In the present study, SR animals were unable to recognize the novel object even when they were allowed to sleep for 4 h following the MMPM protocol. This effect could be associated with the reduced amount of theta rhythm observed during the 4 h of rest.

In addition, hippocampal gamma frequency is important for information transfer between CA3 and CA1 and plays a role in memory consolidation and retrieval [53, 56]. The CA3–CA1 pathway displays distinctive theta–gamma coupling during exploratory and memory-guided behaviors [35, 57]; disrupting hippocampal theta oscillation during REM sleep after learning prevents memory consolidation [18]. In the present study, we did not observe changes in gamma relative power during the 4 h resting opportunity. Although there are no studies directly addressing whether theta–gamma coupling occurs during sleep, future studies should assess whether SR interferes with hippocampal theta–gamma coupling during exploratory tasks and across sleep stages.

Furthermore, stimulation of the entorhinal cortex (EC) at low (1 Hz) or high (20 Hz) frequencies fails to elicit long-term potentiation (LTP) in CA1 compared with theta frequency stimulation (5 Hz) [58]. This is because the connections between the DG and CA3 serve as a filter, preventing low and high frequencies from reaching CA1 [59]. Here, we observed that SR increased high-frequency alpha and beta rhythms (8–12 Hz and 12–30 Hz, respectively) in the hippocampus during the resting opportunity. This shift from theta to higher-frequency activity in the hippocampus may contribute to decreased performance during behavioral tests. Indeed, hippocampal theta frequency has been shown to induce LTP in CA1 [60], and optogenetic inhibition of hippocampal theta during REM sleep impairs subsequent performance in the NORT [36]. Future studies should investigate whether reduced theta rhythm after SR is responsible for the associated memory impairments and altered Syn expression and ERK activation.

The homeostatic regulation of sleep increases sleep pressure in proportion to the duration of wakefulness; when sleep time is reduced, the organism compensates through a process known as sleep rebound [61]. In rodents, EEG studies have shown an immediate compensatory increase in cortical NREM delta power and in the percentage of NREM sleep following acute total sleep deprivation [61–63]. However, this compensatory response is no longer evident under repeated sleep restriction. Kim et al. reported that after 5 consecutive days of sleep restriction (20 h SR followed by 4 h of rest each day), mice failed to exhibit a compensatory increase in cortical NREM delta power. Moreover, cortical NREM delta power remained below baseline levels for two additional days after the restriction protocol ended [64].

At the hippocampal level, theta rhythm is normally upregulated during NREM [65], while theta oscillations during REM are critical for both memory consolidation and selective forgetting [66]. In a related study using 6 days of sleep deprivation, hippocampal EEG revealed that training shifted activity from irregular mixed waves to rhythmic patterns; however, the proportion of theta (4–8 Hz) increased only transiently in the SR group (restricted to the first two training days), whereas control animals displayed a sustained theta enhancement while awake [67]. To our knowledge, no studies have explicitly measured or documented delta/theta rebound in hippocampal LFP recordings during NREM or REM following sleep restriction. However, our data show no increase in delta or theta power after 10 days of SR, suggesting that repeated sleep loss disrupts compensatory rebound mechanisms both during learning and across sleep states. Importantly, prospective studies will be needed to determine whether subchronic protocols similar to ours may also lead to persistent effects comparable to those described in chronic paradigms, such as the study by

Owen et al. [31], in which long-term spatial memory deficits and hippocampal pathology were evident months after the restriction period.

Syn and ERK Changes During SR

Syn is a presynaptic vesicle protein involved in synaptic transmission, and its expression positively correlates with learning and memory performance [68–70]. Processes such as LTP are associated with increased Syn expression and ERK activity [71, 72]. A decrease in hippocampal ERK activity and Syn expression has been reported in *Ndufs4* knockout mice [73]. These findings indicate that ERK activity and Syn expression are closely linked. In our study, we observed a reduction in Syn and an increase in pERK after a 4 h resting opportunity, indicating changes in synaptic transmission.

ERK activation is essential for the induction and maintenance of LTP by modulating AMPA receptor trafficking [72]. Moreover, administration of U0126, an ERK inhibitor, impairs hippocampal LTP induced by 5 Hz (theta rhythm) stimulation [33]. This suggests that hippocampal LTP induced by theta rhythm is ERK-dependent. Therefore, the increase in pERK after SR may be associated with processes other than LTP.

The ERK pathway also modulates the sleep–wake cycle. Specific ERK1/2 deletion or pharmacological inhibition increases wakefulness after 6 h of sleep deprivation in mice [74]. This suggests that ERK phosphorylation contributes to sleep pressure, the biological drive to sleep that accumulates with time awake. In the present study, pERK levels significantly increased after 4 h of rest. This could represent a compensatory effect of SR that enhances sleep pressure; however, it does not explain why pERK was not increased immediately after restriction.

The effects of SR on ERK modulation appear to depend on protocol duration. Acute SR/SD in Sprague–Dawley rats reduces hippocampal ERK phosphorylation [75–77]. These results contrast with our data, since we observed the opposite effect. This discrepancy may be explained by the acute nature of the protocols used by Guan et al., Ravassard et al., and Wang et al., compared with the subchronic character of ours. This interpretation is further supported by data from long-term SR protocols lasting up to 6 months, in which ERK phosphorylation is increased in the cerebellum [78]. In addition, the hippocampus of epileptic mice also presents elevated pERK [79, 80]. Collectively, these interventions involve profound homeostatic alterations, including upregulation of inflammatory mediators in the CNS [81, 82], indicating that pERK increases in response to either prolonged or extreme physiological challenges.

Activation of the ERK pathway is also required to initiate the inflammatory cascade in glial cells. Microglia isolated from 5xFAD mice show increased ERK phosphorylation [83], which is a critical regulator of microglial pro-inflammatory activation [84]. Moreover, ERK activation enhances microglial migration and proliferation in a rat model of neuropathic pain [85], and stimulation of this pathway increases phagocytic activity in cultured BV2 cells [86]. As previously noted, SR protocols promote pro-inflammatory processes in the CNS; therefore, the increase in pERK observed here may also be related to the up-regulation of inflammatory pathways.

Limitations of the Study

While our findings provide new insights into the effects of SR, a number of limitations remain. First, only male rats were included, since our previous work and direct references were performed in males, which facilitated comparisons across studies. However, we recognize that female subjects have been historically underrepresented in sleep research, and it is imperative to determine whether SR and recovery differentially affect the female hippocampus. Parallel studies in our group are currently being performed in females to directly address this question.

Second, we did not record EMG signals due to the high risk of infection during the MMPM protocol and the technical complexity of maintaining electrodes in a water-based paradigm. As a result, we could not formally score sleep stages to directly relate hippocampal rhythms to the different sleep phases, and our conclusions are therefore limited to hippocampal LFP recordings obtained during the recovery period.

Third, hippocampal LFPs were not recorded along the 20 h restriction phases, but only during the last 4 h of each cycle, as the MMPM protocol required animals to remain in the restriction cage in pairs to minimize isolation stress. However, pair housing introduced the possibility of electrode displacement due to animal interactions. Consequently, hippocampal network dynamics throughout the restriction phases could not be evaluated.

Fourth, we restricted our analysis to the immediate 4-h resting period following 10 days of SR; therefore, we cannot determine whether the observed alterations persist, normalize, or progress at later time points. Fifth, although we observed correlations between hippocampal electrical activity, microglial morphology, Syn expression, and ERK phosphorylation, the study design does not allow us to establish causal relationships. Finally, our mechanistic scope was limited: we did not directly assess microglial phagocytosis, inflammatory mediator levels, or additional signaling pathways that may contribute to the observed outcomes.

Likewise, the analysis was restricted to Syn as a presynaptic marker and ERK phosphorylation as a molecular correlate of plasticity.

Future studies should aim to describe additional parameters, including other synaptic proteins, inflammatory mediators, and extended LFP and behavioral analyses, to provide a more comprehensive understanding of hippocampal alterations induced by sleep restriction.

Conclusion

In the present work, we observed that hippocampal electrical activity is altered after 10 days of sleep restriction. Analysis of hippocampal LFPs during the immediate resting opportunity revealed increased alpha and beta rhythms together with decreased delta and theta waves compared to non-restricted rats, indicating that the long-term effects of SR may be associated with sustained deregulation of hippocampal neuronal and glial circuits. This study also demonstrates the persistence of alterations in microglial morphology, reduced Syn immunoreactivity, and an increased pERK/ERK ratio after resting, which may contribute to the cognitive impairments observed.

Although long-term effects of SR in the hippocampus have been previously reported, our study provides evidence linking these changes with hippocampal electrical activity. We cannot establish a causal relationship between hippocampal oscillations and SR-induced cognitive deficits; however, we identify potential cellular and molecular targets known to influence hippocampal activity that should be explored in future studies to prevent both short- and long-term consequences of SR. This is particularly relevant given that chronic sleep reduction in humans has been associated with an increased risk of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, a condition promoted by microglial pro-inflammatory activity and neuronal degeneration.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11064-025-04561-1>.

Acknowledgements JEGA and JJAA are PhD students of the Graduate Program in Experimental Biology at the Universidad Autónoma Metropolitana and recipients of SECIHTI scholarships (nos. 801573 and 790160, respectively). MRG and CPM are part of the AFINES program, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors thank the Unidad de Microscopía, Faculty of Medicine, UNAM, and its staff Biol. Ivonne Grisel Sánchez-Cervantes, Dr. Mónica Ramírez-Vázquez, Mtra. Elba Carrasco-Ramírez, and María José Gómora-Herrera. We also acknowledge the technical assistance of: Dr. Marlén Valdés-Fuentes, Fernanda Medina-Flores, Adair Torres-Hernández, Clara Murcia-Mejía, Gerardo Perera-Marin, and Esteban Santacruz-Martínez.

Author Contributions JEGA and MAGR performed the conceptual-

ization, investigation, writing and figures designing. JMM provided the equipment and resources for the recordings of local field potentials. JSH performed the stereotactic surgeries and local field potential recordings. CPM, MRG, JRA, FMBM and JJAA assisted with the sleep restriction protocol, obtaining and processing biological samples. JPM, NNGV, AJ and BGG supervised the writing and structure of the manuscript. MAGR, RGG, JPM and NNGV obtained the financial support. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by grants Ciencia Básica y de Frontera 2023–2024 SECIHTI: CBF2023-2024-870 to MAGR and CBF2023-2024-1804 to RGG, grants UNAM-PAPIIT: IA205523 to MAGR, IN227123 to JPM and IN222524 to NNGV.

Data Availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Competing Interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Mosavat M (2021) The role of sleep curtailment on leptin levels in obesity and diabetes mellitus. *Obes Facts* 14(2):214–221
- Xie L (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342(6156):373–377
- Tononi G, Cirelli C (2014) Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron* 81(1):12–34
- Raven F (2018) The role of sleep in regulating structural plasticity and synaptic strength: implications for memory and cognitive function. *Sleep Med Rev* 39:3–11
- Peter-Derex L (2015) Sleep and Alzheimer's disease. *Sleep Med Rev* 19:29–38
- Cordone S (2019) Sleep and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease: insights on mechanisms and possible innovative treatments. *Front Pharmacol* 10:695
- Xiong Y (2024) Impact of sleep duration and sleep disturbances on the incidence of dementia and Alzheimer's disease: a 10-year follow-up study. *Psychiatry Res* 333:115760
- Havekes R, Abel T (2017) The tired hippocampus: the molecular impact of sleep deprivation on hippocampal function. *Curr Opin Neurobiol* 44:13–19
- Ahi J, Radulovic J, Spiess J (2004) The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behav Brain Res* 149(1):17–31
- Kwon SE, Chapman ER (2011) Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* 70(5):847–854
- Jahrling JB (2014) PPARgamma recruitment to active ERK during memory consolidation is required for Alzheimer's disease-related cognitive enhancement. *J Neurosci* 34(11):4054–4063
- Leerssen J (2019) Increased hippocampal-prefrontal functional connectivity in insomnia. *Neurobiol Learn Mem* 160:144–150
- Raven F (2019) A brief period of sleep deprivation causes spine loss in the dentate gyrus of mice. *Neurobiol Learn Mem* 160:83–90
- Zhao R (2019) Disrupted Resting-State functional connectivity in hippocampal subregions after sleep deprivation. *Neuroscience* 398:37–54
- Chai Y (2020) Two nights of recovery sleep restores hippocampal connectivity but not episodic memory after total sleep deprivation. *Sci Rep* 10(1):8774
- Medina-Flores F (2020) Sleep loss disrupts pericyte-brain endothelial cell interactions impairing blood-brain barrier function. *Brain Behav Immun* 89:118–132
- Zhai Q (2023) Reducing complement activation during sleep deprivation yields cognitive improvement by dexmedetomidine. *Br J Anaesth* 131(3):542–555
- Gomez-Gonzalez B (2013) REM sleep loss and recovery regulates blood-brain barrier function. *Curr Neurovasc Res* 10(3):197–207
- Lyons LC, Vanrobaeys Y, Abel T (2023) Sleep and memory: the impact of sleep deprivation on transcription, translational control, and protein synthesis in the brain. *J Neurochem* 166(1):24–46
- Machado RB (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 1004(1–2):45–51
- Eckel-Mahan KL (2008) Circadian Oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nat Neurosci* 11(9):1074–1082
- Amir S, Stewart J (2009) Motivational modulation of rhythms of the expression of the clock protein PER2 in the limbic forebrain. *Biol Psychiatry* 65(10):829–834
- Eckel-Mahan KL (2012) Circadian oscillations within the hippocampus support memory formation and persistence. *Front Mol Neurosci* 5:46
- Yoo SH, Eckel-Mahan K (2016) Hippocampal PER1: a circadian sentinel controlling RSK activity during memory formation. *J Neurochem* 138(5):650–652
- Debski KJ (2020) The circadian dynamics of the hippocampal transcriptome and proteome is altered in experimental temporal lobe epilepsy. *Sci Adv* 6(41):eaat5979
- Steffens S (2024) Microglial morphology aligns with vigilance stage-specific neuronal oscillations in a brain region-dependent manner. *Glia* 72(12):2344–2356
- Schindelin J (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682
- Gonzalez-Gonzalez S (2024) Maternal exposure to dim light at night induces behavioral alterations in the adolescent and adult offspring Wistar rat. *Front Physiol* 15:1520160
- McShane BB (2010) Characterization of the bout durations of sleep and wakefulness. *J Neurosci Methods* 193(2):321–333
- Sauvet F (2019) Lengthening of the photoperiod influences sleep characteristics before and during total sleep deprivation in rat. *J Sleep Res* 28(3):e12709
- Owen JE et al (2021) Late-in-life neurodegeneration after chronic sleep loss in young adult mice. *Sleep*. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsab057>
- Zielinski MR, Gibbons AJ (2022) Neuroinflammation, Sleep, and circadian rhythms. *Front Cell Infect Microbiol* 12:853096

33. Winder DG (1999) ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors. *Neuron* 24(3):715–726
34. Kushner SA (2005) Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J Neurosci* 25(42):9721–9734
35. Stepan J, Dine J, Eder M (2015) Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. *Front Neurosci* 9:160
36. Boyce R (2016) Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 352(6287):812–816
37. Diaio H (2023) REM sleep deprivation induced by the modified multi-platform method has detrimental effects on memory: a systematic review and meta-analysis. *Behav Brain Res* 454:114652
38. Chen P (2023) The devastating effects of sleep deprivation on memory: lessons from rodent models. *Clocks Sleep* 5(2):276–294
39. Wright CJ, Milosavljevic S, Pocivavsek A (2023) The stress of losing sleep: sex-specific neurobiological outcomes. *Neurobiol Stress* 24:100543
40. Hristovska I (2022) Sleep decreases neuronal activity control of microglial dynamics in mice. *Nat Commun* 13(1):6273
41. Ma C (2024) Microglia regulate sleep through calcium-dependent modulation of norepinephrine transmission. *Nat Neurosci* 27(2):249–258
42. Doorn KJ (2014) Increased amoeboid microglial density in the olfactory bulb of Parkinson's and Alzheimer's patients. *Brain Pathol* 24(2):152–165
43. Morrison H (2017) Quantitative microglia analyses reveal diverse morphological responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Sci Rep* 7(1):13211
44. York EM et al (2018) 3dmorph automatic analysis of microglial morphology in three dimensions from ex vivo and in vivo imaging. *eNeuro*. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0266-18.2018>
45. Savage JC, Carrier M, Tremblay ME (2019) Morphology of microglia across contexts of health and disease. *Methods Mol Biol* 2034:13–26
46. Green TRF (2021) Age-at-injury influences the glial response to traumatic brain injury in the cortex of male juvenile rats. *Front Neurol* 12:804139
47. Morrison HW, Filosa JA (2013) A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation* 10:4
48. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF (2013) Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci* 7:3
49. Fernandez-Arjona MDM (2017) Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Front Cell Neurosci* 11:235
50. Bellesi M (2017) Sleep loss promotes astrocytic phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 37(21):5263–5273
51. Zhao B (2019) Chronic sleep restriction induces Abeta accumulation by disrupting the balance of Abeta production and clearance in rats. *Neurochem Res* 44(4):859–873
52. Zhao X (2024) Sleep restriction promotes brain oxidative stress and inflammation, and aggravates cognitive impairment in insulin-resistant mice. *Psychoneuroendocrinology* 166:107065
53. Busche MA (2012) Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(22):8740–8745
54. Pena-Ortega F (2013) Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *Journal of Neurodegenerative Diseases* 2013:p657470
55. Hefter D (2020) Amyloid, APP, and electrical activity of the brain. *Neuroscientist* 26(3):231–251
56. Villette V (2010) Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J Neurosci* 30(33):10991–11003
57. Sabia S (2021) Association of sleep duration in middle and old age with incidence of dementia. *Nat Commun* 12(1):2289
58. Frazzini V (2016) Altered Kv2.1 functioning promotes increased excitability in hippocampal neurons of an Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Dis* 7(2):e2100
59. Wang HL (2017) Age-related alterations of neuronal excitability and voltage-dependent Ca(2+) current in a spontaneous mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 321:209–213
60. Yoshida H (2004) State-specific asymmetries in EEG slow wave activity induced by local application of TNFalpha. *Brain Res* 1009(1–2):129–136
61. Rechtschaffen A (1999) Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep* 22(1):11–31
62. Tobler I, Borbely AA (1990) The effect of 3-h and 6-h sleep deprivation on sleep and EEG spectra of the rat. *Behav Brain Res* 36(1–2):73–78
63. Franken P, Tobler I, Borbely AA (1993) Effects of 12-h sleep deprivation and of 12-h cold exposure on sleep regulation and cortical temperature in the rat. *Physiol Behav* 54(5):885–894
64. Kim Y (2007) Repeated sleep restriction in rats leads to homeostatic and allostatic responses during recovery sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25):10697–10702
65. Bjorness TE, Booth V, Poe GR (2018) Hippocampal theta power pressure builds over non-REM sleep and dissipates within REM sleep episodes. *Arch Ital Biol* 156(3):112–126
66. Poe GR (2000) Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. *Brain Res* 855(1):176–180
67. Yang RH (2011) Sleep deprivation impairs Spatial learning and modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Neuroscience* 173:116–123
68. Schmitt U (2009) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162(2):234–243
69. Zhang FX (2014) Abnormal expression of synaptophysin, SNAP-25, and synaptotagmin 1 in the hippocampus of kainic acid-exposed rats with behavioral deficits. *Cell Mol Neurobiol* 34(6):813–824
70. Lee CC (2021) Exercise intensities modulate cognitive function in spontaneously hypertensive rats through oxidative mediated synaptic plasticity in hippocampus. *J Cell Mol Med* 25(17):8546–8557
71. Bozdagi O (2000) Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 28(1):245–259
72. Baudry M (2015) Multiple cellular cascades participate in long-term potentiation and in hippocampus-dependent learning. *Brain Res* 1621:73–81
73. Shil SK (2021) Ndufs4 ablation decreases synaptophysin expression in hippocampus. *Sci Rep* 11(1):10969
74. Mikhail C et al (2017) ERK signaling pathway regulates sleep duration through activity-induced gene expression during wakefulness. *Sci Signal*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aai9219>
75. Guan Z, Peng X, Fang J (2004) Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus. *Brain Res* 1018(1):38–47
76. Ravassard P (2009) Paradoxical (REM) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate receptor protein levels,

- and ERK/MAPK activation in the dorsal hippocampus. *Sleep* 32(2):227–240
77. Wang L (2019) Effects of sleep deprivation (SD) on rats via ERK1/2 signaling pathway. *Med Sci Monit* 25:2886–2895
 78. Wang X et al (2024) Chronic sleep deprivation altered the expression of memory-related genes and caused cognitive memory dysfunction in mice. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms252111634>
 79. Houser CR, Huang CS, Peng Z (2008) Dynamic seizure-related changes in extracellular signal-regulated kinase activation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 156(1):222–237
 80. Xu ZC (2009) Epileptiform discharge upregulates p-ERK1/2, growth-associated protein 43 and synaptophysin in cultured rat hippocampal neurons. *Seizure* 18(10):680–685
 81. Garcia-Aviles JE (2021) Metabolic disturbances induced by sleep restriction as potential triggers for Alzheimer's disease. *Front Integr Neurosci* 15:722523
 82. Foiadelli T (2023) Neuroinflammation and status epilepticus: a narrative review unraveling a complex interplay. *Front Pediatr* 11:1251914
 83. Chen MJ (2021) Extracellular signal-regulated kinase regulates microglial immune responses in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 99(6):1704–1721
 84. Xia Q (2015) Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis* 6(3):e1702
 85. Calvo M (2011) Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain via the MEK/ERK pathway. *Glia* 59(4):554–568
 86. Fu P (2016) Rho-associated kinase inhibitors promote microglial uptake via the ERK signaling pathway. *Neurosci Bull* 32(1):83–91

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Y EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente

Constancia

a: **García Avilés Jesús Enrique**

Por la **Presentación del Trabajo de Divulgación de la Ciencia:**

Dormir bien para aprender mejor

En el XXXVII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Celebrado los días 28 al 2 de Diciembre del 2022



Dr. Fernando Rivera Cabrera
Jefe del Departamento de Ciencias de la Salud

Comité Organizador: Dra. Elsa Cervantes Ríos, Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero, Dra. Adriana Alarcón Aguilar,
Dra. Ofelia Limón Morales, Dra. Bárbara Vargas Miranda, Dr. Noé Salinas Arreortua





POSTER CERTIFICATE

This is to certify that the abstract entitled:

**CHRONIC SLEEP RESTRICTION ALTERS
HIPPOCAMPAL PROTEIN EXPRESSION AND
DECLARATIVE MEMORY**

was presented by

Jesús E García-Aviles

Co-Authors

***Jesús García-Aviles*, Jessica Avilez-Avilez, Fernanda Medina-Flores, Bryan Torres-Hernández, Rosallinda Guevara-Guzmán, Beatriz Gomez-Gonzalez, Mara Alaide Guzman Ruiz; Mexico**

at the:

**11th IBRO World Congress
held in Granada, Spain, 9-13 September 2023**

Juan Lerma

IBRO 2023 Congress Chair



LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Y LA FACULTAD DE MEDICINA A TRAVÉS DE
LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN

Otorgan la presente

CONSTANCIA

a: **Jesús Enrique García Aviles**

**Sánchez-Hernández J., Gómez-González B., Jiménez A.,
Guevara-Guzmán R., Guzmán-Ruiz M.**

Por su participación en el

"1er Congreso de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM 2024"
llevado a cabo del 21 al 23 de agosto de 2024. Con el trabajo libre titulado

"La restricción crónica del sueño induce deterioro cognitivo asociado con cambios en la expresión de sinaptofisina y alteraciones en la actividad eléctrica del hipocampo"
en la modalidad presentación oral.



**DR. ANDRÉS ELIÚ
CASTELL RODRÍGUEZ**
JEFE DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DRA. ANA CAROLINA
SEPÚLVEDA VILDÓSOLA**
DIRECTORA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM



CERTIFICATE

OF PARTICIPATION



This certificate is presented to:

Jesús Enrique García Aviles

for scientific contribution as **POSTER PRESENTER** with the title:
“Chronic sleep restriction induced learning impairments associate with
changes in hippocampal protein expression and altered electrical activity”

during the

**5th Edition of Symposium on Physiology and Pathology of
Neuroglia**

held on October 10th and 11th, 2024 at the Centro Académico Cultural
UNAM, Campus Juriquilla.

Organizing Committee



Mónica López Hidalgo
ENES-Juriquilla

Abraham Cisneros Mejorado
INB

Edith Arnold
INB

Daniel Reyes Haro
INB





Facultad de Medicina



EL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Otorga la presente

CONSTANCIA A:

**JESÚS ENRIQUE
GARCÍA AVILES**

Por su apoyo en las visitas a Laboratorios como parte
de las actividades de divulgación científica en el
marco del 90° Aniversario del Departamento de
Fisiología.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., A 13 DE DICIEMBRE DEL 2024.


DRA. JULIETA GARDUÑO TORRES
JEFA DEL DEPARTAMENTO


DR. RICARDO J. MARTÍNEZ TAPIA
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00170

Matrícula: 2192802432

Determinación de los efectos de la restricción de sueño por el método de plataformas múltiples modificado sobre la memoria declarativa, la plasticidad sináptica y la función eléctrica del hipocampo de rata.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 17 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. ANAHI CHAVARRIA KRAUSER
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. ADRIANA JIMENEZ HERNANDEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: JESUS ENRIQUE GARCIA AVILES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



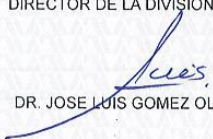
JESUS ENRIQUE GARCIA AVILES
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL



DRA. ANAHI CHAVARRIA KRAUSER

VOCAL



DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

SECRETARIA



DRA. ADRIANA JIMENEZ HERNANDEZ