

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Efecto de la privación de sueño y el estrés sobre la memoria de trabajo.

T E S I S

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

Lic. Guadalupe Jovanna Terán Pérez

Comité tutorial:

Tutor

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Asesoras

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Dra. Alejandra Evelyn Ruiz Contreras

Enero 2013

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

Lic. Guadalupe Jovanna Terán Pérez

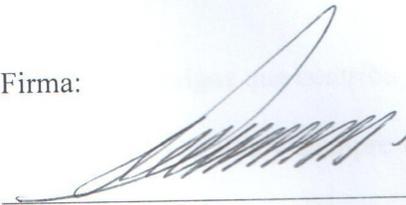
El día 25 de Enero de 2013

Jurado:

Nombre:

Firma:

Tutor: Dr. Javier Velázquez Moctezuma



Asesor: Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Asesor: Dra. Alejandra Evelyn Ruiz Contreras

Sinodal: Dr. Fernando Barrios Álvarez

Sinodal: Dra. Elizabeth Hernández Pérez

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

Lic. Guadalupe Jovanna Terán Pérez

El día 25 de Enero de 2013

Jurado:

Nombre:

Firma:

Tutor: Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Asesor: Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Asesor: Dra. Alejandra Evelyn Ruiz Contreras

Sinodal: Dr. Fernando Barrios Álvarez

Sinodal: Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Agradecimientos:

Después de 4 años invertidos con gran esfuerzo y muchos aprendizajes tanto académicos como personales es necesario mencionar a todas aquellas personas que contribuyeron de alguna manera para alcanzar este logro.

En primer lugar quiero agradecer a mi familia porque sin su apoyo y educación no hubiese podido llegar hasta aquí. Gracias a mis abuelos, a mi madre y a mi hermano por guiarme con paciencia y perseverancia además de acompañarme en cada éxito y cada fracaso con cariño y sabiduría.

Y gracias también a la familia elegida que son todos los amigos que contribuyen con su apoyo, ánimo y paciencia compartiendo los momentos buenos y malos y siempre dando una salida cuando el tema se tornaba complicado o confuso. Especialmente quiero agradecer a Osiris Díaz y a Roberto Mercadillo por contribuir incondicionalmente en cada etapa de este doctorado y por ayudarme a entender y procesar con claridad diferentes aspectos de este proceso además de contribuir con su conocimiento a este trabajo. También a mis compañeros y amigos de la clínica, Yoaly Arana, Enrique Esqueda, Rafael Santana y Norma Herrera por su solidaridad y apoyo a lo largo de estos cuatro años de trabajo, entendiendo mis momentos de frustración, histeria y enojo; y por acompañarme en los momentos de satisfacción.

A Miguel por ser mi compañero de vida, y por entender y acompañar mis noches de desvelo, mis días de trabajo y apoyarme e impulsarme a seguir adelante y terminar con cada

meta propuesta. Gracias por ser parte de mi historia y por compartir este gran logro con paciencia y con amor.

En general gracias a todos mis amigos y compañeros que compartieron mi día a día durante toda mi historia académica, especialmente a Ilse, Nanyely, Vianney y Anel que llevan un largo tiempo compartiendo mi vida como mis grandes amigas.

A Javier por todo su apoyo desde que inició este proyecto y en general en toda mi formación académica y profesional, como tutor y como amigo, siempre dándome lecciones de vida y lecciones académicas que me han permitido lograr todas las metas propuestas y seguir fijándome más.

A mis asesoras Alejandra y Anabel por llevarme siempre a dar el máximo en mi desempeño y por aportar sus conocimientos y apoyo en la realización del trabajo, siempre con disposición y tiempo para ayudarme.

Y esperando no olvidar a nadie gracias a todos los que participaron de estos cuatro años de formación, a mis voluntarios que accedieron a sacrificar una noche de su sueño por aportar a la ciencia, a mis sinodales ya la coordinación del Doctorado.

Resumen

Dormir es esencial para sobrevivir. Diversos estudios sustentan que la falta de sueño impacta directamente en los procesos cognitivos. En esta investigación evaluamos la memoria de trabajo utilizando la tarea N-Back en dos diferentes niveles de complejidad (1 y 3 Back) durante 36 horas a dos grupos: uno que durmió normalmente y otro privado de sueño. Las evaluaciones se realizaron cada 6 horas y al cumplirse 36 horas se les dejó dormir normalmente y se les aplicó la última evaluación. Además, se midió cortisol en saliva para evaluar los niveles de estrés en ambos grupos cada 6 horas, se tomaron 8 muestras en total. Los resultados en la tarea 1-Back muestran un deterioro en la ejecución en el grupo privado de sueño, en comparación con el grupo experimental, tras 24 horas de privación; sin embargo, esta diferencia se pierde a las 30 y 36 horas sin dormir. En la tarea 3-Back no se observan cambios. Con respecto a los tiempos de reacción, el grupo con privación de sueño fue significativamente más lento a las 30 horas de privación en la tarea 1-Back y a las 36 en la tarea 3Back, sin que esto repercutiera en su ejecución. Estos resultados indican que el efecto de la PS depende de la complejidad de la tarea que se realiza, las tareas sencillas requieren un mínimo de atención, sin embargo, si aumentamos la complejidad se observa una compensación. Por otro lado, existe una contribución del ritmo circádico, ya que existe una variación en la ejecución de acuerdo al momento del día en que se realiza la tarea.

Palabras clave: Privación de sueño, memoria de trabajo, niveles de cortisol, tarea N-Back y estrés.

Abstract

Sleep clearly influences learning and memory since sleep deprivation and stress impairs both cognitive processes. Working memory is an essential cognitive process and refers to a short-term holding of incoming information required to update the long-term mnemonic storage and to manipulate new elements in order to solve problems and make decisions. Nevertheless, the influence of sleep deprivation on working memory has scarcely been studied. In this study we evaluated working memory using the N-back test after increasing periods of wakefulness. Healthy young males were kept awake for 36 hours and the two N-back tasks with low (1-Back) and high (3-Back) levels of complexity were applied every 6 hours. Additionally, salivary cortisol was determined along the study. Unlike the control non-deprived participants, the sleep deprived volunteers showed a significant decrease in their efficiency to solve the 1-Back task after 24 hours of sleep deprivation. However, no differences were observed after 30 and 36 hours of sleep deprivation. Concerning the 3-Back task no differences were observed after sleep deprivation. Regarding reaction time, the deprived group manifested slower responses for the 1-Back task and for the 3-Back task after 30 hours and 36 hours of sleep deprivation, respectively. Cortisol levels presented the normal daily oscillation and no differences were observed between groups. This data suggests that sleep deprivation affects basal states of attention instead of working memory while performing simple tasks. The impact of sleep deprivation on the cognitive performance depends on the moment of day when the task is applied and the complexity of the tests used to assess these mnemonic skills.

Keywords: Sleep deprivation, Working memory, Cortisol levels, N-back task, Stress.

Abreviaturas:

MOR: Movimientos oculares rápidos.

NMOR: Sueño sin movimientos oculares rápidos.

N1: Etapa 1 del sueño sin movimientos oculares rápidos.

N2: Etapa 2 del sueño sin movimientos oculares rápidos.

N3: Etapa 3 del sueño sin movimientos oculares rápidos.

FP1: Región frontopolar izquierda.

FP2: Región frontopolar derecha.

F3: Frontal Izquierda.

F4: Frontal derecha.

F7: Frontal Izquierdo.

F8: Frontal derecho.

C3: Central izquierda.

C4: Central derecha.

P3: Parietal izquierda.

P4: Parietal derecha.

T3: Temporal izquierdo.

T4: Temporal derecho.

T5: Temporal izquierdo.

T6: Temporal derecho.

O1: Occipital izquierdo.

O2: Occipital derecho.

EEG: Electroencefalograma.

EOG: Electro-oculograma.

EMG: Electromiograma.

EKG: Electrocardiograma.

NSQ: Núcleo supraquiasmático.

PPT: Tegmento pedúnculo pontino.

LDT: Tegmento laterodorsal.

VIP: Peptido vasoactivo intestinal.

CPF: Corteza prefrontal.

SNS: Sistema nervioso simpático.

HHA: Hipotálamo hipófisis adrenales.

CRH: Hormona liberadora de corticotropina.

ACTH: Corticotropina.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

fMRI: Resonancia magnética funcional.

PS: Privación de sueño.

Índice

1. Antecedentes.....	12
A. Sueño.....	12
I. Privación de sueño.....	22
II. Privación de sueño y estrés.....	24
B. Memoria.....	26
I. Memoria y estrés.....	28
C. Sueño y Memoria.....	30
I. Sueño y memoria de trabajo.....	34
2. Planteamiento del problema.....	37
3. Hipótesis.....	37
4. Objetivo.....	37
5. Método.....	37
A. Participantes	37
B. Instrumentos... ..	39
C. Tarea N-Back.....	42
D. Prueba de Elisa.....	44
E. Diseño experimental.....	45
F. Análisis estadístico.....	48
6. Resultados.....	49
7. Discusión.....	56

8. Conclusión.....	60
9. Referencias.....	61
10. Anexo I.....	76

1. Antecedentes

A. Sueño

El sueño es un proceso fisiológico descrito comúnmente como la disminución natural, periódica y reversible de la percepción del medio externo, conservando cierto grado de reactividad y de las funciones autónomas (Jouvet, 1964). Dicha definición se basa en observaciones conductuales principalmente, sin embargo, desde el surgimiento de la electroencefalografía, en 1929, cuando Hans Berger describió el ritmo alfa, se fue teniendo conocimiento de los cambios en la actividad eléctrica cerebral (Dement 2005), lo que posteriormente dio inicio al estudio de la Medicina del Sueño. Así, hoy el sueño es identificado, de acuerdo a sus características electroencefalográficas, de la siguiente manera:

Polisomnografía

Este proceso consta de dos etapas principales: el sueño NMOR y el sueño MOR, que por sus siglas se refieren al Sueño de Movimientos Oculares Rápidos (Rechtschaffen y Kales, 1968). Para poder cuantificar las diferentes etapas, se realiza una medición por épocas, una época es un período de tiempo en el registro de 30 segundos y a cada una se le asigna una etapa de sueño. En el sueño NMOR se describe la etapa N1 (NMOR 1), cuya característica principal es que se presenta como transición entre la vigilia y el sueño. Presenta un ritmo theta predominante, aunque aparecen intromisiones de actividad alfa de manera constante y grafoelementos como las ondas del vértex, que son ondas agudas que se presentan en la región central. Esta etapa ocupa alrededor del 5% del tiempo total de sueño (Figura 1).

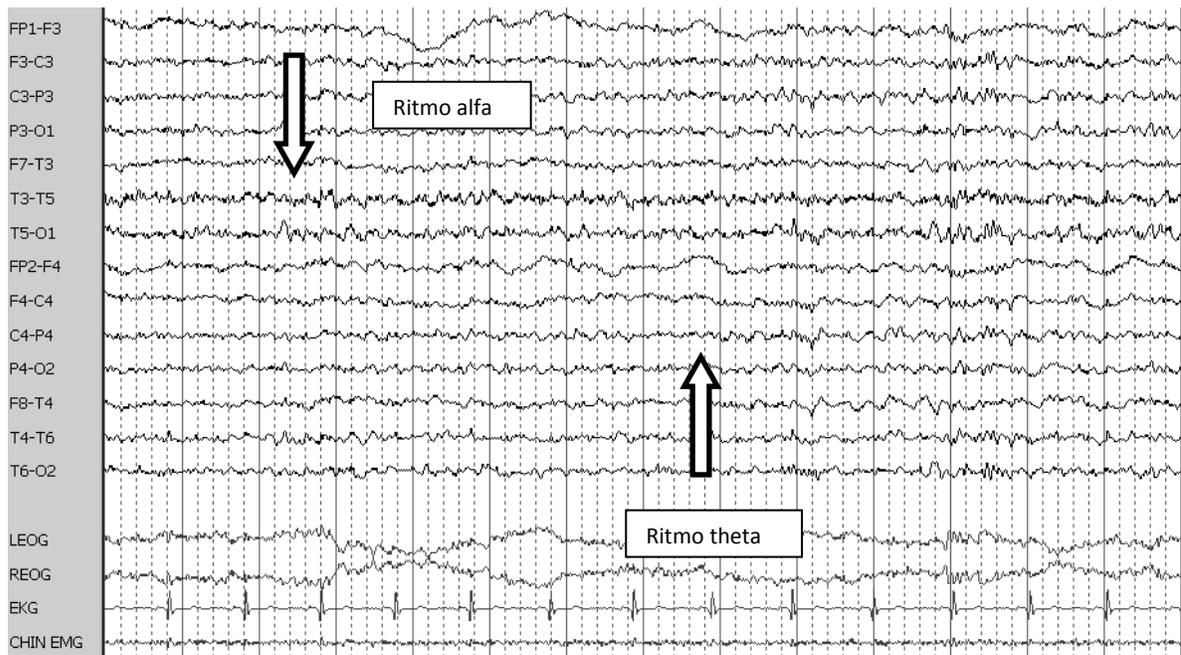


Figura 1. Etapa N1 de sueño. Época de 30 segundos, en esta fase predomina el ritmo theta (3.5-7.5 cps) y aparecen eventualmente intrusiones de actividad alfa (8-12 cps). Se registra la actividad eléctrica cerebral de acuerdo al sistema internacional 10-20, utilizando un montaje bipolar. Cada letra indica la región de la corteza monitoreada. Los números nones indican los electrodos colocados de lado izquierdo y los pares los de lado derecho. Además, se registra electro-oculograma de ambos ojos (REOG) registro de lado derecho, (LEOG) registro del ojo izquierdo, electromiograma de mentón (EMG), y Electrocardiograma (EKG).

Después aparece la etapa N2 (NMOR 2), cuyo ritmo de fondo es la actividad theta, en combinación con los husos de sueño, que son brotes de ondas sinusoidales de 12-16 Hz, definidos así por su forma y tienen una duración de 0.5 a 2.5 segundos. Además de estos

grafoelementos, se presentan los complejos K, que son ondas de actividad negativa seguida de una onda positiva cuya duración es de 0.5 segundos aproximadamente (AASM, 2007) (Figura 2).

En conjunto, las etapas N1 y N2 suman lo que se conoce como sueño ligero, que se considera la etapa más superficial de mayor reactividad a los estímulos externos, pero fundamental para el descanso del individuo (Rechtschaffen y Kales, 1968).

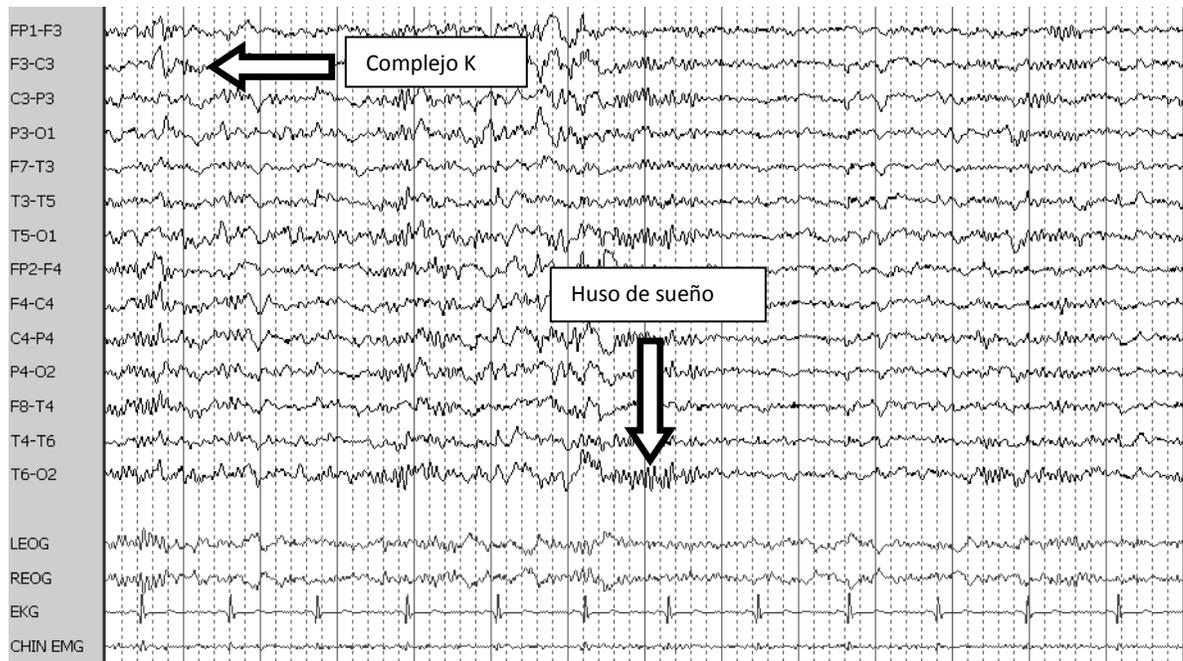


Figura 2. Etapa N2 de sueño, en esta época de 30 segundos podemos observar además del ritmo theta de fondo, husos de sueño y complejos K.

La etapa N3 (Figura 3) (NMOR 3) se conoce también como sueño de ondas lentas (SOL), ya que en ésta aparecen principalmente ondas delta, cuya actividad es de 0.5 a 3.5 Hz. Este ritmo se mezcla con actividad theta de bajo voltaje, ocasionalmente pueden aparecer husos de sueño, pero del 25 al 100% de la época debe estar ocupado por ondas delta para considerar una etapa N3 (AASM, 2007).

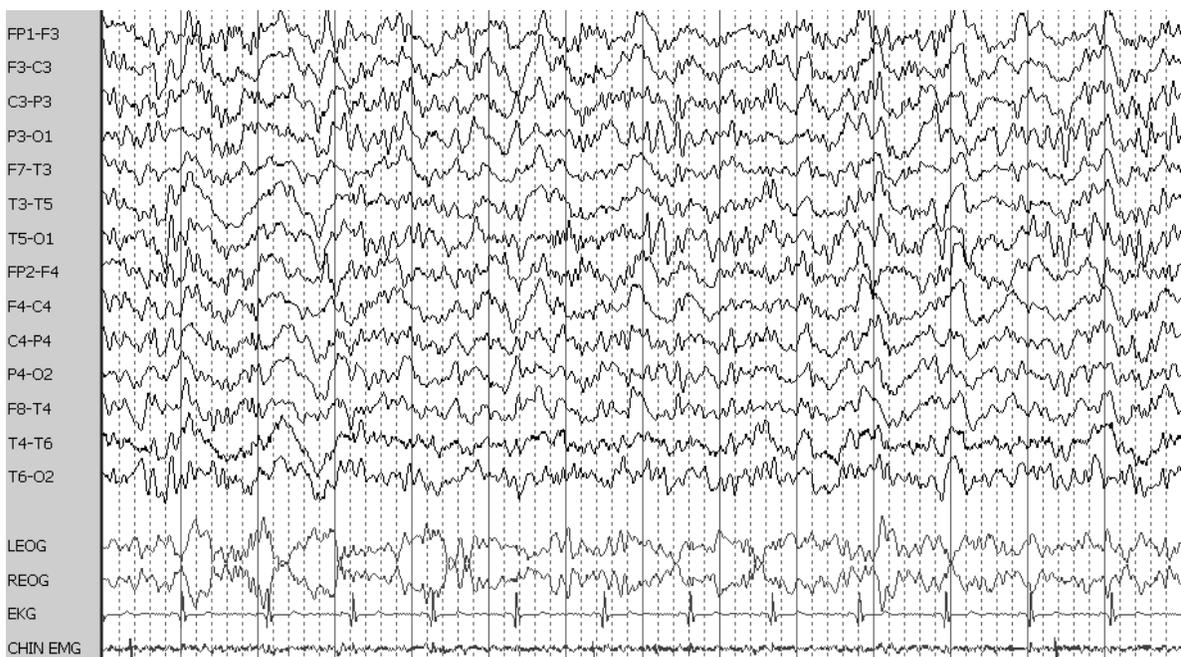


Figura 3. En esta época podemos observar un ejemplo de la etapa N3 de sueño, cabe destacar que en más del 25% de la misma, se presentan ondas delta.

Por último, tenemos al sueño MOR (figura 4), descrito en 1953 por Aserinsky y Kleitman, cuyas características principales son la presencia de movimientos oculares rápidos

en ráfagas, la atonía muscular y la presencia de actividad mixta de bajo voltaje en el registro electroencefalográfico.



Figura 4. Aquí podemos observar el sueño MOR, la característica más importante es el movimiento en espejo que se registra en el EOG. Respecto a la actividad EEG se observa un ritmo rápido de bajo voltaje y en el EMG vemos atonía muscular.

Estas etapas se presentan en ciclos que duran alrededor de 90 a 120 minutos y pueden ocurrir de 4 a 5 por noche (AASM, 2007).

Pero ¿por qué dormimos? Algunos investigadores responden que se trata de una cuestión homeostática en la cual la cantidad de sueño dependerá del tiempo que hayamos

pasado despiertos: a mayor cantidad de vigilia y mayor gasto de energía invertida, mayor será la necesidad de dormir, para mantener un equilibrio (Borbely, 1982). Sin embargo, no es esta la única razón que nos lleva a la cama cada noche. Otra de las teorías va encaminada a un patrón circádico en el cual completamos un ciclo de sueño-vigilia en un período de aproximadamente 24 horas, estas oscilaciones son orquestadas principalmente por una estructura ubicada en el hipotálamo, que se conoce como el reloj endógeno, la cual es el núcleo supraquiasmático (NSQ), que recibe proyecciones luminosas desde la retina, a través del quiasma óptico, determinando así los ciclos de sueño-vigilia, con los ciclos de luz-oscuridad (Moore-Ede y cols., 1983). De que este reloj funcione depende la ritmicidad circádica, no obstante, aunque se destrozara este núcleo se presentarían el sueño y la vigilia, además de las distintas etapas (Albrecht, 2012).

Neurofisiología del sueño

Además de estos procesos, es necesario que diversas estructuras se activen en cada uno de los estadios del ciclo (Revisado en: Blanco-Centurión y Shiromani, 2010). Con respecto a la vigilia, recientemente se han estudiado las neuronas orexinérgicas, también conocidas como hipocretinérgicas, ubicadas en el hipotálamo lateral (de Lecea y cols., 1998); estas inervan a diferentes estructuras cerebrales, incluyendo otras cuyas redes neuronales nos mantienen en estado de alerta, como el locus coeruleus, el cerebro basal anterior, el tegmento mesopontino dorsolateral, núcleos de Rafé, la región ventrosegmental y la médula espinal (España y cols., 2002). Estas neuronas disparan sólo cuando nos encontramos despiertos o activos, razón por la

que son consideradas parte fundamental del mecanismo regulador de la vigilia. Otra evidencia de esto es que su destrucción se asocia con un trastorno de sueño llamado narcolepsia, cuya característica fundamental son los ataques de sueño (es decir, períodos donde el paciente se queda dormido súbitamente, siendo incapaz de controlarlo), la cataplexia o pérdida súbita del tono muscular en estado de vigilia y trastornos del sueño MOR (Ripley, 2001).

En el hipotálamo lateral se encuentran también las neuronas histaminérgicas sintetizadas en el núcleo tuberomamilar, que también reciben proyecciones orexinérgicas y se activan para inhibir a las neuronas que promueven el sueño (Franco-Pérez, 2012). Esta activación aparece cuando el organismo requiere un grado elevado de atención para realizar una acción (Franco-Pérez, 2012). Si se aplican antagonistas histaminérgicos se presenta somnolencia (Huang y cols., 2001).

En el locus coeruleus se encuentran las neuronas noradrenérgicas que disparan en vigilia, disminuyen su tasa de disparo en SOL y son abolidas en el sueño MOR; su activación aumenta durante estados de vigilia atenta, sobretodo antes estímulos novedosos (Takahashi y cols., 2010). Incluso, existen proyecciones al núcleo supraquiasmático (NSQ) que podría estar participando en la transición de la vigilia al sueño (Takahashi y cols., 2010).

Una de las primeras áreas relacionadas con la vigilia es la formación reticular, a través de las neuronas colinérgicas, ya que estas se mantienen activas cuando se presenta vigilia y en número menor se activan también durante el sueño MOR. La mayoría de estas neuronas se encuentran en el cerebro basal anterior (El Mansari y cols., 1989).

Las neuronas colinérgicas se encuentran también en el tallo cerebral, específicamente en el núcleo laterodorsal y en el pedúnculo pontino tegmental, mismas que podrían estar participando en la activación de los circuitos tálamo-corticales, promoviendo así un estado de vigilia, pero también sueño MOR, pues su activación está relacionada con actividad eléctrica cerebral desincronizada (Steriade, 2004).

Además de activar, es necesario que algunas neuronas inhiban otras redes neuronales, para mantener al individuo en un estado de vigilia, tal es el caso de las neuronas serotoninérgicas, que se localizan en el núcleo dorsal del Rafé (Revisado en: Blanco-Centurión y Shiromani, 2010). Cabe aclarar que existen diversos núcleos del Rafé en el tallo cerebral y el dorsal es sólo uno de ellos; estos proyectan a regiones del tálamo y la corteza induciendo un estado de vigilia, pero también proyectan al núcleo ventrolateral del área preóptica, inhibiendo a las neuronas generadoras del sueño (Jouvet 1999), las cuales disparan en vigilia, disminuyen su actividad en SOL y permanecen silentes en sueño MOR (Jouvet 1999).

Por último, las neuronas dopaminérgicas también juegan un papel importante en la regulación de la vigilia; su actividad se registra en la sustancia negra en vigilia activa, principalmente, aunque también se activan en vigilia relajada (Steifels y cols., 1983). Otro sitio donde se han observado neuronas dopaminérgicas es en el área ventral tegmental, se activan principalmente en vigilia activa, al igual que las de la sustancia negra (Trulson y Preussler 1984). Las primeras inervan a estructuras del sistema límbico, como el núcleo accumbens, el hipocampo y la corteza prefrontal/cingular; mientras que las de la sustancia

negra inervan estructuras involucradas en el control motor, como el núcleo estriado (Blanco-Centuri3n y Shiromani, 2004).

Las neuronas dopamin3rgicas participan en la regulaci3n del sistema de recompensa (Salamone y Correa, 2012), placer (Blum y cols., 2012), memoria de trabajo (D'Ardenne y cols., 2012) y en el control motor (Aumann y Horne, 2012), respectivamente, lo que se explica al observarse un mayor grado de activaci3n en per3odos de vigilia, ya que se requiere un estado de atenci3n para realizar estos procesos (Blanco-Centuri3n y Shiromani, 2004).

Hablando de la regulaci3n de sue1o, a partir de los estudios realizados por Von Economo (1923) despu3s de una epidemia de encefalitis let3rgica, se observ3 que pacientes infectados presentaban insomnio o somnolencia excesiva diurna. En los estudios *post mortem* las lesiones en el hipot3lamo anterior se correlacionaban con insomnio, y las lesiones en la regi3n posterior, con presencia de somnolencia excesiva diurna (Revisado en: Vel3zquez-Moctezuma y cols., 2010).

Siguiendo esta l3nea de investigaci3n, ahora se sabe que la regulaci3n del sue1o NMOR, espec3ficamente del SOL, depende de diversas estructuras hipotal3micas (Revisado en: Vel3zquez-Moctezuma y cols., 2010). Una de las m3s estudiadas es la regi3n ventricular del 3rea pre3ptica del hipot3lamo y el hipot3lamo lateral, que inhiben la acci3n de los n3cleos que regulan los otros estados y al ser lesionadas se altera o se elimina el SOL (Lin y cols., 1989). Con respecto a las redes neuronales, se ha demostrado la presencia de neuronas adenosin3rgicas en el 3rea pre3ptica del hipot3lamo y en el cerebro basal anterior, que al disparar promueven la aparici3n de sue1o lento y bloquean la actividad de neuronas

promotoras de la vigilia (Porkka-Heiskanen y cols., 1997). Adicionalmente se ha observado que las células del área preóptica y del hipotálamo anterior son termosensibles, por lo que el aumento de la temperatura cerebral induce SOL (McGinty y Szymusiak, 2001).

En lo que respecta al sueño MOR, la región principal involucrada es el área peribraquial del tallo cerebral, siendo el núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPT) y el tegmento laterodorsal (LDT) los más estudiados, ya que concentran la mayor cantidad de células colinérgicas (Jouvet, 1994), las cuales, como mencionamos previamente, disparan durante la vigilia activa pero también se mantienen activas en el SMOR, incluso la descarga inicia un poco antes de que aparezca el episodio (Hobson y cols., 1998). Pero también realiza proyecciones talamocorticales responsables de la desincronización que caracteriza al sueño MOR (McGinty y Szymusiak, 2001).

Sin embargo, no sólo los neurotransmisores regulan la aparición de sueño MOR. Drucker-Colín (1975) describió un pico de liberación de neuroproteínas ligadas a la aparición de sueño MOR. Adicionalmente se observó la participación de péptidos como el vasoactivo intestinal (VIP), que al administrarse genera sueño MOR (Revisado en: Jiménez-Anguiano y cols., 2006).

Por otro lado, se ha descrito otro tipo de sustancias como los lípidos en la regulación del sueño, específicamente la oleamida, que fue encontrada en el líquido cefalorraquídeo de gatos que habían sido previamente privados de sueño (Cravatt y cols., 1994). Esta sustancia actúa a través del sistema de cannabinoides, concretamente en el receptor CB1 (Axelrod & Felder, 1998). En estudios en ratas se ha observado que la administración de oleamida induce

sueño MOR, esta respuesta se produce en aplicación tanto aguda como crónica (Herrera-Solís y cols., 2010). También se ha notado que la administración de oleamida mejora el tiempo total de sueño en ratas adultas, esto en un modelo de insomnio desarrollado en ratas (Reyes-Prieto y cols., 2012).

Toda esta información indica que el sueño es un proceso complicado que requiere de la participación de diversas sustancias, las líneas de investigación están orientadas también a identificar los genes responsables de la regulación de éste para comprender más al respecto (Revisado en: Prospéro-García y cols., 2009).

Dormir es necesario, pero a pesar de que se han hecho muchos estudios aún no alcanzamos a comprender del todo la naturaleza del sueño y la función del mismo. Una de las formas en las que se ha obtenido más información al respecto es a través de las diferentes enfermedades del dormir descritas, así sabemos cómo una persona puede deteriorarse paulatinamente si deja de dormir total o parcialmente. Por lo anterior, resulta un campo de investigación cuyo abordaje puede darse desde diversas disciplinas y del que aún queda mucho por descubrirse.

I. Privación de sueño

Con el estilo de vida actual, es común la privación total o parcial de sueño de manera aguda o crónica. Ante un ritmo de actividad intenso, muchas personas sacrifican su sueño para poder cumplir jornadas laborales mayores, o bien, por cuestiones sociales y personales. Sin embargo, no dormir puede generar un impacto importante sobre el estado de salud en general

y también sobre nuestro funcionamiento diario (Monk y cols., 2003, Waterhouse y cols., 2011).

Pero ¿qué se considera privación de sueño (PS)? La mayoría de las personas acostumbran dormir entre 6.5 y 7.5 horas por noche, sin embargo, hay quienes requieren únicamente 4 o 5 horas para sentirse descansados; en el otro extremo, existen personas que necesitan hasta 10 horas de sueño para sentirse bien (AASM, 2005). Lo importante es evaluar el funcionamiento diurno, por lo tanto, si una persona todas las mañanas despierta cansada, con somnolencia, sin energía y con una disminución en su rendimiento o con alteraciones cognitivas, estos son indicadores de una deuda de sueño importante (Jones y Harrison, 2001).

Además de estos ejemplos de restricción de sueño, también existe la privación aguda de sueño que se puede dar frecuentemente, por lo menos en períodos de 24 horas, aunque puede llegar hasta 36 o 48 horas (Chee 2006, Libedisnky y cols., 2011).

Para entender el efecto de la PS se han utilizado técnicas como la resonancia magnética funcional y se ha observado que tras un período de privación aguda de sueño disminuye la activación de la corteza prefrontal y del tálamo, ambas estructuras involucradas principalmente en tareas cognitivas (Chee y Choo, 2004).

En pruebas conductuales se observa que las personas privadas de sueño tienen un tiempo de reacción más lento al realizar una tarea, en comparación con personas que han dormido adecuadamente, incluso se observa que cometen más errores en tareas cognitivas, específicamente relacionadas con la memoria (Chee y Choo, 2004).

La restricción y la PS se han asociado con la incidencia de accidentes automovilísticos (Drake y cols., 2010). En Estados Unidos se considera que el 20% de los percances podrían estar causados por somnolencia en los conductores (Colten y Altevogt, 2006).

Estudios en animales han aportado también información al respecto, en un estudio se sometió a un grupo de ratas wistar a un periodo de 6 horas de privación de sueño y posteriormente realizaron una tarea de memoria de rastreo por condicionamiento, en comparación con un grupo de ratas que durmieron normalmente y se observa que el grupo con privación tuvo un deterioro cognitivo ya que no mostró una conducta de aprendizaje que lo condicionara a explorar los estímulos aunque estos fueran positivos, por lo que se concluye el efecto negativo de la privación de sueño en la memoria implícita (Chowdhury y cols., 2011).

II. Privación de sueño y estrés

El estrés es una condición fisiológica del organismo en respuesta a una demanda extraordinaria, o bien una situación amenazante para el individuo (Vinson, 2009), considerándose una reacción natural y fundamental para la supervivencia. Uno de los factores que genera una respuesta de estrés es la PS (Hellhammer y cols., 2009).

Esta reacción se da de la siguiente forma: el estrés promueve la activación del sistema nervioso simpático (SNS) y el incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA). La primera respuesta del SNS es mediada por las catecolaminas adrenalina y noradrenalina (Wolf, 2006). La respuesta se llevará a cabo gracias a la activación de este

sistema y a través de la liberación de distintas hormonas que actúan en relevo: la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la corticotropina (ACTH) y los glucocorticoides, la corticosterona en los animales y el cortisol en el humano. La mayoría de las células del cuerpo humano tienen receptores a cortisol lo que hace que tengan diversos efectos en nuestro sistema, de tipo metabólico, cardiovascular y en el sistema inmune (Hellhammer, 2009).

El cortisol regula su propia liberación a través de una retroalimentación negativa en el sistema nervioso central (SNC), donde se une a receptores específicos en todo el sistema límbico, incluidos el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Clow y cols., 2009). Con respecto al hipocampo se han descrito 4 factores que confirman esta teoría: la primera es que contiene una gran cantidad de receptores a glucocorticoides, la segunda en que altos niveles de estrés afectan la memoria declarativa, estrechamente ligada a esta estructura, la tercera es que altos niveles de hormonas esteroides la atrofian y, por último, que los glucocorticoides pueden afectar su neurogénesis (Lupien y Lepage 2001).

En condiciones normales, el cortisol sostiene una ritmicidad circádica, manteniendo los picos de concentración máxima de 30 a 45 minutos después del despertar y va disminuyendo poco a poco a lo largo del día, encontrándose en los niveles más bajos aproximadamente 12 horas después (Edwards y cols., 2001). Sin embargo, ante un período de PS los niveles de cortisol se elevan, incluso durante la noche, cuando deberían permanecer bajos (Leproult y cols., 1997).

En estudios con animales se ha demostrado que la privación de sueño incrementa los niveles de corticosterona, sin embargo, este incremento se comparó con la valoración de los

niveles de corticosterona tras un período de estrés por inmovilización y es significativamente mayor ante esta manipulación, lo que implica que la privación de sueño, por lo menos en un período de 6 horas no representaría un estresor tan fuerte como el de la inmovilización. No obstante, este período de privación sí es suficiente para generar un deterioro cognitivo en animales al realizar tareas de memoria de reconocimiento (Palchykova y cols., 2006), lo que abre la posibilidad a una complicada relación entre la privación de sueño y los cambios en las concentraciones de cortisol, y hace necesario ampliar esta línea de investigación.

B. Memoria

La memoria es la capacidad de retener y evocar eventos del pasado mediante procesos neurobiológicos de almacenamiento y recuperación de la información básica en el aprendizaje (Etchepaborda y cols., 2005). Para que esta memoria pueda darse es necesario, en primer lugar, tener un mecanismo de atención, gracias al cual podemos seleccionar de todos los estímulos que hay a nuestro alrededor, solo la información que nos resulta útil para las tareas que desempeñamos (Contreras y Cansino 2005).

La memoria humana ha sido clasificada de distintas formas, siendo más popular la distinción hecha por Squire y Zola (1996), quienes la dividen en memoria declarativa o explícita y memoria no declarativa o implícita.

La primera es el tipo de memoria al que se accede de forma consciente, información acerca de hechos y eventos; se clasifica en memoria episódica (memoria de eventos

autobiográficos) y semántica (memoria sobre hechos y conocimientos generales del mundo, Tulving, 1985). La formación hipocampal regula principalmente la codificación y la recuperación declarativa (Tort y cols., 2011).

La memoria no declarativa o implícita almacena información de tipo motor, hábitos y procesos de condicionamiento, este sistema funciona junto con la neocorteza para establecer y mantener una memoria a largo plazo (Squire y cols., 2004).

Una vez que la información es adquirida, ocurre el proceso de consolidación, por el cual la memoria incrementa su resistencia a la interferencia de nueva información y se vuelve más estable. A través de esta fase el cerebro reorganiza la información, siendo necesaria la activación de la corteza cerebral y sus proyecciones con el hipocampo (McGaugh, 2000).

En otra clasificación está la memoria de trabajo, en la cual se almacena la información por un período corto de tiempo, es un tipo de memoria orientada a objetivo y que se encarga de mantener, manipular y actualizar la información (Baddeley, 1992), capacidad que es fundamental en el desarrollo de distintas habilidades cognitivas, incluyendo la resolución de problemas y las habilidades de razonamiento (Baddeley, 1992). La memoria de trabajo se considera el sistema cognitivo que permite a los individuos mantener y manipular la información de manera temporal, y se puede dividir en procesos separados: los necesarios para la conservación de la información y los necesarios para la asignación de atención y la coordinación de la información que se mantiene de forma temporal (Repovs y Baddeley, 2006). La capacidad de esta memoria aparece alrededor del año de edad, y su eficiencia mejora con la edad hasta los 20 años, su eficiencia depende directamente de la maduración

cerebral (Bunge, 2007); en la vejez la capacidad de memoria de trabajo disminuye por la degeneración neuronal, este proceso se ha correlacionado positivamente con un incremento en la actividad de la corteza prefrontal (CPF) y parietal durante la infancia y un decremento en la región dorso lateral de la CPF en la vejez (Westerberg y Klingberg, 2007).

Una de las estrategias más confiables para medir la memoria de trabajo es a través de la prueba N-Back pues en esta se puede evaluar la actualización, manipulación y mantenimiento de la información (Jaeggi y cols., 2010). Esta tarea se puede hacer desde 0 a 3 back, lo que significa que tiene 4 niveles de complejidad. Se puede realizar de tipo verbal, o espacial y consiste en pedir a los voluntarios que recuerden si el estímulo que se presenta es igual al que se presentó N ensayos atrás (Jaeggi y cols., 2010). En esta tarea se puede evaluar el tiempo de reacción y el número de aciertos (Jonides y cols., 1997).

La eficiencia en la memoria de trabajo mejora tras períodos largos de entrenamiento (Westerberg y Klingberg, 2007,); se ha observado que la activación en la corteza prefrontal incrementa tras un período de entrenamiento en tareas de memoria de trabajo, sin embargo para que esta pueda darse se requiere de la ejecución de diferentes tareas de memoria por 5 semanas 3 o 4 veces por día (Olesen y cols., 2004).

I. Memoria y estrés

Una de las causas de la controversia surgida respecto al efecto negativo de la PS sobre el proceso de memoria es que esta técnica se considera un generador del estrés, uno de los

estados emocionales más estudiados, en el que se sabe que las hormonas adrenocorticales son liberadas como respuesta (Meerlo y cols., 2002). Se ha sugerido que estas hormonas están involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria cuando se utilizan tareas motivadas por estímulos aversivos (Harvey y cols., 1984), como la prolongación de la vigilia.

Numerosos estudios han demostrado que el estrés agudo (es decir, el que se presenta como una agresión intensa limitada en tiempo) o la elevación de las concentraciones de los glucocorticoides afecta el aprendizaje (Rozendaal y cols., 2006).

Incluso se han realizado diferentes experimentos donde se observa que un grupo de sujetos expuestos a estrés tiene una disminución en la capacidad de memorizar palabras con distinto contenido emocional, respecto a un grupo de sujetos no expuestos (Kuhlmann y cols., 2005).

Por otro lado, en tareas de memoria auditiva se observan diferencias respecto al grupo control, en cuanto a una disminución en la ejecución en voluntarios estresados, (Vedhara y cols., 2000).

En lo que respecta a la memoria de trabajo, Schoofs y cols., en 2008 utilizaron un modelo de estrés psicosocial en el cual los voluntarios deben resolver un problema matemático y hacer una presentación ante un grupo de personas que cuestionan lo que se presenta y posteriormente midieron niveles de cortisol en saliva. Estos investigadores observaron después de esta manipulación un incremento significativo en los niveles de cortisol con respecto a un grupo control que realizó la misma tarea, pero en una habitación vacía. Posteriormente, los sujetos resolvieron la tarea de memoria de trabajo en dos diferentes niveles de complejidad.

En este estudio se observó que ambos niveles de complejidad fueron afectados negativamente por el estrés. Sin embargo, se corroboró el hecho de que este deterioro es reversible aproximadamente 35 minutos después de que cesa el factor estresante. Además de incrementar el número de errores, se observa también un decremento en el tiempo de reacción al elevarse los niveles de cortisol (Shoofs y cols., 2008).

En otro estudio realizado en adultos sanos también utilizando estrés psicosocial se evaluó la capacidad de los voluntarios para recordar una lista de palabras que contenían palabras de tipo neutro, 10 negativas y 10 positivas y se observó un deterioro en el grupo sometido al estrés al recordar palabras con contenido emocional tanto negativo, como positivo, no así en las neutras. Además de esta prueba se valoró una tarea de memoria de trabajo y de atención y en estas tareas no se observaron diferencias entre los grupos, lo que implica que el estrés afecta principalmente tareas con contenido emocional, específicamente en esta tarea de memoria declarativa (Kuhlman y cols., 2005). Esto revela que la respuesta al estrés se va a manifestar de una manera distinta dependiendo del tipo de tarea a realizar y del contexto en el que se estudia.

B. Sueño y memoria

Además de la regulación de las funciones corporales, el sueño juega un papel fundamental en el procesamiento de la información recientemente adquirida. La elaboración de las huellas de la memoria recibida durante el período de vigilia, se supone lleva dos etapas

sucesivas que tienen lugar durante el SOL y finalmente, durante el sueño MOR (Giuditta y cols., 1995).

Las primeras investigaciones al respecto fueron hechas por los psicólogos norteamericanos Jenkins y Dallenbach en 1924 quienes realizaron un estudio que consistió en presentar una lista de palabras a un grupo de voluntarios, tras lo cual unos durmieron y otros no. Al evaluar posteriormente cuántas palabras recordaban, encontraron que los que habían dormido, recordaban más (Rauchs y cols., 2005).

Sin embargo, desde finales de la década de los 50 se ha investigado si esta relación depende del momento del sueño o de las etapas (Walker y Stickgold, 2004). Estos estudios sugieren que cada etapa de sueño podría estar relacionada con un proceso específico. Uno de los primeros hallazgos es que hay un incremento en la proporción de las distintas etapas de sueño, si éste se da inmediatamente después del período de aprendizaje, a diferencia de cuando éste se pospone, lo que sugirió que el sueño podría jugar una función activa en el proceso de consolidación (Graves, 1936).

A partir de estos conocimientos los estudios se han realizado evaluando los cambios en el patrón de sueño o el efecto de su privación en dos tipos diferentes de memoria (declarativa o explícita y no declarativa o implícita) y al aprender diversas tareas que impliquen sistemas distintos para tratar de identificar qué función ejerce el sueño en estos procesos (Fogel y cols., 2007).

Con respecto al sueño MOR se han hecho diferentes experimentos para evaluar en qué tipo de memoria está más involucrado. Se ha observado que éste se incrementa

correlacionándose con el nivel de eficacia en aprender tareas involucradas con el lenguaje, específicamente, aprender un nuevo idioma (De Koninck y cols., 1989). En un estudio similar se observó que al evaluar la estructura de sueño después de estudiar para realizar un examen, los sujetos no presentaron un incremento significativo en el sueño MOR, sin embargo, sí se incrementó el número de movimientos oculares rápidos (Smith, 1991). Por otro lado, Stickgold y colaboradores en 2000, refieren que la memoria requiere de tres pasos diferentes para su consolidación: el primero se da en la vigilia, el siguiente durante el SOL y el tercero en sueño MO, por lo tanto, un sujeto privado total o selectivamente de sueño no concluiría este proceso. Es decir, cuando estamos despiertos recibimos la información y cada etapa de sueño contribuye en mantener esta información en un almacén de memoria a corto plazo o bien eliminarla (Stickgold y cols., 2000).

Actualmente se tiene acceso a otro tipo de técnicas que contribuyen al estudio de la memoria y el sueño. A partir del año 2000, Pierre Maquet y un grupo de colaboradores observaron, durante un estudio de tomografía por emisión de positrones, que se presentaba una mayor activación en las áreas asociadas con el aprendizaje visuoespacial en aquellos sujetos con un entrenamiento en tareas de memoria previo a dormir en sueño MOR. Con la técnica de resonancia magnética funcional se ha observado el cerebro de un sujeto al realizar una tarea que implica memoria visual y aprendizaje motor, posteriormente se le deja dormir y al entrar en esta etapa se observa una réplica de la activación cortical que se observó durante la vigilia (Laureys y cols., 2001).

Sin embargo, a pesar de que el sueño MOR es el principal involucrado hasta el momento en los procesos cognitivos durante el sueño, se sabe también que mientras dormimos en sueño NMOR, se llevan a cabo procesos de memoria, involucrados principalmente con la memoria explícita (Gais y Born, 2004). Uno de los grafoelementos más estudiados son los husos de sueño que aparecen principalmente en la etapa 2 de sueño. Después de realizar una tarea que involucra habilidades motrices se observa un incremento en la duración de la etapa 2 de sueño y un incremento en el número de husos de sueño por minuto (Fogel y Smith, 2006). Esto se observa incluso en períodos de siesta donde la memoria es facilitada al presentarse el sueño ligero y también se observa un incremento en el número de husos de sueño (Nishida y Walker, 2007).

En un estudio realizado en Alemania (Drosopoulos y cols., 2005), se exploró la memoria explícita en un grupo de voluntarios a quienes se les presentaron dos listas de palabras que tenían que memorizar y 3 horas después eran interrogados para saber cuántas palabras recordaban y en cuál de las dos listas habían aparecido las palabras. Este grupo se dividió en tres, a uno se le permitió dormir durante la primera mitad de la noche donde predomina el SOL, a otro durante la segunda mitad donde se presenta principalmente sueño MOR y el tercer grupo permaneció despierto. En los tres casos se realizó un interrogatorio posterior y se observó que quienes retenían mejor las palabras eran aquellos participantes que pudieron dormir durante el SOL, lo que sugiere mecanismos involucrados con la memoria de reconocimiento, ligados con esta etapa de sueño en particular. Gais y Born (2004) han realizado diferentes investigaciones para evaluar el efecto del sueño en la consolidación de la

memoria, además de la revisión de estudios donde se evalúa la memoria declarativa en diferentes momentos del día y han observado que siempre hay una mejor ejecución en aquellos voluntarios que resuelven tareas después de que se le permite dormir en SOL, concluyendo que quizá existe información almacenada en el hipocampo, y en esta etapa a través de redes neocorticales se traslada la información a un almacén de largo plazo para consolidarla.

I. Sueño y memoria de trabajo

Con respecto a la memoria de trabajo y su relación con el sueño, se ha utilizado principalmente el modelo de PS, pues se sabe que ésta impacta significativamente el funcionamiento mnemónico humano (Pilcher y Huffcutt, 1996), y afecta negativamente los niveles de alerta y el rendimiento cognitivo. Se ha demostrado que un individuo privado de sueño presenta mayor tiempo de reacción y reducción del estado de alerta, en relación con las personas con períodos de sueño normales (Harrison y Horne, 2000, Thomas y cols., 2000).

Las técnicas de imagen que miden los cambios en el flujo sanguíneo cerebral se han utilizado para demostrar el déficit cognitivo observado durante el sueño (Horne, 1993; Drummond y cols., 2000). En estudios con tomografía por emisión de positrones (PET) (Wu y cols., 1991, Thomas y cols., 2000) y de resonancia magnética funcional (fMRI; Drummond y cols., 2001, 2004) se ha demostrado que los cambios en la activación cerebral que provoca la PS están asociados con cambios en el rendimiento cognitivo. En concreto, en los estudios con

PET, se observa una disminución significativa en el metabolismo de la glucosa después de 24 h (Thomas y cols., 2000) y 32 h (Wu y cols., 1991) de privación del sueño, mismo que se correlaciona con un descenso en la ejecución en tareas cognitivas.

La corteza prefrontal que, como se mencionó anteriormente es una de las estructuras responsables de la memoria de trabajo, es afectada tras un período de PS (Lythe y cols., 2012), aunque no es la única. Según los estudios de Thomas y colaboradores (2000), el tálamo también presenta una disminución en la activación en redes tálamo-corticales, tras un período de 24 horas de privación. A pesar de estos datos, algunos autores afirman que dependiendo de la tarea puede no haber cambios o incluso existir una disminución en la activación de estas áreas en distintos períodos de PS (Chee y cols., 2006).

En otros estudios, Drummond y colaboradores en 2004 determinaron, tras un estudio de PS evaluando diferentes tipos de tareas, que los cambios de activación cerebrales dependen de la complejidad de la tarea, pues ante un período de privación de una manera compensatoria se activan áreas de la corteza parietal y la región dorsolateral izquierda de la corteza prefrontal.

Ante esto podemos concluir que la PS es una situación que genera cambios trascendentales en la forma de respuesta de nuestro organismo que pueden cambiar nuestra ejecución de manera significativa, dependiendo del tiempo que se prive y de las tareas a realizar.

2. Planteamiento del problema

El ciclo de sueño-vigilia es fundamental para la expresión óptima de las funciones cerebrales, incluidas el aprendizaje y la memoria. Se ha observado que tras un período de PS hay cambios en la activación de estructuras cerebrales como la corteza prefrontal, parietal y el tálamo, entre otras, lo que podría afectar procesos como la memoria de trabajo que depende directamente de estas estructuras y sus conexiones. Por otro lado, la PS es considerada como una situación generadora de estrés al demandar un gasto de energía extraordinaria en los individuos.

Asimismo, se ha revelado recientemente que la respuesta de estrés que involucra el incremento de esteroides de origen adrenal, es capaz de alterar a la eficiencia en memoria. Sin embargo, no es claro si la afección en la eficiencia en memoria de trabajo depende del aumento de cortisol provocada por la PS. Por lo cual, en este estudio analizamos la eficiencia de la memoria de trabajo en sujetos sometidos a PS, evaluando simultáneamente la respuesta de estrés, valorada a través de la medición de los niveles de cortisol, para buscar relaciones entre ambos procesos.

Pregunta de investigación:

¿La privación de sueño y el estrés que ésta provoca afecta la ejecución de la memoria de trabajo y el tiempo de reacción?

3. Hipótesis

- La ejecución en la memoria de trabajo está afectada por la privación de sueño y por el estrés que ésta provoca, sin embargo, este deterioro es reversible tras un período de sueño normal.

4. Objetivo general

- Evaluar el efecto de la privación de sueño y el estrés que ésta provoca, sobre la memoria de trabajo

A. Objetivos específicos:

- Evaluar la ejecución de la memoria de trabajo a lo largo de diferentes períodos de PS a lo largo de 36 horas, con la tarea N-Back en dos diferentes niveles de complejidad.
- Determinar el estrés que genera la PS, a través de los niveles de cortisol, cada 6 horas.
- Correlacionar la ejecución y los tiempos de reacción con los niveles de cortisol y el tiempo de PS.
- Evaluar la memoria de trabajo y los niveles de cortisol después de un período de sueño.

5. Método

A. Participantes:

Dieciocho voluntarios sanos, diestros y estudiantes de la Universidad Autónoma Metropolitana. Edad (Media \pm Desviación Estándar; 27 \pm 4).

Criterios de inclusión:

Voluntarios sanos de 21 a 35 años de edad que cumplan por lo menos con 14 años de estudio y que tengan un coeficiente intelectual (CI) normal (De 90 a 109 puntos), que se evaluará a través de la prueba de Inteligencia Beta III (≥ 90 puntos) (Kellogg y Morton, 2003).

Criterios de exclusión:

La presencia de trastornos de sueño, médicos, psiquiátricos o neurológicos. Consumo de fármacos, drogas ilegales (como por ejemplo drogas sintéticas, inhalantes, marihuana, hongos, hachís, opio, peyote).

Criterios de eliminación:

No realizar las 8 sesiones. Quedarse dormido en períodos de privación de sueño. Abandonar el protocolo.

Cada voluntario fue evaluado con las escalas de inteligencia y trastornos de sueño, además, se les aplicaron dos inventarios para medir sintomatología de ansiedad y depresión (Escala de Hamilton para Ansiedad e Inventario de Depresión de Beck, respectivamente), para descartar trastornos de sueño, médicos o psiquiátricos y para asegurarnos de que su CI estaba dentro del promedio.

Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado en la que se explicaron los detalles del estudio y se especificó que podían retirarse del mismo en cualquier momento si así lo decidían.

B. Instrumentos:

a. Evaluación de inteligencia no verbal Beta III: Esta es una escala que evalúa inteligencia no verbal, se puede aplicar de forma individual o grupal en 25 a 30 minutos. La prueba arroja un puntaje que va de 48 a 155 puntos, a partir de los cuales se asignan valores cualitativos de coeficiente intelectual:

- Puntaje de 69 o inferior: CI extremadamente bajo.
- 70 a 79: Limítrofe.
- 80-89: Promedio bajo.
- 90-109: Promedio.
- 110-119: Promedio alto.
- 120-129: Superior.
- 130 o más: Muy superior

Una ventaja de esta prueba es que los voluntarios que la realizan no requieren un nivel cultural específico ni saber leer o escribir.

b. Historia clínica semiestructurada para explorar trastornos de sueño: Es una herramienta de uso rutinario dentro de la clínica de trastornos de sueño en la que se evalúan antecedentes patológicos y no patológicos de los voluntarios, además de

hábitos y signos y síntomas de trastornos neurológicos, médicos y psiquiátricos. Con respecto al sueño se evalúan hábitos respecto a la hora de acostarse y levantarse, latencia a sueño, sensación al despertar, y la presencia de síntomas de algún trastorno durante el dormir, como insomnio, problemas respiratorios, movimientos anormales o parasomnias. De esta manera se descartó a quienes regularmente duermen adecuadamente de los que no.

c. Escala Hamilton de Ansiedad: Esta escala estandarizada en México explora mediante 14 preguntas datos que sugieran trastornos relacionados con ansiedad. 13 referentes a signos y síntomas ansiosos y el último que valora el comportamiento del paciente durante la entrevista. Cada ítem se valora en una escala de 0 a 4 puntos. La puntuación total es la suma de las de cada uno de los ítems. El rango va de 0 a 56 puntos. De manera orientativa, se propone la siguiente interpretación: 0 - 5 puntos (No ansiedad), 6 - 14 (Ansiedad menor), 15 ó más (Ansiedad mayor). Aunque es muy importante explorar la presencia d ataques de pánico u otros síntomas claros en el paciente.

d. Inventario de depresión de Beck: Es una prueba también estandarizada en México que explora, a través de 21 preguntas, síntomas que sugieran depresión. Se presentan 4 alternativas de respuesta para cada ítem, que evalúan la gravedad / intensidad del síntoma y que se presentan igualmente ordenadas de menor a mayor gravedad con la opción de contestar de 0-3. El rango de la puntuación obtenida es de 0-63 puntos. Los puntos de corte usualmente aceptados para graduar la intensidad/

severidad son los siguientes: No depresión: 0-9 puntos, Depresión leve: 10-18, Depresión moderada: 19-29, Depresión grave: > 30.

e. Escala Universal de Consumo de Sustancias: Valora el consumo de sustancias de abuso y determina dependencia, es autoaplicable y explora la necesidad de consumo del sujeto y la presencia de síndrome de abstinencia o incremento del consumo a pesar de los riesgos que presente a la salud.

f. Inventario de Edimburgo: Evalúa la lateralidad dominante a través de 12 preguntas que exploran la preferencia por usar cada mano en distintas actividades, por ejemplo, qué mano utiliza para escribir, dibujar, encender un cerillo, o bien, con que pierna patea y que ojo usa para ver a través de un tubo. Las respuestas van desde derecha muy preferente hasta izquierda muy preferentes, aunque también existe la opción de usar cualquier mano de forma indiferente. Es autoaplicable y permite conocer el lado dominante para realizar actividades en los participantes.

g. Cuestionario de matutinidad-vespertinidad de Horne y Östberg: Esta es la traducción al español del test reducido de Matutinidad-Vespertinidad de Horne & Östberg. Este cuestionario permite conocer el cronotipo de una persona, es decir si es matutino o vespertino. Las personas matutinas tienen preferencia por realizar sus actividades durante la mañana, mientras que las vespertinas prefieren la tarde. Es importante conocer la tipología circadiana o cronotipo de cada individuo ya que influye directamente en cuestiones como el rendimiento, la atención, el cansancio o el bienestar laboral. En 5 reactivos evalúa la preferencia para realizar actividades en

diferentes períodos del día, es una escala autoaplicable y los valores más altos presentan mayor tendencia a la matutinidad.

C. Tarea N-back:

La tarea que utilizamos para medir la memoria de trabajo fue la prueba N-Back, en versión espacial, diseñada con el software E-prime v.1.2 (Psychology Software Tools, Inc., Pittsburgh, PA), y ejecutada en una computadora personal. Empleamos una matriz de 8×8 en el centro de la pantalla, con las siguientes medidas: ángulo visual horizontal (4.30°) y ángulo visual vertical (3.60°). La matriz aparecía en color gris y en una de las casillas se presentaba una cruz de fijación en el centro de la pantalla con un ángulo visual y vertical de: 0.0315°, que aparecía durante 500 ms, posteriormente aparecía la matriz con un círculo en color negro en alguna de las casillas. Existen 64 posibilidades, sin embargo, el círculo no apareció en las cuatro casillas circundando el punto de fijación (centro de la matriz).

Para la tarea 1-Back los participantes tenían que apuntar con el dedo índice de una mano si el estímulo que aparecía se había presentado en un ensayo anterior, y con la mano contraria si éste no se había presentado. Entre cada estímulo aparecía la matriz con el estímulo y el voluntario tenía 1500 ms para responder, posteriormente aparecía la pantalla con el punto de fijación durante 500 ms. Se presentaron un total de 120 estímulos, de los cuales eran 24 target y 96 no target. Las respuestas fueron capturadas con el E-prime software (Psychology Software Tools, Inc., Pittsburgh, PA). Las variables que se consideraron fueron: precisión, respuestas omitidas y tiempo de respuesta para cada estímulo, toda esta información fue

analizada por el software. Para la tarea 3-Back se llevó a cabo el mismo procedimiento, sólo que el voluntario tenía que indicar si el estímulo que se presentó era igual o no al que se presentó en el ensayo anterior (ver figura 5).

Antes de comenzar la prueba se explicó el procedimiento y se realizaron dos ensayos por cada tarea de N-Back, para corroborar que los voluntarios entendieran la prueba, sólo que las tareas realizadas fueron de tipo verbal, es decir, en la pantalla aparecían letras y la instrucción era presionar el botón si la letra había aparecido en N ensayos anteriores

A

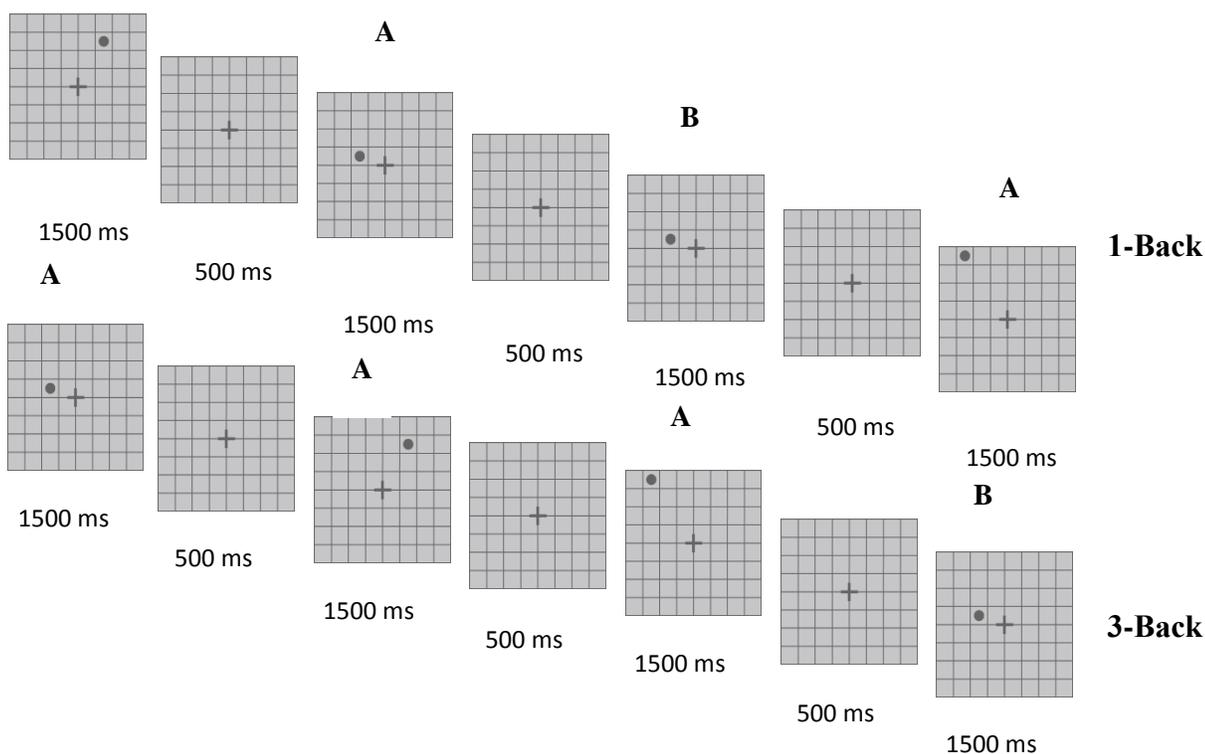


Figura 5. Tarea N-Back. En la letra A se presenta el estímulo *non-target* (estímulo diferente a n ensayos atrás) y en la letra A el estímulo *target* (estímulo igual a n ensayos atrás). En la parte superior se ejemplifica 1-Back y en la parte inferior se observa 3-back.

Los niveles hormonales de cortisol se midieron a través de una prueba ELISA, de un kit comercial (Free Cortisol in Saliva ELISA, Inmuno Biological Laboratiros IBL-America). La curva estándar tiene un sensibilidad de 00 a 80 ng/ml. Los anticuerpos tienen reacción cruzada al compararlos con el cortisol de 29% para Corticosterona, 3% Cortisona, <1% 11-Deoxycortisol, <0.5 17 OH Progesterona, y <0.1% para Predisona, Progesterona, Dexametasona, Desoxicorticosterona, dehidroepiandosterona sulfatada, Estradiol, Estriol, Estrona y Testosterona.

Durante el período de evaluación para medir los niveles de cortisol, cada 6 horas se tomaron muestras de saliva utilizando un salivette Stardet (se usa un rollo de absorción que el voluntario mete en su boca durante 30 segundos hasta que quede impregnado con saliva), para recolectar de 200 a 300 ml de saliva, mismas que posteriormente fueron analizadas para determinar el nivel de cortisol por medio de la técnica de ELISA (procedimiento de ensayo inmunoenzimático). La prueba ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmuno-absorbente) la reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada y, por tanto, es fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que, al actuar la enzima, produce un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. En este estudio utilizamos un espectrofotómetro, la ventaja que tiene es que nos permite leer la placa

completa con todos los pozos que tiene al mismo tiempo lo cual nos evita que haya un error por leer a diferentes tiempos cada muestra.

Las muestras, curva estándar y controles fueron determinados por duplicado. Para los resultados se calculó el promedio tanto de la curva estándar, como de las muestras y controles. Se construyó una curva a partir de los valores y , utilizando el valor medio de absorción de cada muestra, se determinó la concentración correspondiente. (Hellhammer y cols., 2009, Inder y cols., 2012).

E. Diseño experimental:

Se formaron dos grupos, uno experimental y un grupo control, cada uno con 9 sujetos. Cabe mencionar que tuvo que mantenerse una N pequeña debido a las dificultades técnicas para conseguir a los voluntarios, esto porque en muchos casos era difícil que accedieran participar en el protocolo y, por otro lado, pocos de los voluntarios cubrían los criterios de inclusión.

A todos los participantes se les pidió mantener un horario regular de sueño (es decir, una cantidad diaria de sueño de 6.5 a 7.5 horas), evitando desvelos una semana previa al estudio para evitar el efecto de la privación crónica. Fueron monitoreados través de un diario de sueño, validado por la Fundación Americana de Sueño, en el que se detallaron los hábitos y horarios de cada voluntario. En dicha bitácora se especificó la hora de acostarse, hora de

levantarse, horas de sueño, latencia a éste, consumo de sustancias con cafeína, ejercicio previo y despertares nocturnos.

A continuación se describen los grupos:

Grupo Control: Durante un período de 36 horas se mantuvo a este grupo de sujetos en el laboratorio, pero durante la noche se les permitió dormir normalmente.

A los voluntarios se les evaluó la memoria de trabajo con dos niveles de complejidad (1 Back y 3 Back) y se adquirieron muestras de saliva cada 6 horas. Sin embargo, sus períodos nocturnos de sueño fueron respetados, con el objetivo de mantener su sueño regular.

Al despertar de la segunda noche de sueño, aproximadamente a las 8 a.m., se realizó una última evaluación de memoria de trabajo y se tomó la última muestra de saliva (ver figura 6).

Grupo Experimental: Se realizó un estudio de privación de sueño total de 36 horas de forma natural, sin utilizar estimulantes. Cada 6 horas a los voluntarios se les tomó una muestra de saliva y se les aplicó la tarea N-Back con dos niveles de complejidad: 1-Back y 3-Back, que tiene una duración aproximada de 5 minutos cada una. En cada ocasión en que se evaluaron las tareas N-Back, se emplearon estímulos diferentes. El orden de aplicación de estas tareas se contrabalanceó entre sujetos.

En el intervalo entre una y otra medición, los sujetos pudieron realizar diversas actividades para mantenerse despiertos, como ejercicio leve, ver televisión, jugar videojuegos, etc., todo esto con el fin de evitar que se quedaran dormidos, ya que mantenerse en el

laboratorio representa un estresor. Para alimentarse, se les proporcionaba comida de la cafetería de la Universidad y en ocasiones se les permitía salir a comer lo que prefirieran.

Después de las 36 horas de vigilia prolongada, a los voluntarios se les permitió dormir libremente por un período aproximado de 10 horas, que fue el tiempo que en promedio durmieron, despertando de manera espontánea.

Al despertar, aproximadamente a las 8 de la mañana, se les aplicó a los voluntarios una última evaluación de la tarea N-Back y se les tomó la última muestra de saliva (Ver figura 6).

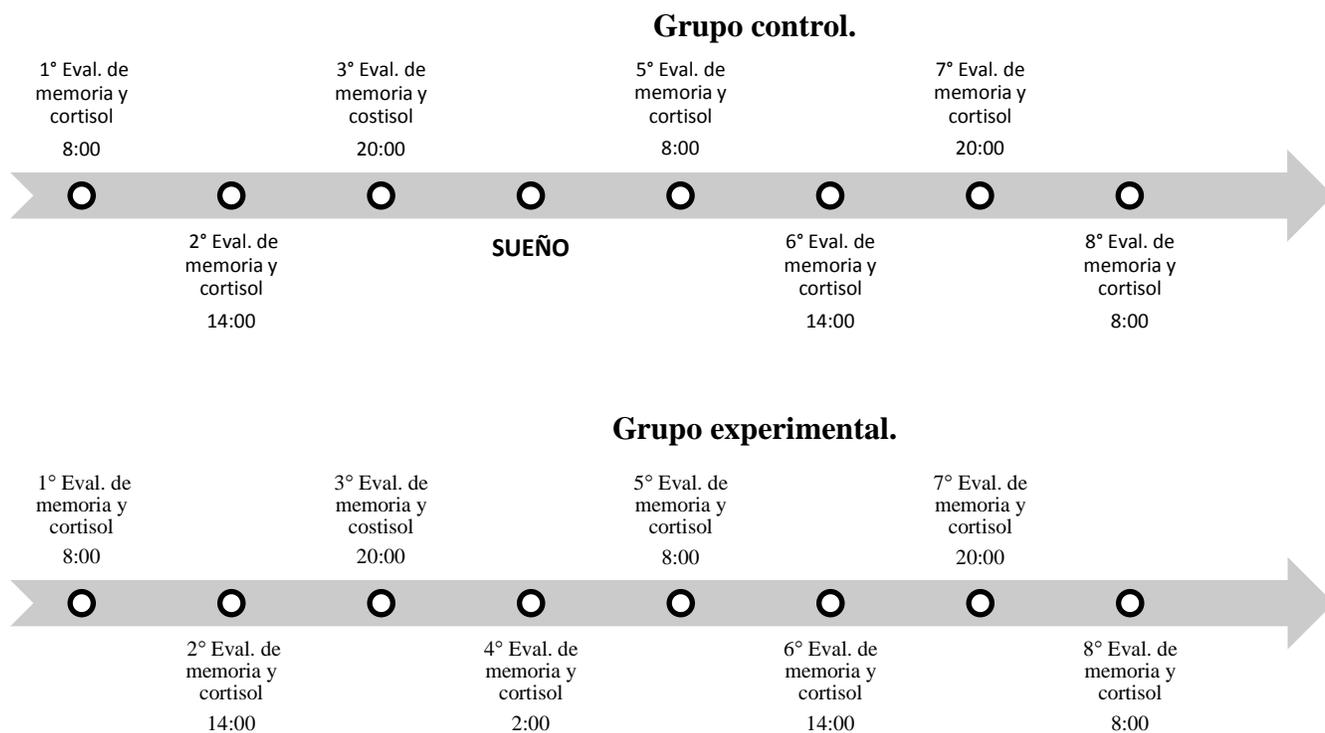


Figura 6. Descripción del diseño experimental utilizado.

F. Análisis de datos:

La base de datos fue realizada y ejecutada en el programa estadístico SPSS versión 12. La variable analizada fue el índice de ajuste de ejecución, que se realiza para saber si los participantes discriminan eficientemente entre los estímulos target de los no target. (AHR por sus siglas en inglés) Este índice se calcula restando la tasa de error (ER) a la tasa de aciertos (HR). La HR se calcula dividiendo el número de respuestas correctas de los estímulos target entre el número total de estímulos target, mientras que la ER se calcula dividiendo el número de errores de los estímulos non target entre el total de los estímulos non target. El AHR nos da entonces un valor que va de -1 a 1. Un AHR = 0 indica que las respuestas fueron dadas al azar, un AHR = 1 indica que no hubo errores, y un AHR = -1 indica que todas las respuestas fueron incorrectas y el voluntario quizá no entendió la prueba (Abi-Dargham y cols., 2002, Ruíz-Conteras y cols., 2012).

Se realizó una prueba de medidas repetidas para calcular las diferencias entre grupos (experimental contra control) entre sesiones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) y entre complejidad de la tarea (1-Back contra 3 Back). Las variables evaluadas fueron las medias de AHR, para medir la ejecución en cuanto a la proporción de aciertos; la media el tiempo de reacción en milisegundos y las medias de las concentraciones de cortisol en ng/ml.

Además de considerar las variables intra e inter grupos se realizó un análisis con el coeficiente intelectual como covariable y con los valores de cortisol para cada sesión. En ningún caso se encontraron diferencias significativas.

Los resultados se consideraron significativos con una $P < 0.05$.

6. Resultados

Se obtuvieron los siguientes resultados en las mediciones de cada variable (ver tabla 1, 2, 3 y 4):

Tabla 1. Estadísticos descriptivos por grupo.

	Grupo control Media \pm EEM	Grupo experimental Media \pm EEM	P
Edad	27.2 \pm 1.1	27.4 \pm 1.5	P=.1
Coficiente intelectual	103.78 \pm 4.4	101.11 \pm 3.0	P=.4
Cronotipo	17.0 \pm 1.0	16.7 \pm .9	P=.8
Lateralidad	16.1 \pm 1.7	16.3 \pm 1.7	P=.8
Depresión	2.4 \pm .8	5 \pm 1.9	P=.1
Ansiedad	5.4 \pm 2.0	3.7 \pm 1.8	P=.5

Tabla 2. Eficiencia en la ejecución de la tarea N-Back por grupo y por sesión.

Eficiencia	N-Back	Grupo control AHR ± EEM	Grupo experimental AHR ± EEM
Sesión 1	1-Back	.744 (.06)	.727 (.09)
	3-Back	.242 (.04)	.198 (.05)
Sesión 2	1-Back	.842 (.03)	.820 (.03)
	3-Back	.390 (.05)	.303 (.07)
Sesión 3	1-Back	.840 (.03)	.860 (.03)
	3-Back	.331 (.07)	.377 (.07)
Sesión 4	1-Back		.855 (.04)
	3-Back		.330 (.03)
Sesión 5	1-Back	.894 (.02)	.722 (.08)*
	3-Back	.305 (.07)	.282 (.06)
Sesión 6	1-Back	.907 (.05)	.801 (.06)
	3-Back	.465 (.06)	.350 (.07)
Sesión 7	1-Back	.864 (.04)	.844 (.05)
	3-Back	.356 (.06)	.305 (.06)
Sesión 8	1-Back	.936 (.02)	.857 (.05)
	3-Back	.324 (.05)	.314 (.05)

Tabla 3. Tiempo de reacción en la tarea N-Back por grupo y por sesión.

Tiempo de Reacción	N-Back	Grupo control TR ± EEM	Grupo experimental TR ± EEM
Sesión 1	1-Back	547.6 (.05)	591.6 (54)
	3-Back	636.5 (65)	647.1 (78)
Sesión 2	1-Back	470.4 (32)	561.7 (45)
	3-Back	552.9 (46)	568.4 (63)
Sesión 3	1-Back	462.1 (18)	529.7 (55)
	3-Back	453.6 (31)	526.4 (53)
Sesión 4	1-Back		500.8 (29)
	3-Back		488.9 (47)
Sesión 5	1-Back	434.6 (20)	500.3 (50)
	3-Back	446.7 (32)	497.9 (57)
Sesión 6	1-Back	415.9 (13)	514.7 (45)*
	3-Back	423.5 (30)	505.1 (65)
Sesión 7	1-Back	434.3 (19)	454.8 (28)
	3-Back	412.1 (21)	492.3 (56)*
Sesión 8	1-Back	439.6 (17)	486.6 (35)
	3-Back	478.7 (36)	455.6 (48)

Tabla 4. Niveles de cortisol por grupo y por sesión.

Niveles de Cortisol	Grupo control ng/ml ± EEM	Grupo experimental ng/ml ± EEM
Sesión 1	5.8 (.7)	4.3 (.6)
Sesión 2	3.6 (.6)	2.9 (.3)
Sesión 3	2.1 (.4)	2.6 (.5)
Sesión 4		3.3 (.7)
Sesión 5	5.1 (.9)	5.4 (1)
Sesión 6	3.7 (.8)	3.9 (.8)
Sesión 7	2.7 (.4)	2.3 (.4)
Sesión 8	7.9 (1)	7.2 (1.5)

En la comparación del AHR entre el grupo con privación de sueño y el grupo de sueño normal por cada sesión se observó una disminución en las respuestas correctas en la tarea 1-Back después de 24 horas de privación (Sesión 5) ($F_{(1, 16)} = 5.85, p = 0.03$) (ver Figura 7). En la tarea 3-Back no se registran diferencias entre los grupos.

Por otro lado, se observaron diferencias intragrupos en la sesión 5 (24 horas de privación), con respecto a la sesión 3. Se observa una disminución significativa en el número de aciertos.

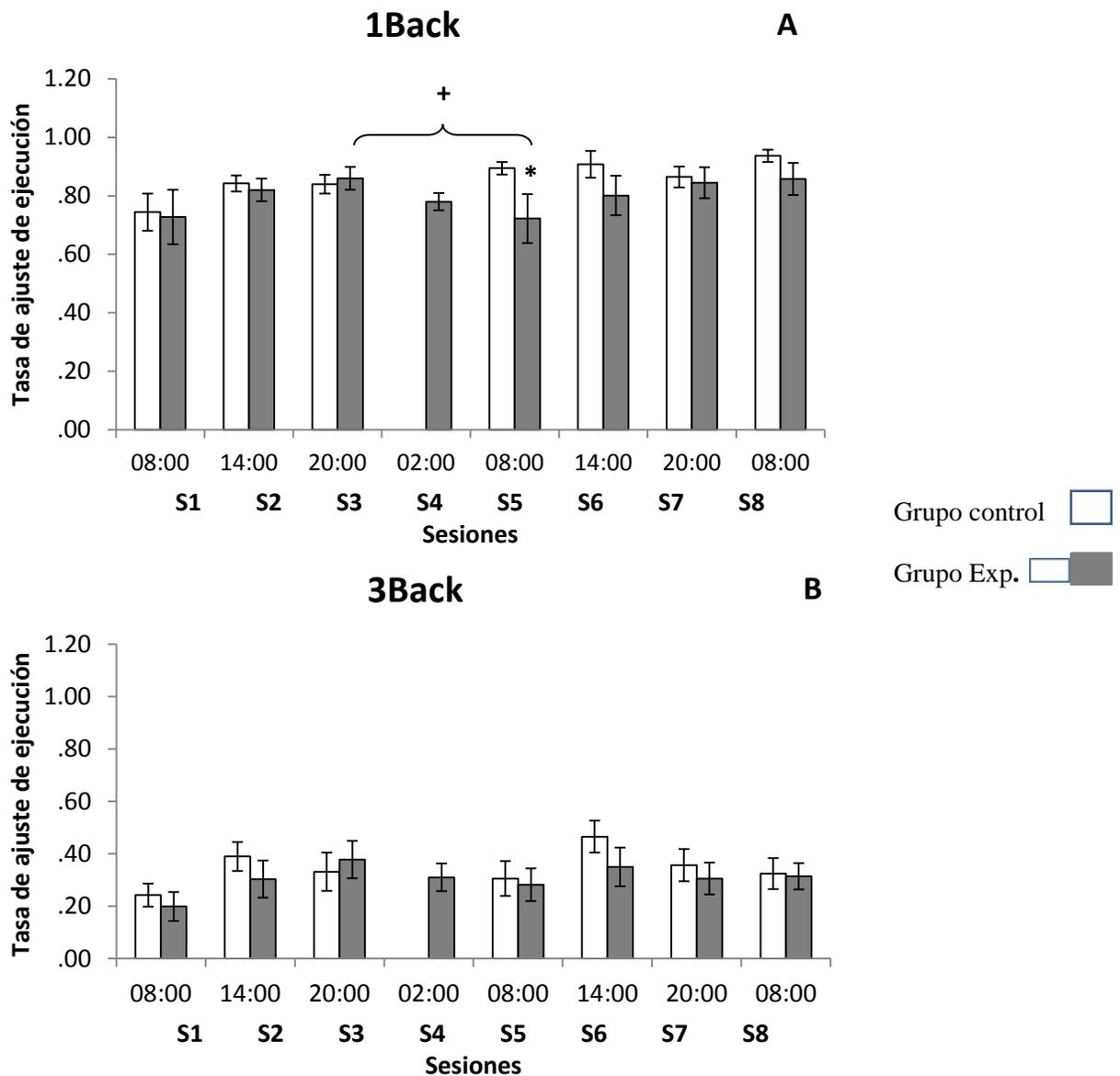


Figura 7. En esta figura se observan las diferencias entre grupos en la tasa de ajuste de ejecución (AHR) \pm EEM. En color blanco se muestra el grupo control (SN) y en color gris grupo con privación de sueño (PS), Las mediciones se refieren a cada una de las sesiones evaluadas. En la gráfica A se presentan los datos de la tarea 1 Back y se observa una diferencia significativa en el grupo experimental con respecto al grupo control en la sesión 5 * $p=0.03$. En la gráfica B se observa la tarea 3Back, donde no se presentan diferencias. Por otro lado, en la figura A se observan las diferencias intragrupos en el grupo experimental, ya que se observa una disminución en el número de aciertos en la sesión 5 tras 24 horas de privación de sueño con respecto a la sesión 3 $^+p=0.01$.

Los resultados en el tiempo de reacción indican un tiempo de respuesta menor en el grupo experimental en todas las sesiones: esta diferencia fue significativa únicamente a las 30 horas de privación (sesión 6) en la tarea 1-Back ($F_{(1,16)} = 7.40, p = 0.01$) y después de 36 horas de privación (Sesión 7) en la tarea 3 Back ($F_{(1,16)} = 7.5, p = 0.01$) (ver Figura 8).

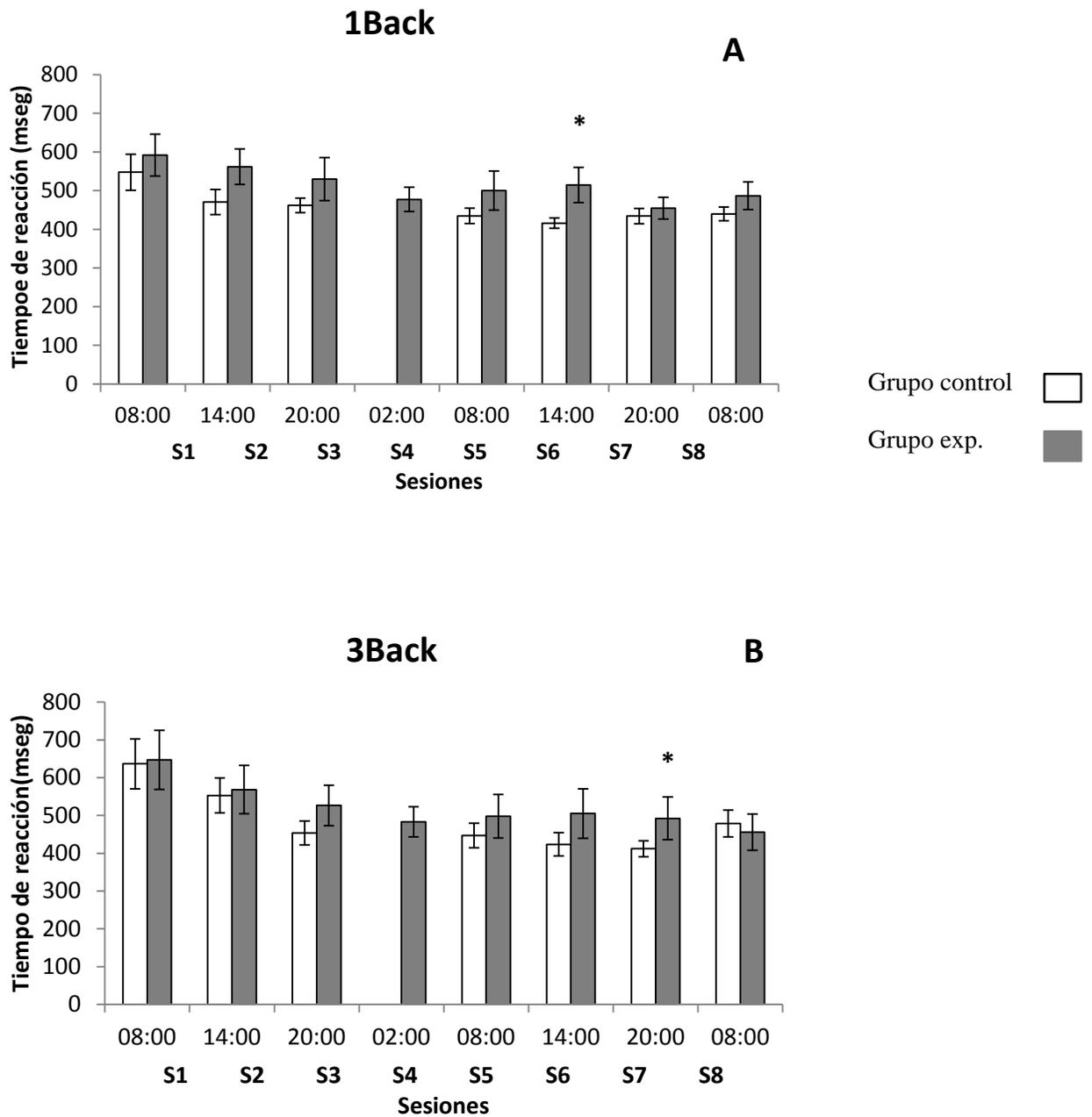


Figura 8. Tiempo de reacción por nivel de complejidad en cada grupo. El tiempo es evaluado en milisegundos, Media \pm SEM. En color blanco el grupo control y en gris el experimental. En la figura A se observa una diferencia significativa $p < 0.01$ en la sesión 6, donde se observa que el grupo experimental contesta más lento que el grupo control. En la figura B se observa una diferencia significativa $p < 0.01$ en la sesión 7, igualmente, los voluntarios del grupo experimental tardaron más tiempo en responder que los del grupo control.

Con respecto a las concentraciones de cortisol, no se observaron diferencias significativas entre los grupos a lo largo de las 8 sesiones. Es importante mencionar que ambos grupos mantienen las variaciones circádicas, es decir, los niveles más altos se presentan al despertar, sesiones 1, 5 y 8 (ver figura 9).

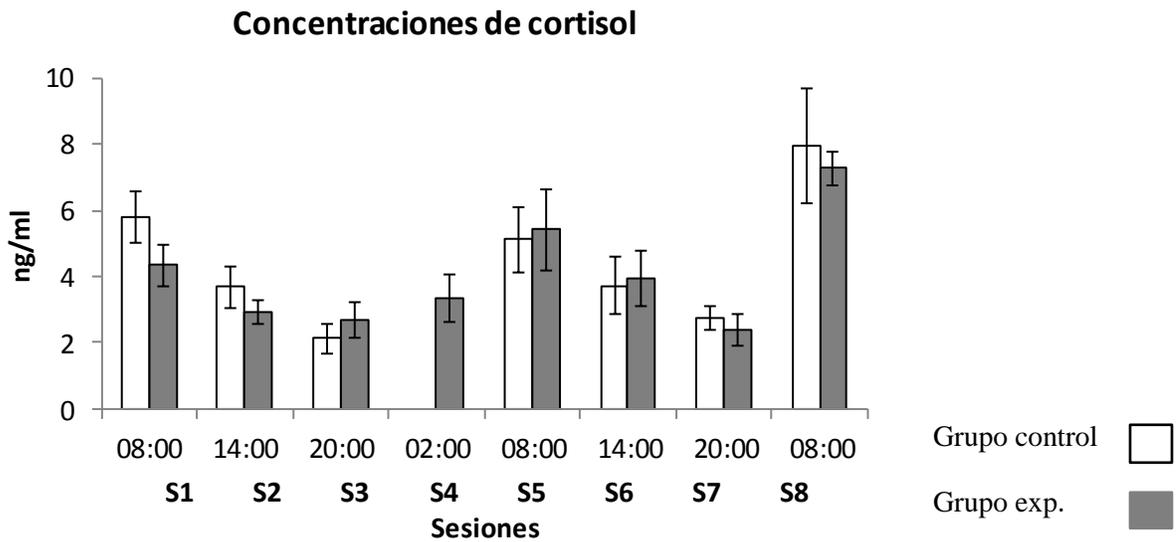


Figura 9. Niveles de cortisol en ambos grupos en las diferentes sesiones, en color negro el grupo control y en gris el experimental. Media \pm EEM. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

Los resultados de covarianza con el factor coeficiente intelectual como covariable no cambiaron con respecto a los previamente aquí descritos.

7. Discusión

De acuerdo con reportes previos (Kuriyama y cols., 2008, Owen y cols., 2005, Libedinsky y cols., 2011), la PS o vigilia prolongada genera un deterioro progresivo en el desempeño de tareas de memoria de trabajo y atención, deterioro que va aumentando en la medida en que se prolonga la privación. Sin embargo, en el presente estudio se observó una disminución significativa en el número de respuestas correctas a las 24 horas de privación y ésta no se volvió a presentar al aumentar las horas sin dormir a 30 y 36. Aunque el grupo control siempre tuvo un número mayor de respuestas correctas que el experimental. Por otro lado, los tiempos de reacción sólo se modificaron en dos momentos, y el tiempo de respuesta siempre fue mayor en el experimental en comparación con el grupo control. Estos resultados indican la importancia de dormir una noche completa para resolver eficazmente las tareas cognitivas que requieren los procesos de memoria de trabajo (Reuter-Lorenz, 2000, Kuriyama y cols., 2008).

Para determinar si existía estrés evaluamos los niveles de cortisol y no se observaron diferencias significativas entre grupos ni intragrupos. Es importante señalar que ambos grupos presentaron una oscilación normal manteniendo los niveles más altos por la mañana (Leproult y cols., 1997, Dedovic y cols., 2009), esto se puede deber a que la PS de 36 horas en circunstancias artificiales no genera el nivel de estrés necesario para observar cambios en niveles de cortisol. Por tanto, en este estudio no se observaron niveles de estrés que afectaran los resultados, como un factor que determinara las diferencias en los procesos cognitivos. Es importante señalar la participación de las hormonas esteroides secretadas por la corteza

adrenal, se ha reportado que ante la elevación de éstas se presenta un deterioro en la memoria (de Kloet y cols., 1999, Schoofs y cols., 2008). Algunos estudios señalan que los errores cometidos en las pruebas podrían estar asociados al momento del día en que se aplica la tarea. Una investigación señala que durante las primeras horas del día disminuye la eficiencia debido a que en este momento la concentración de glucocorticoides es mayor de por sí y con la privación, ésta aumenta (Maheu y cols., 2005), lo que afecta directamente el resultado. Así que los resultados no se explican por cambios en los niveles de cortisol, sino por la falta de sueño. Aunque, por otro lado, es importante considerar el contexto para considerar el efecto de los glucocorticoides, pues se sabe que dependiendo del tipo de tarea que se realiza podemos ver o no los cambios en la respuesta al estrés, dependiendo de los receptores que se activen (de Kloet y cols., 1999). En estudios con animales se ha observado que son los dos tipos diferentes de receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides los que modulan la respuesta al ejecutar las tareas, seleccionando la respuesta más oportuna de adaptación para el organismo (de Kloet y cols., 1999).

Otro aspecto a valorar es que la privación se considera un estresor agudo y existen distintos estudios en animales que señalan el efecto del estrés crónico mediado por la relación de la corteza prefrontal con el hipocampo, siendo el efecto en la corteza la clave del deterioro en tareas de memoria (Cerqueira y cols., 2007).

Aunque lo esperado sería que en ambas tareas encontráramos diferencias, pues al incrementar la complejidad los voluntarios requieren más atención y una mejor ejecución en la memoria de trabajo, vemos que la tarea en su nivel de complejidad mayor no presenta

diferencias (Maheu y cols., 2005). Quizá esto no se observó en nuestro experimento porque la función frontal pudo haberse mantenido intacta y no influenciada por la PS, ni por estrés que dificulte la ejecución en una tarea 3 Back más compleja. La influencia de la PS en 1 Back se podría deber a que los niveles de atención basal necesarios para la tarea sí se afectan por la privación (Lim y Dinges, 2008). Entonces, la PS parece no afectar en sí la memoria de trabajo sino que, posiblemente afecta la atención en vigilia basal que requiere el sistema de orientación frontal dorsal-parietal del sistema de orientación, pero no la orbital frontal-cinglar del sistema ejecutivo (Petersen y Posner, 2012). Tal vez ante una tarea más complicada los voluntarios requieren invertir más atención y eso haga que compensen la falta de sueño, o bien, que utilicen una estrategia distinta para realizar cada tarea (Chee y Choo, 2004). De hecho hay cambios en otras estructuras asociadas a estos procesos cognitivos. Se sabe que al realizar tareas de memoria de trabajo hay una activación de la corteza prefrontal y parietal, además de conexiones a otras áreas como el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo (Yoo y cols., 2007). También se ha observado que tras la PS hay cambios en el grado de activación en la corteza prefrontal, principalmente en la región ventromedial (Libedinsky y cols., 2011). Por otro lado, hay estudios en los cuales se ha ligado el efecto de la PS con la complejidad de la tarea. En un estudio de 35 horas de privación total de sueño, se observó por resonancia magnética funcional un incremento proporcional a la complejidad de la tareas en regiones como la corteza parietal y la corteza temporal bilateral, así como la corteza prefrontal izquierda inferior y dorsolateral (Drummond y cols, 2004).

Nuestros resultados ofrecen orientaciones futuras para el estudio de la influencia de la privación del sueño sobre la memoria de trabajo. En lo que respecta a la tarea N-back, los resultados sugieren que una tarea más sensible debe ser desarrollada para diferenciar y evaluar la atención y la memoria, a fin de evaluar correctamente los efectos de la prolongada vigilia, o la PS.

Por otro lado la PS aguda en condiciones artificiales no genera suficiente estrés para alterar la ejecución de la memoria de trabajo. La creación de un modelo experimental crónico puede ser necesaria para estudiar estos efectos.

Y por último la PS aguda puede afectar el nivel basal de atención en los estados vigilia para realizar una tarea de memoria de trabajo sencillo, pero no los sistemas requeridos en una tarea más compleja. De ahí que también se requiera la evaluación de la atención de manera independiente.

Otro aspecto a considerar será utilizar otra población de voluntarios, quizá en una edad avanzada y evaluar ahí el impacto de la privación de sueño⁹, o evaluar un modelo de restricción crónica o de privación aguda de sueño.

8. Conclusión:

La privación aguda de sueño en condiciones artificiales no genera el estrés suficiente para alterar la ejecución en la memoria de trabajo.

El efecto de la privación de sueño depende de la complejidad de la tarea realizada y del momento del día en que se ejecute, por lo que a mayor complejidad se podrían estar activando mecanismos distintos de ejecución que implicarían una compensación. Por otro lado, es importante considerar un factor circádico asociado a la ejecución de tareas.

9. Referencias

- Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y, Hwang DR, Keilp J, Kochan L, Van Heertum R, Gorman JM, Laruelle M. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *Journal of Neuroscience*. 2002, 22(9):3708-19.
- Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*. 2012, 74(2):246-60.
- American Academy of sleep disorders. International classification of sleep disorder. 2nd ed: Diagnostic and coding manual. 2005. Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine. USA
- American Academy of Sleep Medicine. The AASM Manual for the Scoring on Sleep and Associated Events. 2007. Westbrook Corporate Center. USA.
- Axelrod J, Felder C. Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochemical Research*, 1998, Vol. 23:575–581.
- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 1953, 118(3062):273-4.
- Aumann T, Horne M. Activity-dependent regulation of the dopamine phenotype in substantia nigra neurons. *Journal of Neurochemistry*. 2012, 121(4):497-515. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07703.x.
- Baddeley A. Working memory. *Science*. 1992, 31;255(5044):556-9.

- Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Salin-Pascual RJ and Shiromani PJ. Effects of hypocretin2-saporin and antidopamine-beta-hydroxylase-saporin neurotoxic lesions of the dorsolateral pons on sleep and muscle tone. *European Journal of Neuroscience* 2004; 19:2741-2752.
- Blanco-Centuri3n C, Shiromani PJ, ¿Qu3 nos mantiene despiertos? Mecanismos neurobiol3gicos del despertar en: Murillo-Rodr3guez E. *Hypnos. Investigaci3n b3sica y cl3nica del sue1o*. 2010. Ed. Mayab pp:71-89.
- Blum K, Chen AL, Giordano J, Borsten J, Chen TJ, Hauser M, Simpatico T, Femino J, Braverman ER, Barh D. The addictive brain: all roads lead to dopamine. *Journal of Psychoactive Drugs*. 2012, 44(2):134-43. Review
- Borbely AA. A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*. 1982; 1: 195-204.
- Bunge SA, Wright SB. Neurodevelopmental changes in working memory and cognitive control. *Current Opinion in Neurobiology*. 2007, 17(2):243-50.
- Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *The Journal of Neuroscience*. 2007 Mar 14;27(11):2781-7.
- Colten HR, Altevogt BM. *Sleep disorders and sleep deprivation: an unmet public health problem*. 2006. Washington, DC: National Academies Press.
- Chee MW, Choo WC. Functional imaging of working memory after 24 hr of total sleep deprivation. *Journal of Neuroscience*. 2004, 24(19):4560-7.

- Chee MW, Chuah LY, Venkatraman V, Chan WY, Philip P, Dinges DF. Functional imaging of working memory following normal sleep and after 24 and 35 h of sleep deprivation: Correlations of fronto-parietal activation with performance. *Neuroimage*. 2006. 31, 419 – 428
- Chowdhury A, Chandra R, Jha SK. Total sleep deprivation impairs the encoding of trace-conditioned memory in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2011 Mar;95(3):355-60. doi: 10.1016/j.nlm.2011.01.009
- Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L. The cortisol awakening response: More than a measure of HPA axis function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2009
- Cravatt BF, Prospero-Garcia O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*. 1995, 9;268(5216):1506-9.
- D'Ardenne K, Eshel N, Luka J, Lenartowicz A, Nystrom LE, Cohen JD. Role of prefrontal cortex and the midbrain dopamine system in working memory updating. *Proceeding of the National Academy of Sciences of U S A*. 2012.
- Dedovic K, Duchesne A, Andrews J, Engert V, Pruessner JC. The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage*. 2009, 47(3):864-71.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neuroscience*. 1999, 22(10):422-6. Review.

- De Koninck J, Lorrain D, Christ G, Proulx G, Coulombe D. Intensive language learning and increases in rapid eye movement sleep: evidence of a performance factor. *International Journal of Psychophysiology*. 1989, 8(1):43-7.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceeding on the National Academy of Science of the U S A*. 1998, 95(1):322-7.
- Dement W. History of sleep Physiology and Medicine. En: Kryger M, Roth T, Dement W. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Elsevier Saunders 4^o edition. 2005, pp-1-12.
- Drake C, Roehrs T, Breslau N, Johnson E, Jefferson C, Scofield H, Roth T. The 10-year risk of verified motor vehicle crashes in relation to physiologic sleepiness. *Sleep*. 2010, 33(6):745-52.
- Drosopoulos S, Wagner U, Born J. Sleep enhances explicit recollection in recognition memory. *Learning memory*. 2005. 12: 44-51
- Drucker-Colin RR, Spanis CW. Neurohumoral correlates of sleep: increase of proteins during rapid eye movement sleep. *Experientia*. 1975, 15; 31(5):551-2.
- Drummond SP, Brown GG, Gillin JC, Stricker JL, Wong EC, Buxton RB. Altered brain response to verbal learning following sleep deprivation. *Nature*. 2000. 403:655–657.

- Drummond SP, Gillin JC, Brown GG. Increased cerebral response during a divided attention task following sleep deprivation. *Journal of Sleep Research*. 2001. 10:85–92.
- Drummond SP, Brown GG, Salamat JS, Gillin JC. Increasing task difficulty facilitates the cerebral compensatory response to total sleep deprivation. *Sleep*. 2004, 1;27(3):445-51
- Edwards S, Evans P, Hucklebridge F, Clow A. Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology*. 2001, 26 (6):613-22.
- El Mansari M, Sakai K, Jouvet M. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Experimental Brain Research*. 1989, 76 (3):519-29.
- Espana RA, Plahn S and Berridge CW. Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexin. *Brain Research*. 2002; 943: 224-236.
- Etchepareborda MC, Abad-Mas L. Working memory in basic learning processes. *Revista de Neurología*. 2005, 40(1):S79-S83.
- Fogel SM, Smith C. Learning-dependent changes in sleep spindles and stage 2 sleep. *J Sleep Research*. 2006, 15(3):250-5.
- Fogel SM, Smith CT, Cote KA. Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems. *Behavioral Brain Research*. 2007, 4;180(1):48-61. Epub 2007 Feb 28.

- Franco-Pérez J, Ballesteros-Zebadúa P, Custodio V, Paz C. Major neurotransmitters involved in the regulation of sleep-wake cycle. *Revista de Investigación Clínica*. 2012, 64(2):182-91.
- Gais S, Born J. Declarative memory consolidation: Mechanisms acting during human sleep. *Learning memory*. 2004, 11: 679-685.
- Giuditta, A., Ambrosini, M. V., Montagnese, P., Mandile, P., Cotugno, M., Grassi Zucconi, G. and Vescia, S. The sequential hypothesis of the function of sleep. *Behavioral Brain Research*, 1995, 69: 157–166.
- Graves EA. The effect of sleep upon retention. *Journal of Experimental Psychology*. 1936. 19:316-22.
- Harvey S, Phillips JG, Rees A, Hall TR. Stress and adrenal function. *Journal of Experimental Zoology*. 1984. 232:633-45
- Harrison Y, Horne JA. The impact of sleep deprivation on decision making: a review. *Journal of Experimental Psychology Applied* 2000, 6:236–249
- Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009, 34(2):163-71.
- Herrera-Solís A, Vásquez KG, Prospéro-García O. Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2010, 95(1):106-12. doi: 10.1016/j.pbb.2009.12.014.

- Hobson JA, Stickgold R, Pace-Schott EF. The neuropsychology of REM sleep dreaming. *Neuroreport*. 1998, 16;9(3):R1-14. Review.
- Horne JA. Human sleep, sleep loss and behaviour. Implications for the prefrontal cortex and psychiatric disorder. *British Journal of Psychiatry* 1993, 162:413–419.
- Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y and Hayaishi O. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A* 2001, 98: 9965-9970.
- Inder WJ, Dimeski G, Russell A. Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2012, 77 (5):645-51.
- Jaeggi SM, Buschkuhl M, Perrig WJ, Meier B. The concurrent validity of the N-back task as a working memory measure. *Memory*. 2010,18(4):394-412.
- Jiménez-Anguiano A, Pacheco-Granados L, Moreno-Montiel H, Saldaña-Juárez C, Velázquez-Moctezuma J. Factores inductores de sueño. En: Quintanar L. Ed. *Neurobiología Experimental de la Conducta: fundamentos y tópicos afines*. Universidad de Aguascalientes, 2006: 29-50. 19.
- Jones K, Harrison Y. Frontal lobe function, sleep loss and fragmented sleep. *Sleep Medicine Reviews*. 2001, 5(6):463-475.
- Jonides, J., Schumacher, E. H., Smith, E. E., Lauber, E. J. Awh, E., Minoshima, S. Verbal working memory load affects regional brain activation as measured by PET. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 1997, 9(4), 462-475.

- Jouvett M. Paradoxical sleep mechanisms. *Sleep*. 1994, 17(8 Suppl):S77-83.
- Jouvett M. Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21:24S-27S.
- Kellogg C. Morton N. Beta III. Traducido por: Padilla-Sierra G. Ed. Manual Moderno, 2003. México.
- Kuhlmann S, Piel M, Wolf OT. Impaired memory retrieval after psychosocial stress in healthy young men. *Journal of Neuroscience*. 2005 Mar 16; 25(11):2977-82.
- Kuriyama K, Mishima K, Suzuki H, Aritake S, Uchiyama M. Sleep accelerates the improvement in working memory performance. *Journal of Neuroscience*. 2008, 1; 28(40):10145-50.
- Kuhlmann S, Piel M, Wolf OT. Impaired Memory Retrieval after Psychosocial Stress in Healthy Young Men. *The Journal of Neuroscience*. 2005. 25(11):2977–2982.
- Laureys S, Peigneux P, Phillips C, Fuchs S, Degueldre C, Aerts J, Del Fiore G, Petiau C, Luxen A, van der Linden M, Cleeremans A, Smith C, Maquet P. Experience-dependent changes in cerebral functional connectivity during human rapid eye movement sleep. *Neuroscience*. 2001. 105(3):521-5.
- Leproult R, Copinschi G, Buxton O, Van Cauter E. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep*. 1997, 20(10):865-70.
- Libedinsky C, Smith DV, Teng CS, Namburi P, Chen VW, Huettel SA, Chee MW. Sleep deprivation alters valuation signals in the ventromedial prefrontal cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2011; 5:70.

- Lim, J., Dinges, DF. Sleep Deprivation and Vigilant Attention. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1129:305-22. Review.
- Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Research*. 1989, 13; 479(2):225-40.
- Lupien SJ, Lepage M. Stress, memory, and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. *Behavioral Brain Research*. 2001, 14; 127(1-2):137-58.
- Lythe KE, Williams SC, Anderson C, Libri V, Mehta MA. Frontal and parietal activity after sleep deprivation is dependent on task difficulty and can be predicted by the fMRI response after normal sleep. *Behavioral Brain Research*. 2012, 15; 233(1):62-70. doi: 10.1016/j.bbr.2012.04.050.
- Maheu, F.S., Collicutt, P., Kornik, R., Moszkowski, R., Lupien, S.J. The perfect time to be stressed: a differential modulation of human memory by stress applied in the morning or in the afternoon. *Progress in neuropsychopharmacology and biological psychiatry*. 2005a, 29, 1281–1288.
- Maquet P. Functional neuroimaging of normal human sleep by positron emission tomography. *Journal of Sleep Research*. 2000, 9:207-231.
- McCaugh, JL. Memory — a century of consolidation. *Science*, 2000. 287, 248-251.
- McGinty D, Szymusiak R. Brain structures and mechanisms involved in the generation of NREM sleep: focus on the preoptic area. *Sleep Medicine Reviews* 2001; 5: 323-342

- Meerlo, P, Koehl, M, Van der Borght K, Turek FW. Sleep Restriction Alters the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress. *Journal of Neuroendocrinology*, 2002, 14, 397–402
- Monk TH, Reynolds CF 3rd, Buysse DJ, DeGrazia JM, Kupfer DJ. The relationship between lifestyle regularity and subjective sleep quality. *Chronobiology International*. 2003, 20(1):97-107.
- Moore-Ede MC, Czeisler CA, Richardson GS. Circadian timekeeping in health and disease. Part 1. Basic. Properties of circadian pacemakers. *The New England journal of medicine*. 1983;309:469–476
- Nishida M, Walker MP. Daytime Naps, Motor Memory Consolidation and Regionally Specific Sleep Spindles. *PLoS ONE*. 2007. 4; 2:e341.
- Olesen PJ, Westerberg H, Klingberg T. Increased prefrontal and parietal activity after training of working memory. *Natural Neuroscience*. 2004, 1:75-9.
- Owen AM, McMillan KM, Laird AR, Bullmore E. N-back working memory paradigm: a meta-analysis of normative functional neuroimaging studies. *Human Brain Mapping*. 2005, 25(1):46-59.
- Palchykova S, Winsky-Sommerer R, Meerlo P, Dürr R, Tobler I. Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2006 May; 85(3):263-71.
- Petersen SE, Posner MI. The attention system of the human brain: 20 years after. *Annual Review of Neuroscience*. 2012; 35:73-89.

- Pilcher JJ, Huffcutt AI. Effects of sleep deprivation on performance: a meta-analysis. 1996. *Sleep* 19:318–326.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*. 1997, 23; 276 (5316):1265-8.
- Prospéro-García O, Montes-Rodríguez C, Guzmán-Vásquez K, Herrera-Solís A, Rueda-Orozco P, Soria E, Prospéro-García A, Navarro L. Neuroquímica del Sueño en: Valencia Flores M, Pérez-Padilla JR, Salín-Pascual R, Meza-Vargas S. Trastornos del Dormir. Mc Graw Hill. 2º edición, 2009, pp. 49-80. México.
- Rauchs, G, Desgranges B, Foret J, Eustache F. The relationships between memory systems and sleep stages. *Journal of Sleep Research*. 2005. 14, 123–140
- Rechtschaffen A & Kales A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects, Brain Information Service University of California, 1968. Los Angeles, California.
- Repovs G, Baddeley A. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*. 2006. 28; 139(1):5-21.
- Reyes Prieto NM, Romano López A, Pérez Morales M, Pech O, Méndez-Díaz M, Ruiz Contreras AE, Prospéro-García O. Oleamide restores sleep in adult rats that were subjected to maternal separation. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012, 103(2):308-12. doi: 10.1016/j.pbb.2012.08.028.

- Reuter-Lorenz PA, Jonides J, Smith EE, Hartley A, Miller A, Marshuetz C, Koeppel RA. Age differences in the frontal lateralization of verbal and spatial working memory revealed by PET. *Journal of Cognition and Neuroscience*. 2000, 12(1):174-87.
- Ripley B, Overeem S, Fujiki N, Nevsimalova S, Uchino M, Yesavage J, Di Monte D, Dohi K, Melberg A, Lammers GJ, Nishida Y, Roelandse FW, Hungs M, Mignot E and Nishino S. CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology* 2001; 57: 2253-2258.
- Roozendaal, B., Okuda, S., de Quervain, D.J., McGaugh, J.L. Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 2006. 138, 901–910.
- Ruiz-Contreras A, Cansino S. The neurophysiology of the interaction between attention and episodic memory: a review of studies into the visual mode. *Revista de Neurología*. 2005, 16-31; 41(12):733-43.
- Ruiz-Contreras AE, Soria-Rodríguez G, Almeida-Rosas GA, García-Vaca PA, Delgado-Herrera M, Méndez-Díaz M, Próspero-García O. Low diversity and low frequency of participation in leisure activities compromise working memory efficiency in young adults. *Acta Psychologica (Amst)*. 2012, 139(1):91-6.
- Salamone JD, Correa M. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*. 2012, 8;76(3):470-85. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.021.
- Schoofs D, Preub D, Wolf O. Psychosocial stress induces working memory impairments in an n-back paradigm. *Psychoneuroendocrinology* 2008. 33, 643–653

- Smith C, Lapp L. Increases in number of REMS and REM density in humans following an intensive learning period. *Sleep*. 1991. 14(4):325-30.
- Squire LR, Stark CE, Clark RE. 2004. The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience* 2004; 27:279-306.
- Squire, LE. Zola, SM. Structure and function of declarative and non declarative memory systems. *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, 1996, 93, 13515-13522.
- Steinfels GF, Heym J, Strecker RE, Jacobs BL. Behavioral correlates of dopaminergic unit activity in freely moving cats. *Brain Research*. 1983, 10; 258(2):217-28.
- Steriade M. Acetylcholine systems and rhythmic activities during the waking--sleep cycle. *Program of. Brain Research*. 2004; 145: 179-196.
- Stickgold R, James L, Hobson A. Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nature Neuroscience*. 2000. 3:1237.
- Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K. Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*. 2010 Sep 1; 169(3):1115-26.
- Tort AB, Komorowski R, Kopell N, Eichenbaum H. A mechanism for the formation of hippocampal neuronal firing patterns that represent what happens where. *Learn Memory* 2011 Oct 21;18(11):718-27. doi: 10.1101/lm.2307711.
- Tulving, E. How many memory systems are there? *American Psychology*, 1985. 40,385-398.

- Thomas M, Sing H, Belenky G, Holcomb H, Mayberg H, Dannals R, Wagner H, Thorne D, Popp K, Rowland L, Welsh A, Balwinski S, Redmond D. Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness. I., Effects of 24 h of sleep deprivation on waking human regional brain activity. *Journal Sleep Research*. 2000. 9:335–352.
- Trulson ME, Preussler DW. Dopamine-containing ventral tegmental area neurons in freely moving cats: activity during the sleep-waking cycle and effects of stress. *Experimental Neurology*. 1984 Feb; 83(2):367-77.
- Vedhara K, Hyde J, Gilchrist ID, Tytherleigh M, Plummer S. Acute stress, memory, attention and cortisol. *Psychoneuroendocrinology*. 2000. 25(6):535-49.
- Velázquez-Moctezuma J, Arana-Lechuga Y, Terán Pérez G, Jiménez Anguiano A. ¿Por qué nuestro cerebro nos manda cada Noche a dormir? Mecanismos neuroanatómicos del sueño de ondas lentas en: Murillo-Rodríguez E. *Hypnos. Investigación básica y clínica del sueño*. 2010. Ed. Mayab pp: 91-105.
- Vinson GP. The adrenal cortex and life. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009, 5; 300(1-2):2-6. Epub 2008 Sep 17. Review.
- Waterhouse J, Fukuda Y, Morita T. Daily rhythms of the sleep-wake cycle. *Journal of Physiology Anthropology*. 2012, 13; 31(1):5.
- Walker M, Stickgold R. Sleep-Dependent Learning and Memory Consolidation. *Neuron*, 2004. Vol. 44, 121–133

- Westerberg H, Klingberg T. Changes in cortical activity after training of working memory — a single-subject analysis. *Physiology & Behavior*. 2007. 92, 186–192.
- Wolf, O.T. Effects of stress hormones on the structure and function of the human brain. *Expert Review of endocrinology and Metabolism*. 2006. 1, 623–632.
- Wu JC, Gillin JC, Buchsbaum MS, Hershey T, Hazlett E, Sicotte N, Bunney WE, Jr. The effect of sleep deprivation on cerebral glucose metabolic rate in normal humans assessed with positron emission tomography. *Sleep*. 1991. 14:155–162.
- Yoo SS, Hu PT, Gujar N, Jolesz FA, Walker MP. A deficit in the ability to form new human memories without sleep. *Nature and Neuroscience*. 2007 Mar; 10 (3):385-92.

Overexpression of MyoD Attenuates Denervated Rat Skeletal Muscle Atrophy and Dysfunction

Wei-Min Xiong¹, Jia-Hui Huang², Lei Xie², Yuan Qiao², Xin-Min Lu², Jiang-Chen Peng², Jin-Jia Hu^{2*}

¹Department of Gastroenterology, Shanghai 445 Hospital, Shanghai, China; ²Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China.
Email: *jjhu2609@126.com

Received August 28th, 2012; revised September 28th, 2012; accepted October 7th, 2012

ABSTRACT

Nerve injury commonly contributes to irreversible functional impairment, reconstruction of the function of muscle is big challenge. In denervated skeletal muscle, therapid expression of MyoD mRNA and protein also occurs during early postdenervation, which suggested that the function of denervation-induced MyoD may be to prevent denervation-induced skeletal muscle atrophy. However, the detail mechanism is not clear. Therefore, in this study, we established a stable-transfected MyoD L6 cell line. After the operation for cutting the rats' tibial nerve, the MyoD-L6 cells were injected in the gastrocnemius, the function of the gastrocnemius was monitored. It was found that injected the MyoD-L6 cells could attenuate the muscle atrophy and dysfunction. Therefore, overexpression of MyoD could serve as a new therapy strategy to cure denervation-induced dysfunction of skeletal muscle.

Keywords: MyoD; Denervation; Rat Skeletal Muscle; Atrophy; Dysfunction

1. Introduction

Nerve injury contributes to irreversible functional impairment, for example, destroying the nerve controlling skeletal muscle will result in skeletal muscle atrophy and dysfunction, which will seriously affect patients' lives [1,2]. To find a feasible solution, the research work in the world main focus on three fields: firstly, shortening the distance the nerve growth; Secondly, promoting nerve growth; On the other hand, attenuating the denervated skeletal muscle atrophy [1,3-6]. In clinical work, we commonly observed that nerve injury lead to the dysfunction of skeletal muscle because the muscle has already became to fibering before the nerve regeneration [7]. Therefore, if an effective solution to attenuate skeletal muscle atrophy until the injury nerve regeneration, it will abolish the dysfunction of skeletal muscle resulted by denervation.

MyoD is a member of the basic-helix-loop-helix family of proteins and acts as a transcriptional factor in several skeletal muscle-specific genes [8-10]. In normal embryonic development MyoD is upregulated at the time when the hypaxial musculature begins to form, but its role in the denervated skeletal muscle remains to be elucidated. It was reported that MyoD^{-/-} myogenic cells are committed to myoblast and proliferation. It was ob-

served that MyoD in vivo is expressed in adult skeletal muscle in response to diverse stimuli, such as overload, injury, and exercise. Especially in the early stage of nerve injury, the increasing expression of MyoD was observed, which suggested that MyoD plays a role in the plasticity of skeletal muscles. In denervated skeletal muscle, therapid expression of MyoD mRNA and protein also occurs during early postdenervation. Several studies suggested that the function of denervation-induced MyoD may be to prevent denervation-induced muscle atrophy [7,11-14]. However, rare information that MyoD prevents skeletal muscle atrophy could be obtained, and the molecular mechanism is not clear.

Therefore, our goal in this study is to investigate the effect of overexpression of MyoD skeletal muscle on attenuating denervation-induced muscle atrophy, and wish this will provide a new therapy to cure denervation-induced dysfunction of skeletal muscle.

2. Materials and Methods

2.1. Rat Muscle Cell Line and Cell Culture

Rat skeletal muscle L6 cells were obtained from ATCC and cultured in MEM supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES buffer, 2 mM L-Glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Upon reaching confluence,

*Corresponding author.

differentiation was induced by media containing 2% (v/v) fetal bovine serum for 7 days.

2.2. Total RNA Extraction and Real-Time Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA from cells or rat skeletal muscle was prepared using TRIzol, according to the manufacturer's instructions. Total RNA 1 μ g was reverse transcribed into cDNA in a 20 μ l reaction. Briefly, the RNA solution was incubated at 70°C for 5 min and then chilled on ice, following all samples were incubated at 37°C for 1 h in 20 μ l of 10 mM TRIS (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 units of ribonuclease inhibitor, 0.5 mM dNTP, 100 pmol of oligo-d(T) 18 and 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Promega Company, USA). The reaction was terminated by heating for 5 min at 95°C. Reverse transcribed products were used for quantitative real-time PCR amplification.

The primers used for SYBR Green real-time RT-PCR are as follows: MyoD, sense, 5'-GACGAAGTCTGGTTGTTGTC-3'; antisense, 5'-GCTAGGGACTGTGAGGAAAGGA-3'; β -actin, sense, 5'-GAAATCGTGCGTGACATTA-3'; antisense, 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAA-3'. These primers were purchased from Sangon company (Sangon, Shanghai, China). The reactions were set up with 10 μ l SYBR Green PCR Master Mix (Takara, Shuzo, Kyoto, Japan), 1.0 μ l 10 μ mol primer mixture, and 2 μ l cDNA template. Real time PCR conditions were as follows: 95°C for 15 seconds followed by 30 cycles of 54°C (MyoD) or 57°C (β -actin) for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. Water was used as a negative control. Relative gene expression was determined by the fluorescence intensity ratio of the target genes to β -actin.

2.3. Western Blot Analyses

All the muscle samples collected were lysed in lysis buffer (0.5% Nonidet P(NP)-40, 10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ethylene diamine tetra-acetic acid [EDTA], 1 mM Na₃VO₄ containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). Proteins were loaded on a 10% or 12% SDS-PAGE, followed they were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes and blocked in 5% non-fat milk in 10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% (w/v) Tween-20 for 2 hrs. Anti-human MyoD and β -actin rabbit polyclonal antibody were diluted at 1:1000 and incubated at 4°C overnight, followed by 1hr incubation with the appropriate secondary antibody. The blots were further developed using the chemiluminescence reagent.

2.4. Plasmid Construction and Transfection

The MyoD gene was amplified and the PCR product was

collected and purified, then was inserted into the EcoRI-BamHI site of pLVX to generate the pMyoD-LVX plasmid. The primers were designed as follows: sense, 5'-CCGGAATTCATGGAGCTACTATCGCCGCCAC-3', which including EcoR I restriction enzyme cutting site; antisense, 5'-CGCGGATCCTCAGAGCACCTGGTAAATCGGATTG-3', which including BamHI restriction enzyme cutting site. The integrity of the cDNA was confirmed by sequencing. 8 μ g pMyoD-LVX and 8 μ g empty vector were transfected into L6 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the instructions provided by the manufacturer.

2.5. Production of Lentiviral Particles

In order to prepare lentiviral particles expressing the MyoD gene, HEK-293T cells were transfected with pMyoD-LVX plus lentiviral packaging vectors. Briefly, the cells were seeded in a 6-well plate at a concentration of 1.0×10^6 cells per well. After 24 h, the culture medium was aspirated and replaced with Opti-MEM. Subsequently, 2 μ g pMyoD-LVX and the Mission Lentiviral Packaging Mix (Sigma) were transfected into cells by Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. On the following day, the culture was replaced with complete medium (DMEM with 10% FBS). After another 48 h, the culture supernatants containing the lentiviral particles were harvested for use.

2.6. Establishment of MyoD-Overexpressing L6 Cell Lines

The L6 cells were transduced with the Lenti-MyoD lentiviral particles. On the third day after transduction, puromycin (Sigma-Aldrich) was added into the culture medium to a final concentration of 2 μ g/ml. During the selection period, the drug was kept at the same concentration at each replacement of culture medium. Approximately 2 weeks was required for the live cells to be eliminated in the mock transduction group. After that, the selected cultures were expanded and cryopreserved. The MyoD mRNA was determined by real time PCR.

2.7. Animal Treatment

30 rats about 200 g/each were used to determine the effect of overexpression of MyoD on denervated rat skeletal muscle atrophy and dysfunction. To construct denervation model, 30 rats were cut tibial nerve after anesthesia. Four weeks latter, these rats were divided into 5 groups and four groups were injected in extensor digitorum longus at several differential places with the cells transfected with Lentivirus-MyoD-L6, Lentivirus-MyoD, Lentivirus-L6, and Lentivirus, respectively. Four weeks latter, the denervation group, Lentivirus-MyoD-L6 and

Lentivirus-MyoD groups were performed dialyneury, the wet weight of gastrocnemius and contraction forces were determined.

2.8. Statistical Analyses

The results of real time PCR, wet weight of gastrocnemius and contraction forces were analyzed with Student's test. A two-sided test with *P* values of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. MyoD Overexpressed in Stable-Transfected MyoD L6 Cells

To investigate the role MyoD on the function repair of skeletal muscle, the stable-transfected MyoD L6 cells were established by Lentivirus transduction. The real time PCR was performed to determine the relative expression of MyoD mRNA after transfection. As showed in **Figure 1**, the L6 cells stable-transfected MyoD showed significant increase MyoD mRNA, compared with the control cells.

3.2. Transfection of MyoD Induced MyoD Expression in Denervated Rats

The rats were performed the operation to cut the tibial nerve after anesthesia, 4 weeks later, stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), L6 cells (L6) and leti-empty vector particles (vector) were injected in the denervated skeletal muscles, respectively. The MyoD mRNA and protein were examined after another 4 weeks or 6 weeks, it was observed that mRNA potently increased in MyoD-L6 group (**Figures 2(a)** and **(b)**), however, similar expression pattern in protein level was not observed after injection for 4 weeks (**Figure 3(a)**). Consistent increase MyoD protein in MyoD-L6 group was observed after injection for 6 weeks (**Figure 3(b)**).

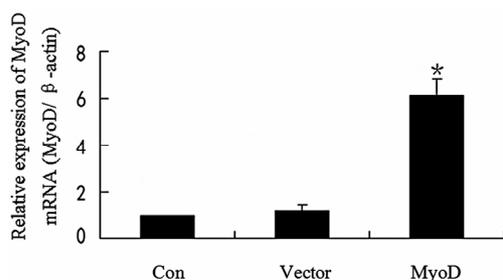


Figure 1. MyoD mRNA increase in stable-transfect MyoD L6 cells. Real time PCR was performed to examine MyoD mRNA expression in L6 cells, stable-transfect empty vector L6 cells and stable-transfect MyoD L6 cells, each experiment repeat three times. Beta action serves as a loading control.

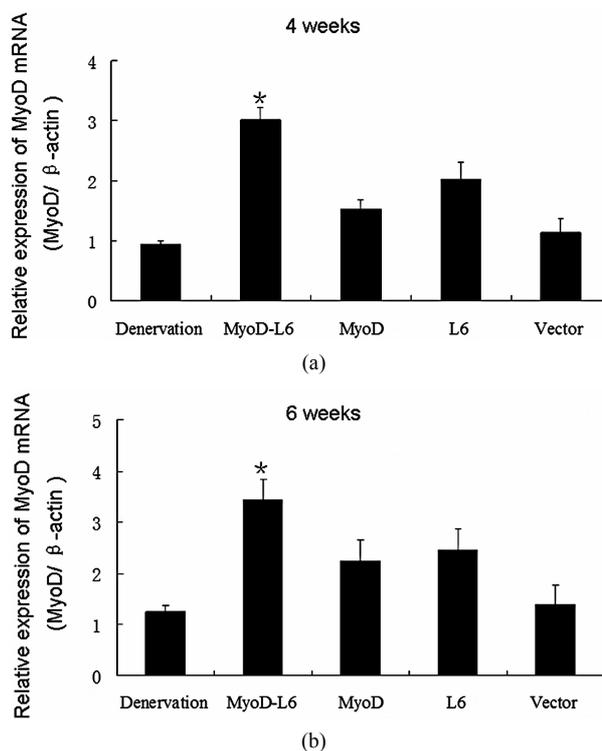


Figure 2. The MyoD mRNA expression in denervated rats gastrocnemius muscle. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), L6 cells (L6) and leti-empty vector particles (vector), respectively. MyoD mRNA were determined in 4 weeks or 6 weeks after injection by real time PCR, each experiment was repeat three times.

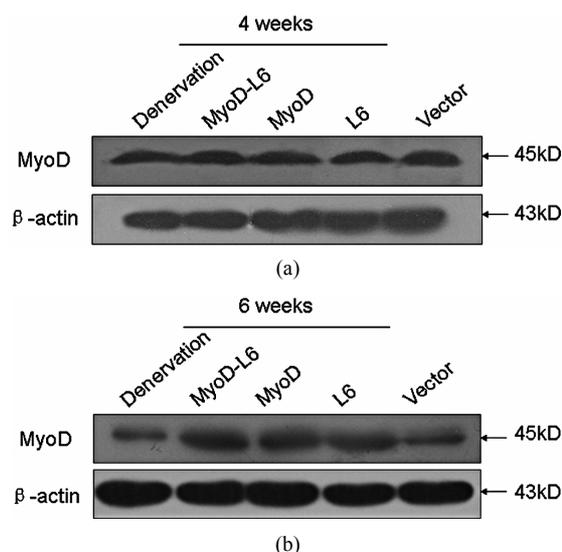


Figure 3. The MyoD protein expression in denervated rats gastrocnemius muscle. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), L6 cells (L6) and leti-empty vector particles (vector), respectively. MyoD mRNA were determined in 4 weeks or 6 weeks after injection by Western blot, each experiment was repeat three times.

3.3. Overexpression MyoD Attenuated Denervated Skeletal Muscle Atrophy

From the **Figure 4**, we can see that the wet weight of denervated skeletal muscle in MyoD-L6 group was more weight than other groups after performing denervation operation for 4 weeks or 6 weeks. The rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), L6 cells (L6) and leti-empty vector particles (vector) after denervation, respectively, after 4 weeks of injection, the weight of skeletal muscles were examined in different time. It was found that the wet weight of denervated skeletal muscle in MyoD-L6 group was more weight than other groups (**Figure 4**), which indicated that overexpressed MyoD retard denervated skeletal muscle atrophy. Meanwhile, after 4 weeks of nerve repair, we found that overexpression of MyoD significantly regarded the atrophy after nerve repair for 12 weeks (**Figure 7**).

3.4. Overexpression MyoD Attenuated Denervated Skeletal Muscle Dysfunction After Reconstruction of Nerve

To investigate the role of MyoD on function repair after reconstruction of nerve, the contraction forces were determined. As we observed that in **Figures 5, 6, 8, 9**, the

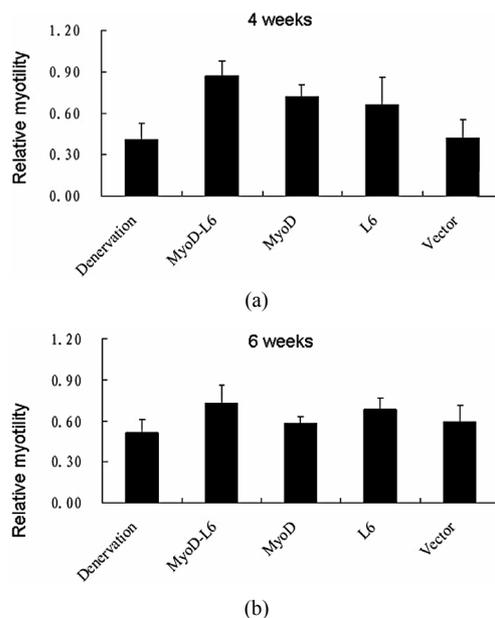


Figure 4. The single myotility of denervated rats gastrocnemius muscle. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), L6 cells (L6) and leti-empty vector particles (vector), respectively. The single motility was determined in 4 weeks or 6 weeks after injection, the relative single motility was shown as the single motility of the gastrocnemius muscle underwent denervation compared with that of gastrocnemius muscle not underwent denervation.

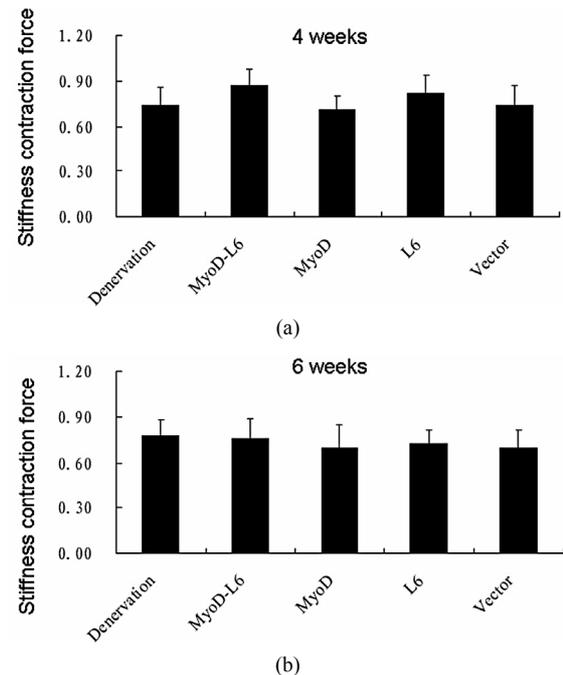


Figure 5. The max stiffness contraction force of denervated rats gastrocnemius muscle. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), L6 cells (L6) and leti-empty vector particles (vector), respectively. The max stiffness contraction force was determined in 4 weeks or 6 weeks after injection, the relative max stiffness contraction force was shown as the max stiffness contraction force of the gastrocnemius muscle underwent denervation compared with that of gastrocnemius muscle not underwent denervation.

single contraction forces and stiffness contraction force in MyoD-L6 group were stronger than other groups after reconstruction of nerve, which suggested that overexpression MyoD attenuate denervated skeletal muscle dysfunction after reconstruction of nerve.

4. Discussion

Effective nerve repair could recover denervated skeletal muscle function in some extent, commonly, skeletal muscle have already been fibrosis and lose its function before the nerve repair. Thus, retarding denervated skeletal muscle atrophy until the nerve repair is a feasible solution to cure the muscle hurt results from denervation. However, attenuating muscle atrophy is a challenge and detail mechanism remains to be clarified.

It was reported that skeletal muscle satellite cells are tissue-specific stem cells that are responsible for skeletal muscle growth and proliferation. In response to some injury, satellite cells re-enter the cell cycle, activate expression of muscle regulatory factors, such as MyoD and Myf-5, and execute the myogenic program, finally, restoring muscle structure and function [15-18]. Several

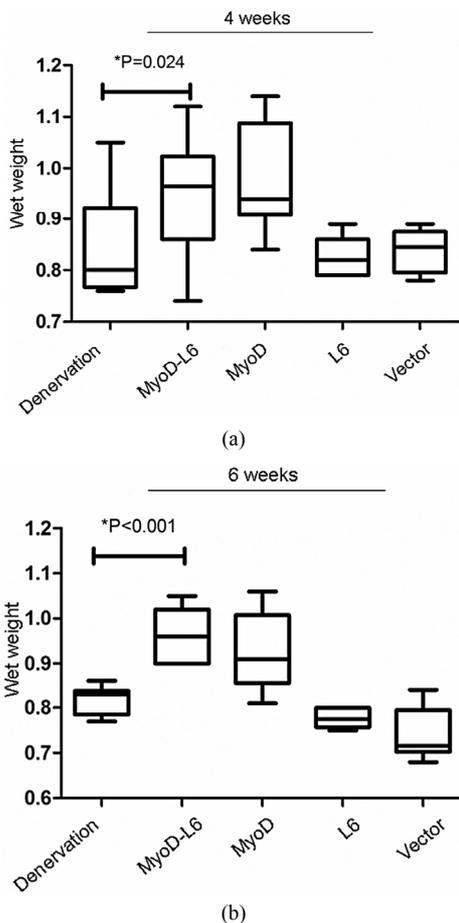


Figure 6. The wet weight of denervated rats gastrocnemius muscle. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), L6 cells (L6) and leti-empty vector particles (vector), respectively. The wet weight was determined in 4 weeks or 6 weeks after injection, the relative wet weight was shown as the wet weight of the gastrocnemius muscle underwent denervation compared with that of gastrocnemius muscle not underwent denervation.

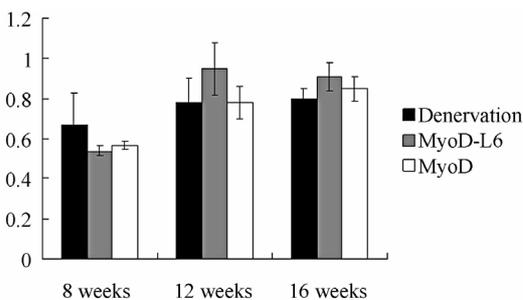


Figure 7. Overexpression of MyoD regards denervated rats gastrocnemius muscle’s atrophy after nerve repair. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), respectively. After transfection 4 weeks latter, the nerve was repaired, the wet weight of gastrocnemius muscle was examined in 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks after nerve repairing, respectively.

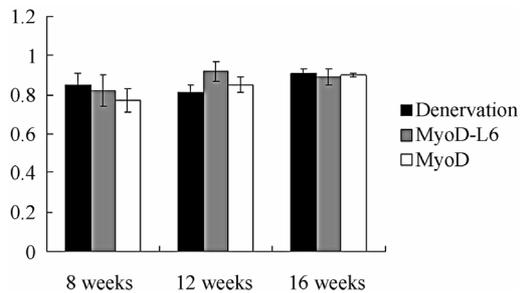


Figure 8. Overexpression of MyoD regards denervated rats gastrocnemius muscle’s loseness of single myotility after nerve repair. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), respectively. After transfection 4 weeks latter, the nerve was repaired, the single myotility of gastrocnemius muscle was examined in 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks after nerve repairing, respectively.

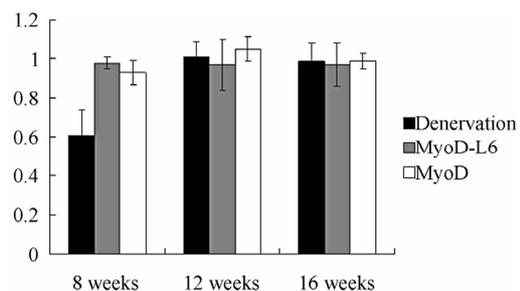


Figure 9. Overexpression of MyoD regards denervated rats gastrocnemius muscle’s loseness of max stiffness contraction force after nerve repair. The denervated rats were injected with stable-transfect MyoD L6 cells (MyoD-L6), Lenti-MyoD lentiviral particles (MyoD), respectively. After transfection 4 weeks latter, the nerve was repaired, the max stiffness contraction force of gastrocnemius muscle was examined in 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks after nerve repairing, respectively.

study indicated that skeletal muscle satellite cell increased and MyoD overexpressed at the early stage of nerve hurt [15,18-20], these evidence suggested that satellite cells could transform to adult skeletal muscle to protect the muscle from dysfunction.

In current study, we established a stable-transfect MyoD L6 cells, and investigated the role of MyoD on retarding skeletal muscle atrophy. Compared with the rats with denervation, the groups combinational denervation with MyoD L6 cells transfection, or the group combinational denervation with MyoD transfection, the expressions of MyoD mRNA and protein significantly increased after injecting these cells for 4 or 6 weeks. Most importantly, the wet weight of denervated skeletal muscle in these groups overexpressed MyoD was potently more weight than the single denervation group, which indicated that overexpressed MyoD retards denervated skeletal muscle atrophy. On the other hand, we investigated the contraction forces of these rats after nerve repair, that is to say

determine the denervated skeletal muscle function after reconstruct the never system. We found that the rats overexpressed MyoD have more strong contraction forces. Regeneration of adult skeletal muscle is an asynchronous process requiring the activation, proliferation and fusion of satellite cells, to form new muscle fibres. Previous study indicated that activated satellite cells, which express either Myf5 or MyoD, do not accumulate selectively on fast or slow muscle fibres. But the activated satellite cells with overexpressed MyoD may increase the cell number of adult skeletal muscle though it did not affect the muscle fibres form. It was also reported that Primary MyoD^{-/-} myogenic cells exhibited a stellate morphology distinct from the compact morphology of wild-type myoblasts, and expressed c-met, a receptor tyrosine kinase expressed in satellite cells. However, MyoD^{-/-} myogenic cells did not express desmin, an intermediate filament protein typically expressed in cultured myoblasts in vitro and myogenic precursor cells in vivo, which indicated that deficit of MyoD could form adult muscle. Base on our study and other research, we could safely to say that overexpressed MyoD facilitate denavated skeletal muscle function repair.

In summary, it was found that increase MyoD molecule could retard denervated rat skeletal muscle atrophy and dysfunction, which may provide a new therapy strategy for the patients who suffers skeletal muscle dysfunction resulted from denervation.

5. Acknowledgements and Interest Conflict

The work was supported by grant of Science and Technology Innovation Subject from Nanjing Military Region (No. 08MA035). We declare we have no any interest conflict.

REFERENCES

- [1] P. J. Plant, J. R. Bain, J. E. Correa, M. Woo and J. Batt, "Absence of Caspase-3 Protects Against Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy," *Journal of Applied Physiology*, Vol. 107, No. 1, 2009, pp. 224-234. [doi:10.1152/japplphysiol.90932.2008](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.90932.2008)
- [2] P. M. Siu and S. E. Always, "Response and Adaptation of Skeletal Muscle to Denervation Stress: The Role of Apoptosis in Muscle Loss," *Frontiers in Bioscience*, Vol. 14, 2009, pp. 432-452. [doi:10.2741/3253](https://doi.org/10.2741/3253)
- [3] B. C. Beehler, P. G. Sleph, L. Benmassaoud and G. J. Grover, "Reduction of Skeletal Muscle Atrophy by a Proteasome Inhibitor in a Rat Model of Denervation," *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, Vol. 231, No. 3, 2006, pp. 335-341.
- [4] F. L. Muller, W. Song, *et al.*, "Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy is Associated with Increased Mitochondrial ROS Production," *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Vol. 293, No. 3, 2007, pp. R1159-R1168. [doi:10.1152/ajpregu.00767.2006](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00767.2006)
- [5] S. L. Rowan, K. Rygiel, F. M. Purves-Smith, N. M. Solbak, D. M. Turnbull and R. T. Hepple, "Denervation Causes Fiber Atrophy and Myosin Heavy Chain Co-Expression in Senescent Skeletal Muscle," *PLoS One*, Vol. 7, No. 1, 2012, p. e29082. [doi:10.1371/journal.pone.0029082](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029082)
- [6] T. Shavlakadze, J. D. White, M. Davies, J. F. Hoh and M. D. Grounds, "Insulin-Like Growth Factor I Slows the Rate of Denervation Induced Skeletal Muscle Atrophy," *Neuromuscular Disorders*, Vol. 15, No. 2, 2005, pp. 139-146. [doi:10.1016/j.nmd.2004.10.013](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.10.013)
- [7] M. Ishido, K. Kami and M. Masuhara, "In Vivo Expression Patterns of MyoD, P21, and Rb Proteins In myonuclei and Satellite Cells of Denervated Rat Skeletal Muscle," *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, Vol. 287, No. 2, 2004, pp. C484-C493. [doi:10.1152/ajpcell.00080.2004](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00080.2004)
- [8] A. Buonanno, L. Apone, M. I. Morasso, R. Beers, H. R. Brenner and R. Eftimie, "The MyoD Family of Myogenic Factors is Regulated by Electrical Activity: Isolation and Characterization of a Mouse Myf-5 CDNA," *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, No. 3, 1992, pp. 539-544. [doi:10.1093/nar/20.3.539](https://doi.org/10.1093/nar/20.3.539)
- [9] J. P. Hyatt, R. R. Roy, K. M. Baldwin and V. R. Edgerton, "Nerve Activity-Independent Regulation of Skeletal Muscle Atrophy: Role of MyoD and Myogenin in Satellite Cells and Myonuclei," *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, Vol. 285, No. 5, 2003, pp. C1161-C1173.
- [10] K. Koishi, M. Zhang, I. S. McLennan and A. J. Harris, "MyoD Protein Accumulates in Satellite Cells and Is Neurally Regulated in Regenerating Myotubes and Skeletal Muscle Fibers," *Developmental Dynamics*, Vol. 202, No. 3, 1995, pp. 244-254. [doi:10.1002/aja.1002020304](https://doi.org/10.1002/aja.1002020304)
- [11] S. B. Charge, A. S. Brack, S. A. Bayol and S. M. Hughes, "MyoD- and Nerve-Dependent Maintenance of MyoD Expression in Mature Muscle Fibres Acts through the DRR/PRR Element," *BMC Developmental Biology*, Vol. 8, 2008, p. 5. [doi:10.1186/1471-213X-8-5](https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-5)
- [12] M. Ekmark, Z. A. Rana, G. Stewart, D. G. Hardie and K. Gundersen, "De-Phosphorylation of MyoD is Linking Nerve-Evoked Activity to Fast Myosin Heavy Chain Expression in Rodent Adult Skeletal Muscle," *The Journal of Physiology*, Vol. 584, Pt. 2, 2007, pp. 637-650. [doi:10.1113/jphysiol.2007.141457](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.141457)
- [13] K. Sakuma, K. Watanabe, M. Sano, I. Uramoto, K. Sakamoto and T. Totsuka, "The Adaptive Response of MyoD Family Proteins in Overloaded, Regenerating and Denervated Rat Muscles," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1428, No. 2-3, 1999, pp. 284-292. [doi:10.1016/S0304-4165\(99\)00086-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00086-0)
- [14] Z. Wu, H. Jin and Y. Gu, "The Effect of MyoD Family Proteins on Muscular Atrophy Induced by Brachial Plexus Injury in Rats," *Zhonghua Medicine Magazine*, Vol. 82, No. 8, 2002, pp. 561-563.
- [15] R. N. Cooper, S. Tajbakhsh, V. Mouly, G. Cossu, M. Buckingham and G. S. Butler-Browne, "In Vivo Satellite Cell Activation via Myf5 and MyoD in Regenerating

- Mouse Skeletal Muscle,” *Journal of Cell Science*, Vol. 112, Pt. 17, 1999, pp. 2895-2901.
- [16] M. Lindstrom, F. Pedrosa-Domellof and L. E. Thornell, “Satellite Cell Heterogeneity with Respect to Expression of MyoD, Myogenin, Dlk1 and C-Met in Human Skeletal Muscle: Application to a Cohort of Power Lifters and Sedentary Men,” *Histochemistry and Cell Biology*, Vol. 134, No. 4, 2010, pp. 371-385.
- [17] M. H. Mokalled, A. N. Johnson, E. E. Creemers and E. N. Olson, “MASTR Directs MyoD-Dependent Satellite Cell Differentiation during Skeletal Muscle Regeneration,” *Genes & Development*, Vol. 26, No. 2, 2012, pp. 190-202. [doi:10.1101/gad.179663.111](https://doi.org/10.1101/gad.179663.111)
- [18] P. Seale, J. Ishibashi, C. Holterman and M. A. Rudnicki, “Muscle Satellite Cell-Specific Genes Identified by Genetic Profiling of MyoD-Deficient Myogenic Cell,” *Developmental Biology*, Vol. 275, No. 2, 2004, pp. 287-300. [doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.034](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.034)
- [19] S. Creuzet, L. Lescaudron, Z. Li, J. Fontaine-Perus, “MyoD, Myogenin, and Desmin-Nls-lacZ Transgene Emphasize the Distinct Patterns of Satellite Cell Activation in Growth and Regeneration,” *Experimental Cell Research*, Vol. 243, No. 2, 1998, pp. 241-253. [doi:10.1006/excr.1998.4100](https://doi.org/10.1006/excr.1998.4100)
- [20] R. Macharia, A. Otto, P. Valasek and K. Patel, “Neuromuscular Junction Morphology, Fiber-Type Proportions, and Satellite-Cell Proliferation Rates are Altered in MyoD(-/-) Mice,” *Muscle & Nerve*, Vol. 42, No. 1, 2010, pp. 38-52. [doi:10.1002/mus.21637](https://doi.org/10.1002/mus.21637)