

Unidad Iztapalapa

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

**“Papel de la astrogliá en la alteración de la barrera
hematoencefálica durante la pérdida de sueño”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

M en C. Jessica Janeth Avilez Avilez

Matrícula: 2203802600
Orcid: 0000-0003-3008-2150
Correo: cbs2203802600@izt.uam.mx

DIRECTORAS DE TESIS:

Co-directora: Dra. Anahí Chavarría Krauser
Co-directora: Dra. Beatriz Gómez González
Asesora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

JURADO:

Presidenta: Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Secretaria: Dra. Mara Alaide Guzmán Ruiz
Vocal: Dra. Adriana Alarcón Aguilar
Vocal: Dra. Hilda Martínez Coria
Vocal: Dra. Verónica Salas Venegas

Iztapalapa, Ciudad de México a 8 de octubre del 2025

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del SECIHTI (ANTES CONACYT), registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, ahora SECIHTI) para realizar estudios de posgrado (Número de registro de la beca **790160**).

Este trabajo de investigación doctoral fue realizado en el “Laboratorio de Neuropsicobiología” en el Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Parte de este trabajo se realizó en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el laboratorio de Neuroinmunología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental “Dr. Ruy Pérez Tamayo” de la Facultad de Medicina de la UNAM y en el “Laboratorio de sensorial II” del Departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina de la UNAM.

COMITÉ TUTORAL

Co-directora: Dra. Beatriz Gómez González

Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, DCBS

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa

Co-directora: Dra. Anahí Chavarría Krauser

Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Medicina Experimental “Dr. Ruy Pérez Tamayo”,

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesora:

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe **Jessica Janeth Avilez Avilez** con número de matrícula **2203802600** alumna del Doctorado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Papel de la astroglía en la alteración de la barrera hematoencefálica durante la pérdida de sueño”**.

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México en 25 de agosto de 2025.

Atentamente



M en C. Jessica Janeth Avilez Avilez

DECLARACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD

La que suscribe **Jessica Janeth Avilez Avilez** con número de matrícula **2203802600**, alumna del Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“Papel de la astroglía en la alteración de la barrera hematoencefálica durante la pérdida de sueño”** desarrollado en la Universidad Autónoma Metropolitana, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

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

Atentamente



M en C. Jessica Janeth Avilez Avilez

AGRADECIMIENTOS (Financiamiento)

Parte de este trabajo fue financiado por los proyectos:

Facultad de Medicina, UNAM, Dirección General de Personal Académico-PAPIIT (IN214821 and IN224624), UNAM, CONAHCYT Ciencia de Frontera 2019 (1783), and FORDECYT-PRONACES/263957

Ciencia Básica y de Frontera 2023-2024 CBF2023-2024-870

UNAM-PAPIIT: IA205523

Dedico este trabajo a mi familia.

Agradezco intensamente a mis padres, a mis hermanos y a mis sobrinas quienes fueron mi inspiración en cada paso de este camino, por su apoyo incondicional, su paciencia, y por recordarme mi valor en los momentos más vulnerables. Su amor inquebrantable y su fe en mí me ayudaron a levantarme cuando más lo necesitaba. Ustedes me sostuvieron y me dieron la fuerza necesaria para continuar y concluir este camino.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que, de distintas maneras, hicieron posible la culminación de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Beatriz Gómez González, por haberme acompañado en los diferentes niveles de mi formación académica y por brindarme la posibilidad de trabajar en la línea de investigación sobre la barrera hematoencefálica y el sueño, un tema que me apasiona y ha sido central en mi desarrollo científico. Las distintas experiencias vividas a lo largo de este proceso me ayudaron también a desarrollar mayor independencia y resiliencia, tanto en la investigación como en el ámbito personal.

A la Dra. Anahí Chavarría Krauser, miembro de mi comité tutorial, quien además de financiar gran parte del proyecto, le agradezco por su apoyo constante y generoso, que hizo posible la realización de gran parte de los experimentos. Su orientación académica y acompañamiento fueron fundamentales para que pudiera escribir, enviar y publicar el artículo derivado de esta investigación.

Quiero agradecer a la Dra. Mina Königsberg por sus valiosos comentarios y sugerencias, sobre todo su experiencia en la parte de la senescencia. Su programa de mentorías para mujeres en STEM hizo posible que pudiera concluir el doctorado. Admiro profundamente su compromiso y dedicación, que han sido una verdadera inspiración a lo largo de este proceso.

A la Dra. Mara A. Guzmán Ruiz, por poner a mi alcance los recursos de su laboratorio. Su generosidad, acompañamiento y confianza fueron esenciales para culminar este proyecto. Me siento profundamente agradecida por su respaldo y la oportunidad de aprender de su compromiso y dedicación científica.

Agradezco al Dr. Luis E. Gómez Quiroz por su disposición en facilitar algunos recursos para parte de la fase final de este proyecto.

Durante este tiempo también atravesé momentos personales difíciles que pusieron a prueba mi perseverancia y motivación. Mis amigos y familia fueron claves en este proceso, es por ello que quiero agradecerles...

Enrique Aviles, hemos compartido muchas experiencias dentro y fuera del laboratorio. Has sido un verdadero amigo y un compañero invaluable, con quien es fácil trabajar y compartir opiniones constructivas. Aprecio mucho tu apoyo y consejos sabios, y valoro muchísimo tu amistad.

Ana, me permitiste participar en tu formación académica y compartir experiencias de aprendizaje. Tu inteligencia, dedicación y mirada crítica me inspiraron y me permitieron crecer como persona y también como profesional. Gracias por tu confianza y por la fortuna de aprender junto a ti.

A mis amigas Maydelin, Citlali e Itzel, gracias por su compañía, apoyo emocional y motivación constante durante estos años, por las risas, e infinidad de momentos compartidos.

Fernanda Medina, por todos esos años en los que compartimos experiencias, risas, viajes y muchas aventuras. Aprendí mucho de ti y de tus consejos. Gracias por tu amistad.

Alejandro Escobedo, a quien amo y admiro profundamente. Iniciamos juntos este camino y quiero agradecerte por ser mi amigo, compañero. Tu apoyo constante en los momentos más difíciles ha sido invaluable; tu compañía y consejos han sido un pilar fundamental para mí. Gracias por tu confianza, paciencia y amor; he aprendido y crecido mucho a tu lado.

PAPEL DE LA ASTROGLIA EN LA ALTERACIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA DURANTE LA PÉRDIDA DE SUEÑO

RESUMEN

La restricción de sueño promueve un estado inflamatorio de bajo grado en el sistema nervioso central (SNC), que ha sido asociado con la reactividad astrogliar y la disfunción de la barrera hematoencefálica (BHE) y la disminución de las proteínas de uniones ocluyentes. En sujetos envejecidos se observó que la privación de sueño incrementó moléculas relacionadas con el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) a nivel sistémico, sugiriendo incremento en células senescentes. En este trabajo se evaluó el impacto que tiene la restricción de sueño sobre la senescencia celular en el SNC a lo largo de 10 días de restricción de sueño, en un modelo murino joven. Observamos incremento progresivo de la permeabilidad de la BHE, acompañado de GFAP y la proteína C3 del complemento, en contraste con la reducción en la proteína S100a10, marcador de la respuesta neuroprotectora. Adicionalmente, se observó un incremento progresivo citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , así como en los marcadores de senescencia celular la enzima β -galactosidasa y la proteína p21 en corteza e hipocampo. Los hallazgos sugieren que la restricción de sueño promueve senescencia celular en el sistema nervioso central, derivado de la neuroinflamación y de la pérdida de la función de la BHE.

Palabras clave: Barrera hematoencefálica, restricción de sueño, neuroinflamación, senescencia.

ASTROGLIA ROLE IN THE BLOOD-BRAIN BARRIER DYSFUNCTION DURING CHRONIC SLEEP LOSS

Abstract

Sleep loss promotes low-grade inflammation in the central nervous system (CNS), which has been associated with glial reactivity and blood-brain barrier (BBB) dysfunction, characterized by increased permeability, loss of tight junction proteins, and a decrease in endothelial-pericyte contact. Additionally, studies conducted on aged subjects have shown that sleep deprivation increases systemic molecules related to the senescence-associated secretory phenotype (SASP), suggesting an increase in senescent cells. Here we evaluated the impact of sleep restriction on cellular senescence in the CNS, neuroinflammation, and BBB dysfunction in male C57BL/6 mice (8-10 weeks old). We observed a progressive increase in BBB permeability after 3, 5, or 10 days of sleep restriction, accompanied by an increase in glial fibrillary acidic protein (GFAP) and C3 complement component. However, a reduction in the neuroprotective molecule the S100a10 protein, was observed. Furthermore, we showed a progressive increase in the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α levels in the CNS, as well as the senescence markers β -galactosidase and p21. The findings suggest that sleep restriction promotes cellular senescence in the central nervous system, driven by astrocyte reactivity, neuroinflammation and the loss of BBB function.

Key words: Blood-brain barrier, sleep restriction, neuroinflammation, senescence.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sueño	2
1.1.1 Fisiología del sueño	2
1.1.2 Funciones reguladas por el sueño	5
1.1.3 Pérdida de sueño	6
1.1.4 Métodos experimentales de pérdida de sueño en modelos animales	7
1.2 Barrera hematoencefálica	7
1.3 Senescencia	14
1.4 Neuroinflamación	15
2. ANTECEDENTES	19
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
5. RELEVANCIA DEL ESTUDIO	21
6. HIPÓTESIS	22
7. OBJETIVOS	22
7.1 General	22
7.2 Particulares	22
8. MATERIAL Y MÉTODO	24
8.1 Animales	24
8.2 Grupos experimentales	25
8.3 Modelo de restricción de sueño	25
8.4 Evaluación de la permeabilidad de la BHE	26
8.5 Western Blot	27
8.6 Ensayo de inmuno-adsorción ligado a enzima (ELISA)	28
8.7 Obtención de cortes histológicos	29
8.8 Inmunofluorescencia en cortes cerebrales	29

8.9 Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal).....	30
8.10 Análisis estadístico.....	31
9. RESULTADOS	32
9.1 La restricción de sueño induce pérdida progresiva de la función de la BHE.....	32
9.2 La restricción crónica de sueño induce reactividad astrogliar.....	35
9.3 La restricción crónica de sueño modifica el perfil de citocinas de manera diferencial en hipocampo y corteza cerebral.....	42
9.4 La restricción crónica de sueño induce senescencia celular en el sistema nervioso central de animales jóvenes.....	45
10. DISCUSIÓN	48
11. CONCLUSIÓN	59
12. PERSPECTIVAS	60
13. REFERENCIAS	61
14. ANEXO (PRODUCTOS)	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Arquitectura del sueño en humanos y roedores.....	3
Fig. 2 Estructura y función de la barrera hematoencefálica.....	9
Fig. 3 Regulación astrogial de la barrera hematoencefálica.....	11
Fig. 4 Modelo modificado de plataforma múltiple (MMPM).....	24
Fig. 5 La restricción crónica de sueño induce incremento de permeabilidad de la BHE.....	33
Fig. 6 La restricción de sueño induce cambios en la estructura de la BHE.....	34
Fig. 7 La restricción crónica de sueño induce cambios tempranos en la reactividad glial.....	36
Fig. 8 La restricción crónica de sueño induce incremento del marcador de astrogía neurotóxica.....	37
Fig. 9 Evaluación de la proteína C3 del complemento en la región CA1 del hipocampo, en el grupo SR10.....	39
Fig. 10 Evaluación de la proteína C3 del complemento en la región CA3 del hipocampo, en el grupo SR10.....	40
Fig. 11 Evaluación de la proteína C3 del complemento en la corteza cerebral, en el grupo SR10.....	41
Fig. 12 La restricción de sueño modifica citocinas proinflamatorias de forma diferencial.....	43
Fig. 13 La restricción de sueño modifica citocinas antiinflamatorias de forma diferencial.....	44
Fig. 14 La restricción crónica de sueño induce senescencia celular en el sistema nervioso central.....	46
Fig. 15 Ensayos de la actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) después de 10 días de restricción crónica de sueño.....	47
Fig. 16 Alteraciones en el sistema nervioso central derivadas de la restricción crónica de sueño.....	60

1. INTRODUCCIÓN

El sueño es un proceso fisiológico fundamental caracterizado por la disminución del estado de conciencia del individuo. Cumple con un ritmo circadiano, presentándose con una periodicidad de 24 h (Okechukwu, 2022).

Durante el sueño, se llevan a cabo diversos procesos celulares en todo el organismo, lo que permite mantener una adecuada regulación de procesos metabólicos, endocrinos, inmunológicos, etc. (Krueger et al., 2016). En el caso del SNC, se ha descrito que el sueño es clave en la regulación de procesos de aprendizaje, consolidación de memoria, remoción de debris celulares, entre otras funciones (Krueger et al., 2016; Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2020), por lo que es un proceso esencial e irremplazable para el mantenimiento de la homeostasis cerebral.

El requerimiento de sueño diario depende de la edad del individuo, siendo mayor el requerimiento a edades más tempranas. En el caso de los adultos, se recomienda un periodo de sueño continuo de 7-8 h (Chaput et al., 2020). Sin embargo, el ritmo de vida actual y el incremento en el uso de dispositivos electrónicos durante la noche han contribuido a modificar los patrones de sueño, disminuyendo la calidad y cantidad de sueño diario, lo cual, es considerado como un problema de salud pública (Chattu et al., 2018; Christensen et al., 2016; Leger et al., 2024; Zhong et al., 2025).

La pérdida de sueño puede impactar de forma negativa diferentes procesos en el organismo. Uno de los efectos a nivel de SNC, es la pérdida de la función de la BHE

(Medina-Flores et al., 2022). Además, la pérdida de sueño puede promover, neuroinflamación, e incrementar otras respuestas celulares como la senescencia celular (Irwin & Vitiello, 2019), lo cual exacerba la neuroinflamación y podría ser una de las piezas clave entre la pérdida de sueño y las enfermedades neurodegenerativas, por lo que es importante realizar más estudios en este ámbito.

1.1 Sueño

1.1.1 Fisiología del sueño

Aunque las características fisiológicas del sueño pueden variar entre las especies, tanto en humanos como en roedores, el sueño fisiológico se compone de diferentes etapas que se identifican mediante el estudio de polisomnografía en el cual se evalúa la actividad eléctrica cerebral (particularmente de la corteza cerebral) mediante un electroencefalograma (EEG); la actividad eléctrica muscular evaluada mediante electromiograma (EMG) y la actividad eléctrica ocular conocido como electrooculograma (EOG) (Erlacher, 2024; McKenna et al., 2017). Estas etapas pueden agruparse en dos: el sueño de ondas lentas o NMOR (no-Movimientos Oculares Rápidos) y la fase de sueño MOR. En los humanos, la fase de sueño NMOR a su vez se compone de las fases: N1, N2 y N3.

La fase de sueño N1 es la transición entre la vigilia y el sueño. En esta primera fase del ciclo de sueño se prepara al cuerpo para el periodo de descanso y es la de menor duración, con un 3-8% del tiempo total de sueño. Se presenta como una transición en las ondas registradas en el EEG, pasando de ondas alfa (8–13 Hz), a ondas theta (4-

8 Hz) (Chokroverty, 2017). Las ondas theta predominan en la fase N2 en donde, además, se presentan otro tipo de frecuencias conocidas como husos de sueño y complejos K. La fase N2 tiene una duración de entre 30-60 minutos. Esta etapa se asocia con procesos de consolidación de la memoria (Carskadon & Dement, 2017; Chokroverty, 2017). La fase N3 presenta ondas de tipo delta (0.5-4 Hz), también

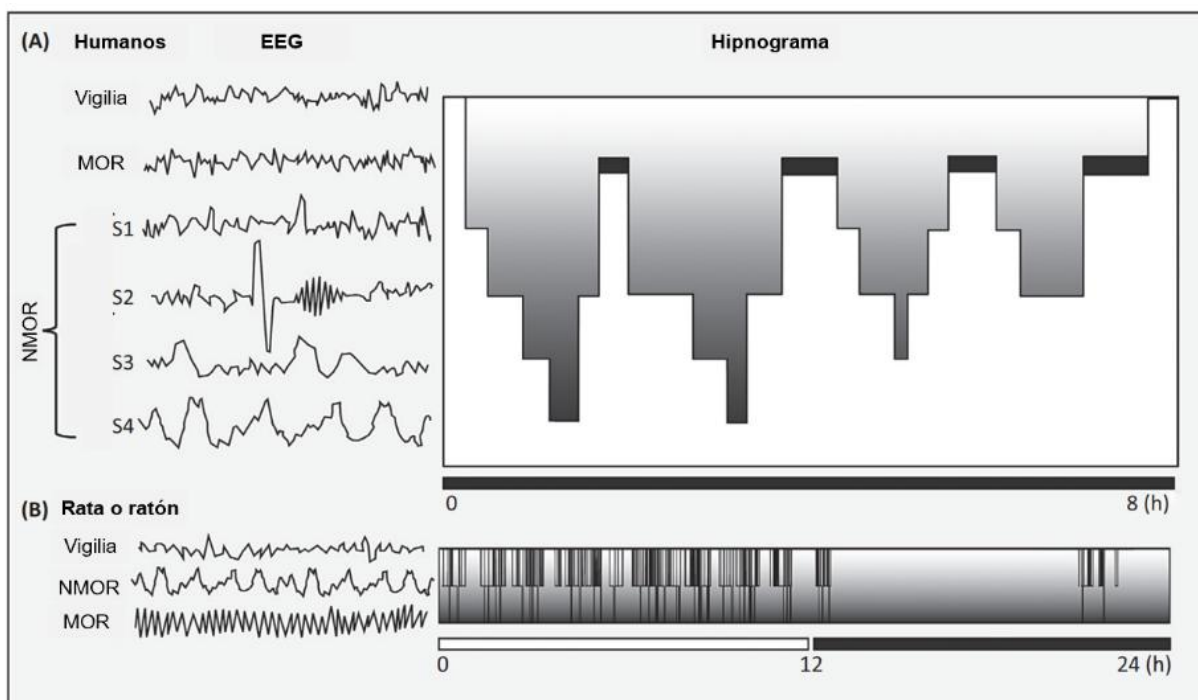


Fig. 1 | Arquitectura del sueño en humanos y roedores. El periodo de sueño en humanos (B) incluye la transición por cada una de las fases del sueño no-MOR (1-4) y el sueño MOR. A medida que transcurren los ciclos de sueño, el tiempo de sueño MOR incrementa, mientras que el tiempo transcurrido en sueño no-MOR disminuye. En los roedores (B) el únicamente se subdivide en fase NMOR y MOR, presentándose con múltiples fases a lo largo del día. Imagen modificada de Genzel et al. (2014).

conocidas como ondas lentas, por lo que la fase de sueño NMOR también se conoce como sueño de ondas lentas. Esta es una etapa muy importante, ya que durante esta fase se lleva a cabo el aclaramiento intersticial en el cerebro, mediante el sistema glinfático (Reddy & van der Werf, 2020). Algunos autores incluyen una cuarta fase de sueño, la N4, que es la transición entre el sueño NMOR y el sueño MOR (Chokroverty, 2017).

Finalmente se presenta la fase de sueño MOR, en donde la actividad eléctrica cerebral tiene un comportamiento similar al que se presenta en la fase de vigilia, por lo cual también se conoce como sueño paradójico. En esta etapa se presentan ondas alfa y teta, así como movimientos oculares rápidos, lo cual le da nombre a esta fase de sueño. Otra característica importante es la pérdida del tono o atonía musculares, que se refiere a la disminución o pérdida del movimiento voluntario de los músculos. Es en este periodo donde se presentan la mayor cantidad de ensoñaciones, por lo que se ha propuesto que la atonía muscular tiene como función evitar el actuar los sueños (Chokroverty, 2017; Siegel, 2023). En condiciones fisiológicas, los humanos presentan alrededor de 5 ciclos de sueño diariamente de forma continua, en donde cada ciclo de sueño tiene una duración aproximada de 90 minutos. (Erlacher, 2024).

En la actualidad, los estudios realizados para comprender la fisiología del sueño se han apoyado en modelos animales, principalmente en el estudio del sueño de los roedores, debido a la similitud con la regulación del sueño en humanos, en términos de fases de sueño, regulación circadiana (que también se regula con el ciclo de luz-

oscuridad) y respuestas al estrés (McKillop & Vyazovskiy, 2020). En los modelos murinos el sueño se presenta de forma polifásica o discontinua, es decir, se presenta en varios ciclos de sueño alternados con fases de vigilia a lo largo del día, predominantemente en la fase de luz (Fig. 1). Durante el periodo de oscuridad, los roedores presentan conductas más activas, aunque también pueden presentar periodos de sueño (Bakeche et al., 2021).

1.1.2 Funciones reguladas por el sueño

El sueño es un proceso fundamental en la regulación de diversas funciones en el organismo (Krueger et al., 2016), por ejemplo, en el proceso de aprendizaje y memoria. Durante el sueño se consolida la memoria (Raven et al., 2019), por medio de procesos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo y la poda sináptica, proceso que contribuye con la eliminación de algunas conexiones, optimizando las redes neurales y en el cual participan activamente los astrocitos (Bellesi et al., 2017). Otro proceso que se presenta particularmente durante el sueño de ondas lentas, es la remoción de metabolitos y desechos celulares, que se realiza a través del sistema glinfático. Dicho sistema permite el flujo controlado del líquido cefalorraquídeo (LCR) desde el espacio para-arterial hacia el espacio para-venoso, impulsado por la acuaporina-4 (AQP4), localizada en los pies perivasculares de los astrocitos, con la finalidad de eliminar los residuos tóxicos generados en el cerebro durante la vigilia (Vasciaveo et al., 2023), como la proteína β -amiloide (Holth et al., 2019; Jessen et al.,

2015). Gran parte de la información sobre los procesos regulados durante el sueño se conocen debido a las alteraciones descritas en ausencia de este proceso.

1.1.3 Pérdida de sueño

El requerimiento diario de sueño es distinto en todos los individuos, ya que depende de factores como la edad y el sexo, teniendo en cuenta que con menor edad es mayor el requerimiento de sueño diario. Es decir, durante la infancia se requiere alrededor de 18 h diarias de sueño en comparación a la adultez, donde la recomendación de sueño diaria es de 7-8 h continuas (Hirshkowitz et al., 2015). Sin embargo, actualmente la calidad y cantidad de sueño se ha visto afectado por diversos factores que incluyen el ritmo de vida acelerado, las condiciones ambientales, así como el acceso a dispositivos electrónicos en horarios inadecuados, considerándose así un problema de salud pública (Chattu et al., 2018; Lim et al., 2023).

La pérdida de sueño puede presentarse como privación, fragmentación o restricción de sueño. La privación de sueño hace referencia a la remoción total de sueño; la fragmentación de sueño se refiere a periodos de vigilia alternados con periodos de sueño, es decir, la interrupción o interrupciones del sueño; la restricción de sueño puede hacer referencia a la disminución continua del tiempo total de sueño (Reynolds & Banks, 2010). La pérdida de sueño trae consigo diversas consecuencias fisiológicas, por ejemplo, inflamación de bajo grado (Engert & Besedovsky, 2025; Hurtado-Alvarado et al., 2016).

1.1.4 Métodos experimentales de pérdida de sueño en modelos animales

Algunas de las técnicas utilizadas para alterar el sueño en modelos murinos para su estudio son la pérdida de sueño mediada por rotor, la pérdida de sueño mediado por ambiente enriquecido, o estimulación gentil (“gentle handling”, que consiste en despertar de forma manual al animal en el momento en el que se detecta que entra la fase de sueño) y el método de plataforma múltiple (Colavito et al., 2013; Egebjerg et al., 2025; Gómez-González et al., 2013). El método empleado dependerá de la fase o fases de sueño que se busque alterar, así como del tiempo diario que se desee restringir, por ejemplo, el método de plataforma múltiple reduce prácticamente por completo el sueño MOR, aunque no elimina el sueño de ondas lentas (Gómez-González et al., 2013; Y. Zhao et al., 2025).

1.2 Barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE se localiza a nivel de los capilares sanguíneos del SNC y consiste en una monocapa de células endoteliales que estructuran y fungen como limitantes entre el parénquima cerebral y el flujo sanguíneo. Esta estructura se compone, además de las células endoteliales, por pericitos, que son células de tipo muscular que, entre otras cosas, contribuyen con la regulación del flujo sanguíneo; por una lámina basal y por astrocitos, los cuales rodean el capilar sanguíneo hasta en un 90%, suministrando moléculas necesarias para que el endotelio pueda mantener su fenotipo de barrera (Abbott et al., 2006; Kim et al., 2025).

Células endoteliales. Las células endoteliales adquieren características particulares que le confieren la capacidad de actuar como barrera, lo cual incluye una alta selectividad. Entre las características propias de barrera se encuentran altos niveles de proteínas que forman uniones estrechas como ocludinas y claudinas, principalmente la claudina 3 y la 5 (en comparación con tejidos periféricos), las cuales se anclan al citoesqueleto mediante proteínas como la zónula ocludens (ZO) favoreciendo una localización adecuada en la célula y regulando el flujo paracelular (Hashimoto & Campbell, 2020). Otra de las características es que poseen un bajo nivel de vesículas pinocíticas, así como bajos niveles de proteínas de adhesión celular en el lumen del vaso sanguíneo, lo cual regula el transporte transcelular, es decir, a través de la célula endotelial, limitando otra de las vías de acceso al parénquima cerebral. Además, estas células tienen flujo de salida o proteínas de unión a fármacos, entre los que se encuentra la glicoproteína-P (Y. Zhao et al., 2022). En conjunto, todas estas características permiten una alta selectividad y baja permeabilidad por parte de las células endoteliales.

Existen diversas vías por las que se presenta el intercambio molecular entre el flujo sanguíneo y el cerebro. Éstas pueden ser por la vía paracelular, es decir, entre una célula endotelial y otra, por lo que las uniones intercelulares son fundamentales en la regulación de este tipo de transporte. Por otro lado, está el transporte por la vía transcelular, es decir, a través de la célula endotelial que incluye los siguientes tipos

de transporte: difusión, transcitosis mediada por transportador, transcitosis adsorptiva, entre otros (D. Wu et al., 2023).

Las células endoteliales cerebrales que forman parte de la BHE se encuentran altamente especializadas y adaptadas para regular estrictamente el intercambio molecular. Esta especialización es adquirida a través del contacto que mantienen con pericitos y astrocitos, mediante la secreción de , diversos factores que inducen tanto

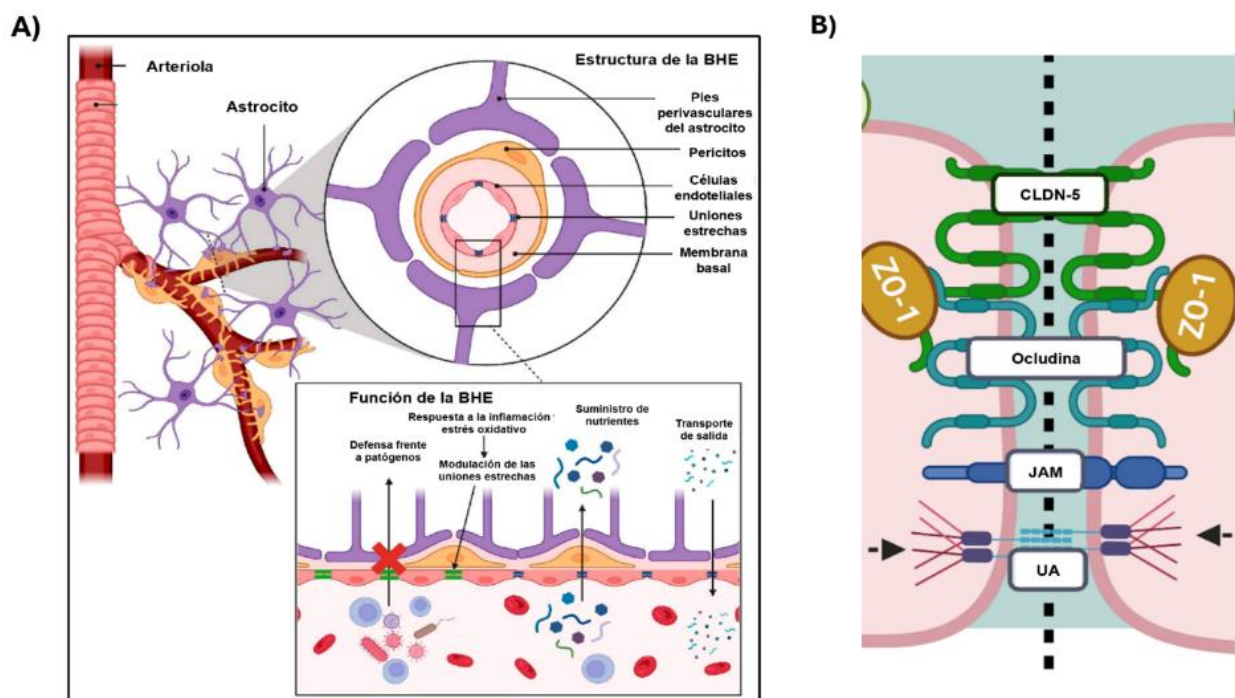


Fig. 2 | Estructura y función de la barrera hematoencefálica. La BHE se compone por diferentes tipos celulares que incluyen las células endoteliales, astrocitos, pericitos y una lámina basal (A, Kim et al., 2025). Las células endoteliales están presentan proteínas de uniones intercelulares conocidas como uniones ocluyentes, e incluyen a las proteínas claudina-5, ocludina, y zónula ocludens (B).

la angiogénesis, como la especialización paulatina de estas células (Langen et al., 2019).

Pericitos. Los pericitos son células de tipo muscular que se encuentran en contacto con las células endoteliales. Dentro de sus funciones destaca la regulación de la contracción del capilar sanguíneo y por lo tanto tienen una participación activa en la regulación del flujo sanguíneo en el SNC, respondiendo a señales del parénquima cerebral como las mediadas por noradrenalina y glutamato (Hall et al., 2014). Los pericitos se encuentran anclados a la célula endotelial por la asociación entre las proteínas PDGFR β -PDGF β . Esta interacción regula la señalización que conserva la estabilidad y el fenotipo de proteínas de uniones estrechas y, en consecuencia, mantiene el fenotipo de barrera (Z. Zhao et al., 2015). En modelos animales, en los que los niveles de pericitos se encuentran disminuidos, por ejemplo durante el envejecimiento, se observan modificaciones que afectan la regulación y función de la BHE (Yuan et al., 2023). En condiciones neuroinflamatorias, como las reportadas en las restricción crónica de sueño, se ha descrito desprendimiento o separación entre los vasos sanguíneos y los pericitos, debido a la pérdida y/o disminución de PDGFR β -PDGF β así como de conexinas, por lo cual se consideran células fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de la BHE (Medina-Flores et al., 2020, 2023).

Astrocitos. Los astrocitos son las células más abundantes del SNC. Cuando se descubrieron, la función que se les atribuyó fue la de dar soporte de las neuronas, actuando como un “pegamento” en el SNC (Fan & Agid, 2018). Sin embargo, actualmente se ha descrito que desempeñan diversas funciones, entre las que se encuentran la participación en la sinapsis tripartita, el suministro energético de lactato a las neuronas, el balance de medio extracelular, la regulación del sueño, así como su

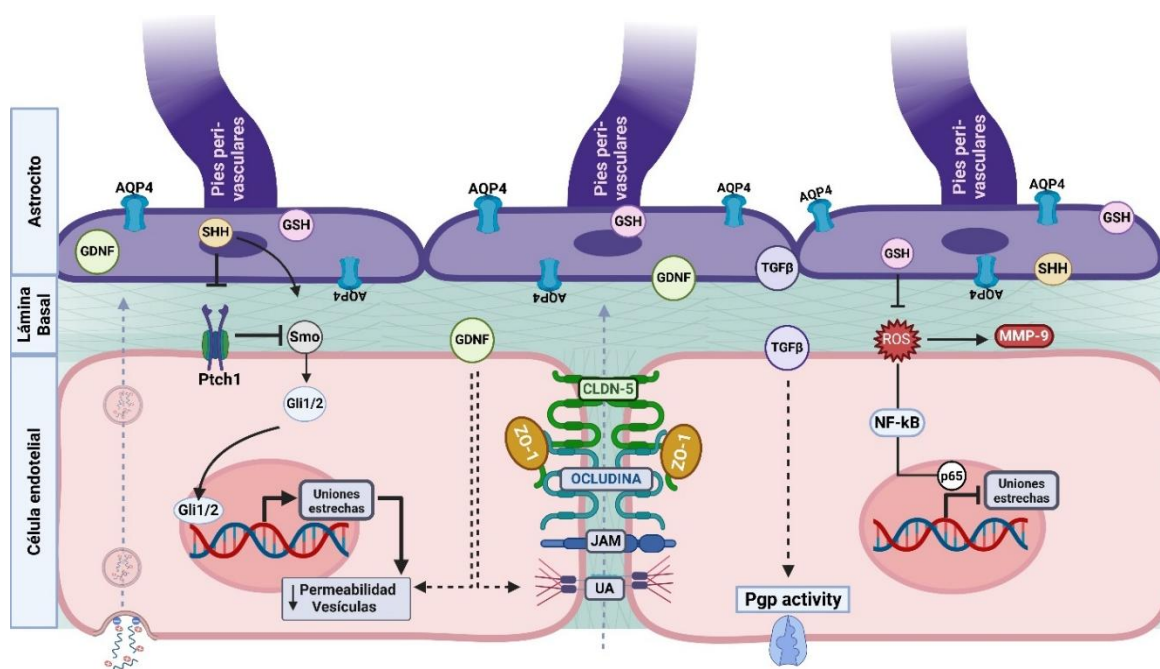


Fig. 3 | Regulación astroglial de la barrera hematoencefálica. Los astrocitos secretan diversos factores como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), la proteína Sonic Hedgehog (SHH) o glutatión (GSH), los cuales promueven la estabilidad de las proteínas de unión estrecha, el adecuado funcionamiento de proteína de eflujo como la glicoproteína-P (P-gp) y la baja permeabilidad. Además, mantienen la homeostasis oxidante e inflamatoria. En conjunto, la célula endotelial adquiere y mantiene el fenotipo de barrera y por lo tanto el correcto funcionamiento.

participación activa en el sistema glinfático (Abbott et al., 2006; Han et al., 2021; Yu et al., 2020).

En la regulación del sueño, los astrocitos participan mediante la secreción de moléculas somnogénicas, incluyendo a la adenosina, de la cual son los principales productores (Schmitt et al., 2012). La adenosina es una molécula que se acumula a lo largo del periodo de vigilia, induciendo un estado de somnolencia, mientras que durante el sueño disminuyen sus niveles (Schmitt et al., 2012).

Durante el sueño se activa el sistema glinfático que elimina desechos celulares, metabolitos y productos tóxicos generados a lo largo del periodo de vigilia. En este proceso, los pies perivasculares de los astrocitos ayudan a la difusión del LCR a través la AQP4, permitiendo el arrastre de todos los desechos celulares, como el lactato, el glutamato, el péptido β -amiloide o la proteína TAU, contenidos en el parénquima cerebral, desde el espacio para-vascular arterial hacia el espacio para-venoso permitiendo su remoción (Abbott et al., 2006; Avilez-Avilez et al., 2024; Han et al., 2021; Reddy & van der Werf, 2020; Yu et al., 2020).

Los astrocitos contribuyen con desarrollo y mantenimiento de la BHE (**Fig. 3**) secretando factores que promueven el fenotipo de barrera como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), la angiopoyetina (Ang-1,-2,-3 y -4), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), la apolipoproteína E (ApoE) y la proteína Sonic Hedgehog (SHH) (Álvarez et al., 2011). El contenido de estos factores puede variar dependiendo de la etapa de desarrollo y promueve la

diferenciación de las células endoteliales, así como transcripción de genes que contribuyen al mantenimiento de niveles elevados de proteínas de uniones estrechas, propiciando así una baja permeabilidad (Cabezas et al., 2014; Michinaga & Koyama, 2019). Adicionalmente pueden secretar factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF, Glial-derived Neurotrophic Factor, por sus siglas en inglés) y moléculas antioxidantes como glutatión (GSH) y ascorbato, por lo que los niveles de estresores se mantienen regulados, propiciando el correcto funcionamiento de la BHE (Manu et al., 2023; Cabezas et al., 2014).

El marcador de astrocitos más ampliamente utilizado es la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) que forma parte del citoesqueleto, aunque también se ha utilizado S100 β y AQP4, para localizar los pies perivasculares (Jurga et al., 2021). El incremento de GFAP es un indicador de astrogliosis o reactividad de los astrocitos, una respuesta de los astrocitos a condiciones adversas, como la pérdida de la homeostasis lo cual se asocia a cambios funcionales. La astrogliosis genera cambios morfológicos, además de facilitar la proliferación de los astrocitos, resultando en el incremento en los niveles de la proteína GFAP (Escartin et al., 2021).

Los astrocitos reactivos pueden responder favoreciendo el ambiente neurotóxico o neuroprotector, teniendo como marcadores a las proteínas C3 y S100a10, respectivamente (Liddelow et al., 2017). La proteína C3 forma parte del sistema de complemento; mientras que la proteína S100a10 es molécula de unión a calcio

intracelular y regula parte del tráfico intracelular en respuesta a los niveles de calcio (Park et al., 2016; Pekna & Pekny, 2021).

1.3 Senescencia celular

La senescencia celular es un estado que se caracteriza por una detención irreversible del ciclo celular, pero en el cual las células continúan siendo metabólicamente activas. Se presenta de forma fisiológica en diversos procesos, como durante la etapa del desarrollo embrionario o durante la reparación de los tejidos (Muñoz-Espín & Serrano, 2014), pero también como una respuesta celular al estrés en un mecanismo supresor de tumores.

La senescencia surge en respuesta a diversos factores, como el acortamiento de los telómeros, que sucede con cada división celular y, en este caso, se conoce como senescencia replicativa. Sin embargo, también puede ser un estado de respuesta a cambios en el microambiente celular, como la senescencia inducida por estrés de forma prematura (SIPS, por sus siglas en inglés). En este caso, los estresores pueden ser moléculas que induzcan la respuesta de daño al DNA, pero también por ambientes proinflamatorios (Birch & Gil, 2020). La característica más importante de las células senescentes es la secreción de un conjunto diverso de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteasas y otras moléculas que en conjunto dan lugar al fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, por sus siglas en inglés).

La senescencia celular es un fenómeno altamente heterogéneo en términos de perfiles transcripcionales, metabólicos y de componentes del SASP. Se han reportado diferencias entre especies, tipos de células e incluso a nivel de células individuales, lo que resulta en una activación diferencial de las vías de mediación de la senescencia, lo que dificulta encontrar un marcador específico para este fenómeno (Zhang et al., 2022). Para ello es frecuente evaluar algunas de las moléculas características del SASP como IL-1 β , TNF- α , IL-6. Por otro lado, también presentan incremento en las proteínas inhibidoras del ciclo celular como p21 y p16; cambios en el contenido lisosomal como la lipofusina y aumento en la enzima β -galactosidasa, así como cambios en las moléculas asociadas a alteraciones metabólicas, morfológicas y nucleares como la proteína HMGB1 (High mobility group box 1) y lamina B1 (Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Suryadevara et al., 2024).

1.4 Neuroinflamación

La neuroinflamación es una respuesta inflamatoria que se presenta en el SNC y que puede derivarse de la activación celular, incluyendo la activación de microglia y astrocitos, lo cual resulta en la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno, entre otros. Este proceso tiene como finalidad la restauración de la homeostasis cerebral, por ejemplo, mediante la eliminación de patógenos o la reparación de tejido o células dañadas. Sin embargo, la persistencia de este fenómeno puede repercutir en la función de diferentes células y estructuras, teniendo impacto incluso a nivel conductual.

En respuesta a condiciones no fisiológicas o adversas, los astrocitos presentan cambios morfológicos y funcionales, es decir, se vuelven reactivos. Algunos ejemplos de estas condiciones son las enfermedades neurodegenerativas, las infecciosas, el envejecimiento e incluso la pérdida de sueño (Hurtado-Alvarado et al., 2016; Liddelow et al., 2017a). La reactividad astrogliol o gliosis se caracteriza por cambios morfológicos como engrosamiento de los procesos astrocíticos y del soma. Además, los astrocitos entran en un estado de proliferación, lo que resulta en el incremento del número de células, principalmente en la región donde se presenta el daño (Escartin et al., 2021; Pekny & Nilsson, 2005).

Los astrocitos reactivos pueden tener respuestas benéficas o dañinas dependiendo el microambiente, favoreciendo la recuperación del tejido afectado y promover una resolución o, por el contrario, contribuir a incrementar el estado neurotóxico mediante la secreción de moléculas proinflamatorias, componentes del sistema del complemento. Al mismo tiempo, los astrocitos pierden o disminuyen sus funciones esenciales, contribuyendo al daño del SNC (Clayton & Liddelow, 2025).

Particularmente, la respuesta neurotóxica de los astrocitos se caracteriza por el incremento de la proteína C3 del sistema del complemento, siendo éstos la principal fuente de proteínas del sistema del complemento en SNC (Pekna & Pekny, 2021). Las proteínas del sistema del complemento pueden unirse a sus receptores, como el receptor C3aR en, en astrocitos, microglía, endotelio o neuronas (Pekna & Pekny, 2021).

En condiciones fisiológicas esta proteína se ha asociado a la poda sináptica (Gomez-Arboledas et al., 2021), sin embargo, su incremento involucra disfunción vascular, reactividad microglial y neurotoxicidad (Liddelow et al., 2017a; F. Wu et al., 2016).

La activación del receptor C3AR en el endotelio incrementa durante el envejecimiento, promoviendo la señalización que contribuye a la disminución de las proteínas de uniones estrechas, afectando la función de la BHE (Propson et al., 2021). También se ha encontrado incrementada en algunas condiciones como la estimulación con LPS y patologías con un alto grado inflamatorio como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y las enfermedades de Huntington, Alzheimer y Parkinson (Liddelow et al., 2017).

Mientras que en condiciones de neuroinflamación la proteína S100a10 disminuye, se le ha asociado con una respuesta neuroprotectora. En condiciones de hipoxia en los astrocitos reactivos S100a10 incrementa (Liddelow et al., 2017; Li et al., 2019a), probablemente debida a la regulación a través del factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) (Lu et al., 2020). Por otra parte, su rol en la neuroprotección se puede asociarse a su papel como regulador del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que participa en la plasticidad, diferenciación y mantenimiento neuronal, así como su efecto neuroprotector en condiciones de daño en SNC (Park et al., 2016) .

Neuroinflamación en condiciones no patológicas. Existen condiciones no patológicas, en las que hay pérdida de la homeostasis del SNC, como el envejecimiento y la falta de sueño. Ambas condiciones se caracterizan por presentar un ambiente neuroinflamatorio, que favorece la astrogliosis y la disfunción de la BHE así como del

sistema glinfático (Hurtado-Alvarado et al., 2016; Vasciaveo et al., 2023; Propson et al., 2021).

En el contexto de la pérdida de sueño, se ha reportado que algunas citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 incrementan a nivel sistémico y en el SNC (Manchanda et al., 2018), así como proteínas del sistema del complemento, como el componente C3 (Wadhwa et al., 2019; Zhai et al., 2023), generando un ambiente pro-inflamatorio. Se ha determinado que un ambiente proinflamatorio puede afectar procesos de memoria y aprendizaje. En un modelo de rata privadas de sueño durante 48 h, se observó afectación en el desempeño relacionado con la memoria espacial, lo cual se acompañó del incremento en las proteínas de sistema del complemento C3 y C5. El uso de antagonistas para estos mediadores inflamatorios mejoró el desempeño en la memoria espacial, además de revertir la disminución de la proteína BDNF (Wadhwa et al., 2019).

La neuroinflamación además de afectar los procesos de memoria y aprendizaje también se ha altera el correcto funcionamiento de estructuras celulares como la BHE, incrementando su permeabilidad y por tanto, disminuyendo la selectividad de lo que ingresa al parénquima cerebral (Gómez-González et al., 2013; He et al., 2014).

Por todo lo anterior, la pérdida de sueño se ha propuesto como una pieza clave en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas de forma prematura (Chu et al., 2023; Timonina et al., 2023).

Tanto en envejecimiento como en pérdida de sueño, hay una reducción en la expresión

de AQP4 que afecta la función del sistema glinfático. Algunos estudios han demostrado que la disminución en el tiempo de sueño conduce al incremento de moléculas de desecho celular en el SNC, como la proteína TAU y el péptido β -amiloide, ambos asociados con la enfermedad de Alzheimer. Esto puede deberse a la alteración que existe en el funcionamiento del sistema glinfático, lo cual, asociado a la neuroinflamación crónica, podría favorecer el deterioro cognitivo (Vasciaveo et al., 2023).

Se ha reportado un incremento de los marcadores de senescencia celular en los modelos de envejecimiento celular, lo cual puede ser producto de senescencia replicativa, pero también de SIPS debido al ambiente neuroinflamatorio y oxidante (López-Teros et al., 2024; Preininger y Kaufer, 2022). De manera que en estas condiciones pueden convivir astrocitos reactivos y senescentes, los cuales pueden contribuir al incremento en la permeabilidad de la BHE. Es por ello que se ha propuesto que la pérdida de sueño podría ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

2. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de investigación se ha determinado que en modelos murinos (ratones y ratas), 10 días de restricción de sueño pueden promover disfunción de la BHE (Hurtado-Alvarado et al., 2016, 2017). Dicha disfunción correlaciona con la disminución de proteínas de unión estrecha (claudin-5, ZO-1, ocludina), incrementando la permeabilidad de BHE a trazadores de diferentes pesos

moleculares, como azul cascada (10 kDa), azul de Evans (70 kDa), sodio-fluoresceína (300Da) y rodamina 123 (380 Da) (Gómez-González et al., 2013; Hurtado-Alvarado et al., 2016; Medina-Flores et al., 2020). La restricción de sueño también impacta a nivel de componentes celulares de la BHE, generando reactividad astrogliar, microglial y también la disociación de la unión entre pericitos y endotelio (Hurtado-Alvarado et al., 2016; Medina-Flores et al., 2016). Sin embargo, se desconoce cuáles son los cambios que se presentan progresivamente a lo largo de la restricción crónica de sueño, particularmente en el caso de los astrocitos y el impacto que puede tener en otro tipo de eventos importantes en el SNC, como la senescencia celular, que puedan contribuir con la neurodegeneración.

Por otro lado, se observó que en personas mayores de 60 años, una noche de privación de sueño incrementa la expresión de genes asociados con marcadores de senescencia en células mononucleares de sangre periféricas sanguíneas. Entre estos genes se incluyen componentes asociados a la regulación del ciclo celular, inflamatorios, asociados con la respuesta de daño al ADN y con el fenotipo secretor asociado a senescencia (SAPS): *IL6*, *CSF2*, *ICAM1*, *CXCL1*, *SIRT1*, *TERT*, *p16^{INK4a}* (*CDKN2A*), *NFKB1*, *NFKB2*, entre otros, (Carroll et al., 2016; Carroll & Prather, 2021). Sin embargo, no existe suficiente evidencia de que la pérdida de sueño, particularmente, de forma crónica, promueva la senescencia celular a nivel de SNC en individuos jóvenes.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ritmo de vida acelerado que se presenta en la actualidad, así como la exposición a aparatos electrónicos y los factores ambientales, han conducido a que la falta de sueño sea considerada un problema de salud pública. Se ha encontrado evidencia de que la falta de sueño puede traer consigo diversos problemas en la salud, tanto metabólicos, inmunológicos, mentales y conductuales. Además, recientemente este problema se ha asociado al incremento en enfermedades neurodegenerativas. Es por ello, que es importante entender el papel que tiene la pérdida de sueño en la regulación de la estructura que protege al cerebro, la BHE, así como de cada uno de sus componentes celulares. Se desconoce cuáles son los cambios que se presentan progresivamente a lo largo de la restricción crónica de sueño, particularmente en el caso de los astrocitos y el impacto que puede tener en otro tipo de eventos importantes en el SNC, como la senescencia celular, que puedan contribuir con la neurodegeneración.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La disfunción de la BHE inducida por la restricción de sueño se asocia con una reactividad astrogliar temprana, favoreciendo la senescencia celular prematura en el SNC?

5. RELEVANCIA DEL ESTUDIO

Este estudio busca exponer la importancia del sueño como una necesidad fisiológica fundamental. A pesar de ello, en la actualidad existen demasiadas incógnitas en relación con la función del sueño más allá del descanso, por lo que esta tesis

contribuirá con la generación de conocimiento en ciencia básica, permitiendo conocer, entender y plantear estrategias de investigación con enfoque en la fisiología del sueño, particularmente en el SNC.

Por otra parte, podría permitir la identificación de puntos temporales y blancos celulares críticos para su intervención, permitiendo en un futuro la creación de estrategias terapéuticas, así como la propuesta de políticas públicas que contribuyan a la prevención.

6. HIPÓTESIS

La restricción crónica de sueño induce el fenotipo neurotóxico en los astrocitos, el cual promueve la disfunción de la BHE

7. OBJETIVOS

7. 1 Objetivo general

Determinar el papel de la activación astrogliar en la regulación de la BHE a lo largo de la pérdida de sueño.

7.2 Objetivos particulares

- i Evaluar la función de la BHE a lo largo de la restricción de sueño en ratones macho de la cepa C57BL/6.
- ii Determinar los cambios en la estructura de la BHE a lo largo de la restricción de sueño.

- iii Identificar la progresión de los cambios de la astrogliá a lo largo de la restricción de sueño.
- iv Caracterizar la respuesta asociada a la astrogliosis inducida por la restricción crónica de sueño
- v Determinar la progresión de la neuroinflamación asociada a la restricción crónica de sueño en el sistema nervioso central
- vi Establecer la relación entre la restricción crónica de sueño sobre la inducción de senescencia celular en SNC en ratones jóvenes C57BL/6

8. MATERIAL Y MÉTODO

8. 1 Animales

Para este proyecto se usaron ratones macho de la cepa C57BL/6 con un peso de entre 20-26 g, de 8 a 10 semanas de edad. Los animales se obtuvieron de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se colocaron en grupos de 3-5 animales por caja-habitación en el bioterio del Laboratorio de Neuropsicobiología en la

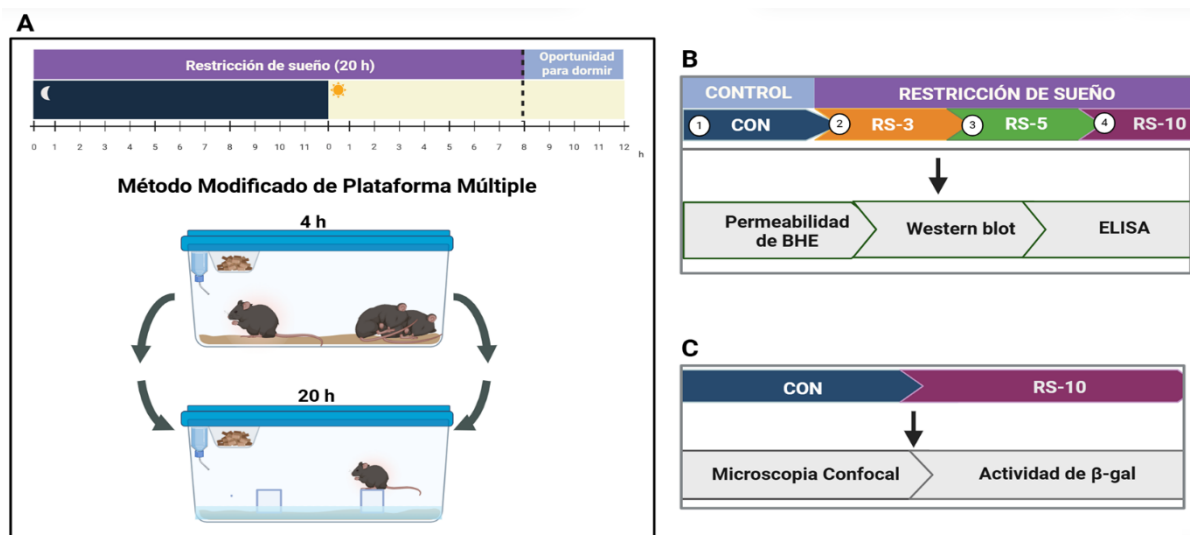


Fig. 4 | Modelo modificado de plataforma múltiple (MMPM). Para este trabajo se utilizó el MMPM (A) para llevar a cabo la restricción de sueño en los ratones. Se observa que los ratones se colocan de forma individual en la caja para restricción de sueño, durante 20 h; mientras que para su oportunidad para dormir (últimas 4 h de la fase de luz) se colocan en su caja habitación con su grupo social. El grupo control permaneció en su caja hábitat durante el transcurso del experimento. Se emplearon 3 cohortes, 1) para permeabilidad (B); 2) para obtención de proteína (B) y 3) para obtención de cortes histológicos (C).

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, con un ciclo de luz oscuridad de 12 h (la luz enciende a las 2 am). Los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* durante los 15 días de adaptación más los días de duración del tren experimental. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a la norma de disposición de residuos biológicos (NOM-087-ECOL-1995), así como al Comité Académico de Ética de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

8.2 Grupos experimentales

Los ratones fueron asignados a las siguientes condiciones experimentales: 3 días de restricción de sueño (SR3), 5 días de restricción de sueño (SR5), 10 días de restricción de sueño (SR10), y el grupo control (CON) que durmió *ad libitum* en sus cajas-habitación. Todos los experimentos y ensayos con animales se llevaron a cabo por aleatorización. Todos los animales tuvieron la misma probabilidad de ser seleccionado y asignado a cada grupo experimental ya que todos cumplieron con el criterio de edad establecido (8-10 semanas de edad).

8.3 Modelo de restricción de sueño

El protocolo de restricción crónica de sueño empleado en este proyecto consiste en la restricción de 20 h diarias de sueño con oportunidad para dormir durante las últimas 4 h de la fase de luz. Para ello, se utiliza el modelo modificado de plataformas múltiples

(MMPM, **Fig. 4**), que ha sido previamente reportado y validado en nuestro grupo de investigación, en donde se ha demostrado que este método incrementa de forma efectiva, el tiempo de vigilia (Gómez-González, et al., 2013; Hurtado-Alvarado et al., 2018).

El MMPM consiste en poner al animal de forma individual durante 20 h cada día, en una caja de acrílico que contiene 2 plataformas (con un diámetro de entre 2.5-3 cm) que se encuentran rodeadas por agua con aproximadamente 1 cm de profundidad. Cuando el animal pierde el tono muscular, cae al agua, despierta y sube nuevamente a la plataforma. Durante las últimas 4 h de la fase luz el ratón se traslada a su caja-habitación con el mismo grupo social (para evitar estrés por aislamiento social) para tener oportunidad de dormir.

8.4 Evaluación de la permeabilidad de la BHE

Para evaluar la función de la BHE, en una primera cohorte de ratones, se llevaron a cabo ensayos de permeabilidad usando un cóctel de trazadores que contenía azul de Evans (1 mg/mL) y sodio acoplado a fluoresceína (Na-F, 10 mg/mL). Al término del periodo de restricción de sueño, cada ratón fue anestesiado con pentobarbital sódico (0.063 g/kg) vía intraperitoneal (n = 5). Posteriormente, el cóctel de trazadores que contenía sodio-fluoresceína (Na-F, 10 mg/mL) y azul de Evans (1 mg/mL), fue administrado por vía intracardiaca en el ventrículo izquierdo (0.1 mL/20 g de peso) y se dejó circular durante 3 min, seguido de una perfusión con solución salina (0.9%) durante 3 min. Finalmente, la corteza cerebral y el hipocampo fueron disectados y

pesados. Las muestras cerebrales se homogeneizaron con 200 μ L PBS y 200 μ L de metanol. Las muestras fueron centrifugadas a 13500 rpm/10 min. Cien μ L del sobrenadante se colocaron en cada pozo (duplicado) de una placa de 96 pozos, que fue cuantificado mediante un lector de placas mediante absorbancia (Na-F: 535nm; azul de Evans: 595nm). Se realizó una curva de calibración con cada uno de los trazadores para determinar la concentración de cada trazador por gr de tejido, previamente reportado (Medina-Flores et al., 2020).

Obtención de tejido para proteína (Western blot y ELISA). A partir de una segunda cohorte, se obtuvieron los cerebros de los ratones controles o de los ratones restringidos de sueño durante 3, 5 o 10 días (n = 4-7) para la extracción de proteína. La corteza cerebral y el hipocampo fueron disectados: las secciones del hemisferio derecho fueron utilizadas para análisis por western blot; mientras que las secciones del hemisferio izquierdo fueron destinadas para el análisis por ELISA. Los tejidos obtenidos fueron congelados y almacenados a -40°C, hasta su procesamiento.

8.5 Western blot

El tejido fue homogenizado con 200 μ L de buffer de lisis + inhibidores de proteasas, seguido de una centrifugación de 13500 rpm/10 min a 4°C. A partir del sobrenadante se cuantificó la proteína por el método de Bradford (BioRad, 500-0006). Las proteínas (100 μ g) fueron separadas en un gel desnaturalizante de acrilamida (10%) SDS-Page mediante una electroforesis y posteriormente transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con PBS-TWEEN 0.1% + 10% de leche

descremada, durante 30 min a temperatura ambiente. Se incubaron con anticuerpo primario [anti-claudin-5 (orb160461, 1:1000), anti-ZO-1 (Life technologies 402200; 1:1000), anti-GFAP (Abcam, ab4648, 1:1000), anti-C3 (Abcam, ab200999), anti-S100a10 (NBP1 89370), anti-p21 (sc-6246, 1:1000), anti- β -galactosidasa (sc-65670, 1:1000)] durante toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado *anti-mouse* (1:2500, Vector laboratories, BA-9200) o *anti-rabbit* (1:2500, Vector laboratories, BA-1000). Las membranas se lavaron 3 veces y se incubaron con ABC kit (Vectastain PK-6100) por 30 min. Se le hicieron 3 lavados más y se revelaron con el kit de detección de quimioluminiscencia (Immobilon western WBKLS0500). Las imágenes se obtuvieron con el equipo C-Digit (LI-COR iS), y las bandas fueron analizadas y cuantificadas con el software imageStudio (Version 5.1). La membrana teñida con rojo Ponceu fue usada como control de carga.

8.6 Ensayo de inmuno-adsorción ligado a enzima (ELISA)

La corteza cerebral, el hipocampo y el suero de los ratones fueron obtenidos (como se describió en la sección anterior). El tejido cerebral fue homogeneizado con 500 μ L de buffer de lisis con un cóctel de inhibidores de proteasas, posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min a 4°C, obteniendo el sobrenadante. Las muestras fueron incubadas en placas recubiertas de anticuerpo de captura para cuantificar los niveles de las citocinas (por duplicado) TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 y BDNF (Mouse TNF- α DuoSet DY410, Mouse IL-1 β /IL-1F2 DuoSet DY401, Mouse IL-4 DuoSet DY404,

Mouse IL-6 DuoSet DY406, Mouse IL-10 DuoSet DY417, HUMAN/Mouse BDNF DuoSet DY248, R&D Systems) durante 24 h a 4°C con PBS-tween 20 (0.05%/0.5% BSA), seguido de tres lavados e incubadas con el anticuerpo de detección durante 2 h a temperatura ambiente. El sistema antígeno-anticuerpo es detectado mediante el substrato TMB. Se obtuvo la densidad óptica a 450 nm y 570 nm. La concentración se obtuvo mediante una curva de calibración de proteína mediante el método de Bradford. Los valores en las muestras cerebrales se expresan como pg/mg proteína; mientras que para suero se expresa como pg/mL.

8.7 Obtención de cortes histológicos

Se utilizó una tercera cohorte de ratones, donde únicamente se incluyeron los grupos CONT y SR10. Al término del periodo de restricción de sueño, cada ratón fue anestesiado con pentobarbital sódico (0.063 g/kg) vía intraperitoneal. Una vez anestesiado, se perfundió con solución salina (0.9%) durante 3 min y posteriormente con paraformaldehído (PFA 4%) durante 3 min más. Se extrajo el cerebro completo y se colocó en PFA 4% durante 24-48 h a 4°C. Posteriormente, se cambió a una solución con sacarosa al 30% + azida sódica (0.05%) y se guardó a 4°C. Los cerebros se congelaron usando 2-metil-butano (enfriado con hielo seco) y se hicieron cortes coronales de 20 µm de grosor, que permitieran la observación del hipocampo dorsal y la corteza cerebral simultáneamente.

8.8 Inmunofluorescencia en cortes cerebrales

Se utilizaron cortes cerebrales de animales controles (CON) y restringidos de sueño durante 10 días (SR10). Brevemente, los cortes cerebrales (20 μ m) que presentaron el hipocampo dorsal bilateral visible, fueron colocados en portaobjetos gelatinizados. Las laminillas con los cortes se hidrataron con PBS 1X, seguido de la recuperación de antígeno colocando la laminilla en buffer de citratos (Sigma C9999-1000ML) a 70-90°C. Se hicieron lavados y se permeabilizó el tejido (PBS IX + TRITON X-100 0.2%). Se hizo el bloqueo del tejido (PBS 1X + BSA 1% + TRITON X-100 0.1%) y se incubó con Sudán Black (Sigma 199664-25G). La laminilla fue incubada durante 2 días con los anticuerpos: anti-GFAP (Cat # 14-9892-82; 1:1000), anti-C3 (GeneTex 72994; 1:200) y anti-Iba-1 (Abcam ab178847, 1:1000). Se realizaron lavados con PBS 1X y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor-594 (1:500, Jackson ImmunoResearch, 115-585-003), Donkey anti-goat Alexa-Fluor 488 (1:500, Jackson ImmunoResearch, 705-545-147) y Donkey Anti-Rabbit Alexa Fluor-680 (1:500, Jackson ImmunoResearch, 711-625-152) durante 2 h, seguido de incubación con DAPI durante 15 min. Finalmente se obtuvieron las imágenes con ayuda del microscopio confocal ZEISS LSM 880 con el objetivo 20X. Posteriormente, se realizaron los análisis de la densidad integrada de fluorescencia para GFAP, C3 e Iba-1, con el programa FIJI.

8.9 Ensayo β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal)

El ensayo para la evaluación de la actividad de la enzima β -galactosidasa se llevó a cabo en cortes cerebrales de animales controles (CON) y restringidos de sueño

durante 10 días (SR10). Los cortes cerebrales (20 µm) que presentaron el hipocampo dorsal bilateral visible fueron colocados en portaobjetos gelatinizados. Las laminillas fueron hidratadas con PBS 1X y teñidas con la solución que contenía 20 mg/mL de X-gal (V394A, Promega, Madison, WI, United States) en buffer dimetilformamida, ácido cítrico (0.2 M)/fosfato de sodio pH = 6, ferricianuro de potasio (100 mM), cloruro de sodio (5 M) y cloruro de magnesio (1 M), reportado previamente por Salas-Venegas et al. (2023). Las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 12 h. Posteriormente, las laminillas se lavaron, se agregó el medio de montaje, se les colocó un cubreobjetos y se sellaron. Finalmente, se tomaron las microfotografías usando el microscopio invertido Carl Zeiss VERT.A1, con los objetivos 5X y 20X. Las imágenes se procesaron usando el software FIJI.

8.10 Análisis estadísticos

El tamaño de la muestra se determinó usando el método de ecuación de recurso (Resource Equation Method; Charan & Kantharia, 2013), que determina el valor de E:

$$E = \# \text{ total de animales por experimento} - \# \text{ total de grupos experimentales}$$
$$E = (5 \times 4) - 4 = 16$$

De acuerdo con este método, un valor de “E” entre 10 y 20 se considera adecuado. El valor de “E” que obtuvimos fue de 16. Se utilizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar diferencias entre grupos. La prueba Dunnett fue usada como prueba *post hoc*. Se consideró como estadísticamente significativo $p < 0.05$. Los

análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism (Versión 8.0.1). Los datos se representan como media $\pm$ desviación estándar.

9. RESULTADOS

9.1 La restricción de sueño induce pérdida progresiva de la función de la BHE

Nuestros resultados muestran que la restricción de sueño induce un incremento en la permeabilidad de la BHE a trazadores de diferente peso molecular: azul de Evans con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa; y sodio-fluoresceína (Na-F) con un peso de 370 Da. En el caso de azul de Evans, se observa un incremento en la permeabilidad a partir de los 5 días de restricción de sueño en la corteza cerebral ($F_{3, 15} = 11.2$, $p = 0.0004$, **Fig. 5A**), mientras que en el hipocampo el incremento en la permeabilidad comienza desde el tercer día de restricción de sueño ($F_{3, 16} = 23.06$, $p = 0.0001$, **Fig. 5B**) y continúa hasta alcanzar su punto máximo (en los tiempos que nosotros evaluamos) después de 10 días de restricción de sueño. Por otro lado, el trazador Na-F incrementa la permeabilidad en la corteza cerebral hasta los 10 días de restricción de sueño ($F_{3, 16} = 5.039$, $p = 0.0120$, **Fig. 5C**), mientras que en el hipocampo el incremento se presenta desde los 5 días de restricción de sueño ($F_{3, 16} = 5.642$, $p = 0.0078$, **Fig. 5D**), indicando que existen diferencias regionales respecto a la regulación de la función de la BHE.

El incremento de la permeabilidad de la BHE se ha asociado con cambios estructurales que pueden incluir modificaciones celulares y con el contenido de ciertas proteínas. Una de las características fundamentales de la BHE es la alta presencia de proteínas

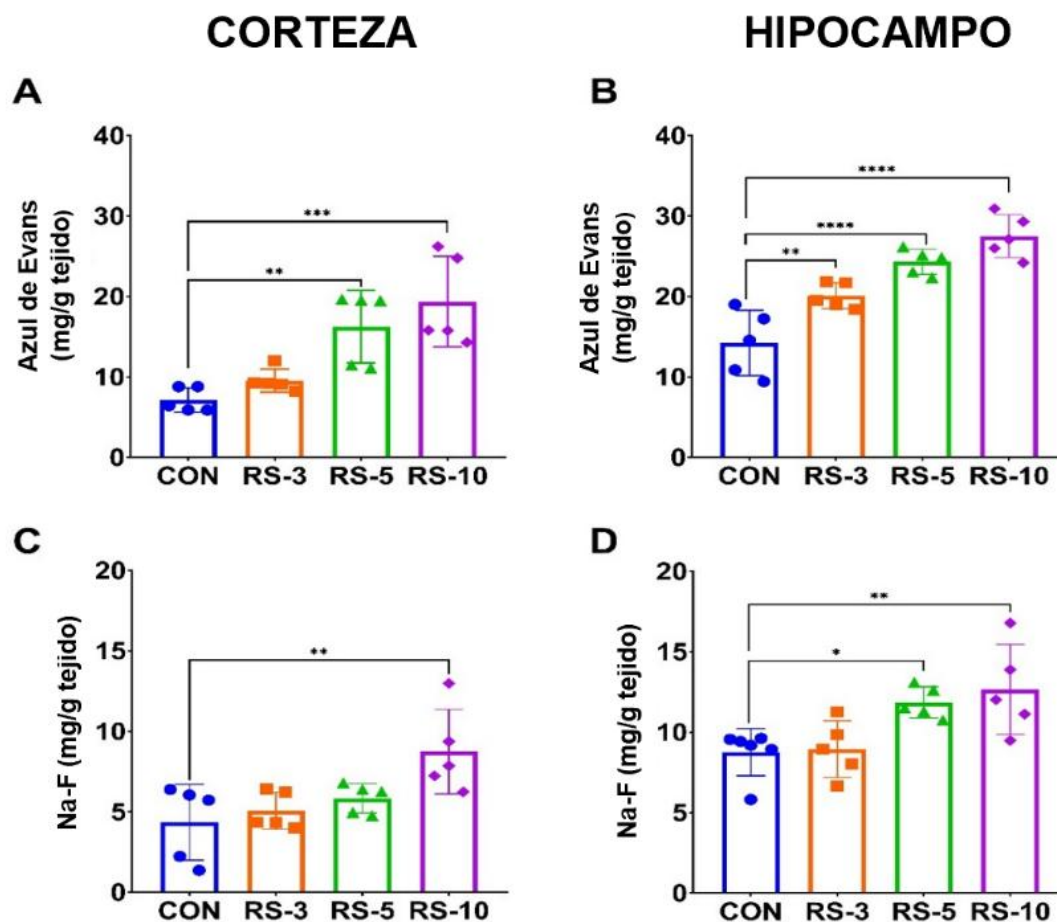


Fig. 5 | La restricción crónica de sueño induce incremento de permeabilidad de la BHE. Las gráficas muestran la permeabilidad de la BHE al trazador azul de Evans (A-B) en corteza cerebral e hipocampo, respectivamente; y a Na-F (C-D) en corteza cerebral e hipocampo, respectivamente de tejido de ratones controles (CON), restringidos de sueño durante 3 (SR3), 5 (SR5) o 10 (SR10) días. Los datos se expresan en mg/g tejido. Media $\pm$ desviación estándar, n = 5 por grupo, * p < 0.05, ** p < 0.01; *** p < 0.001 comparado contra el CON.

de unión estrecha, en particular claudina-5 (Cldn-5) y zónula occludens (ZO-1). Es por ello, que evaluamos el efecto de la restricción crónica de sueño sobre el contenido proteico de dichas proteínas.

Observamos que la restricción de sueño disminuye el contenido de Cldn-5 en la corteza cerebral desde los 5 días de restricción de sueño ($F_{3,20} = 5.363$, $p = 0.0071$, **Fig.**

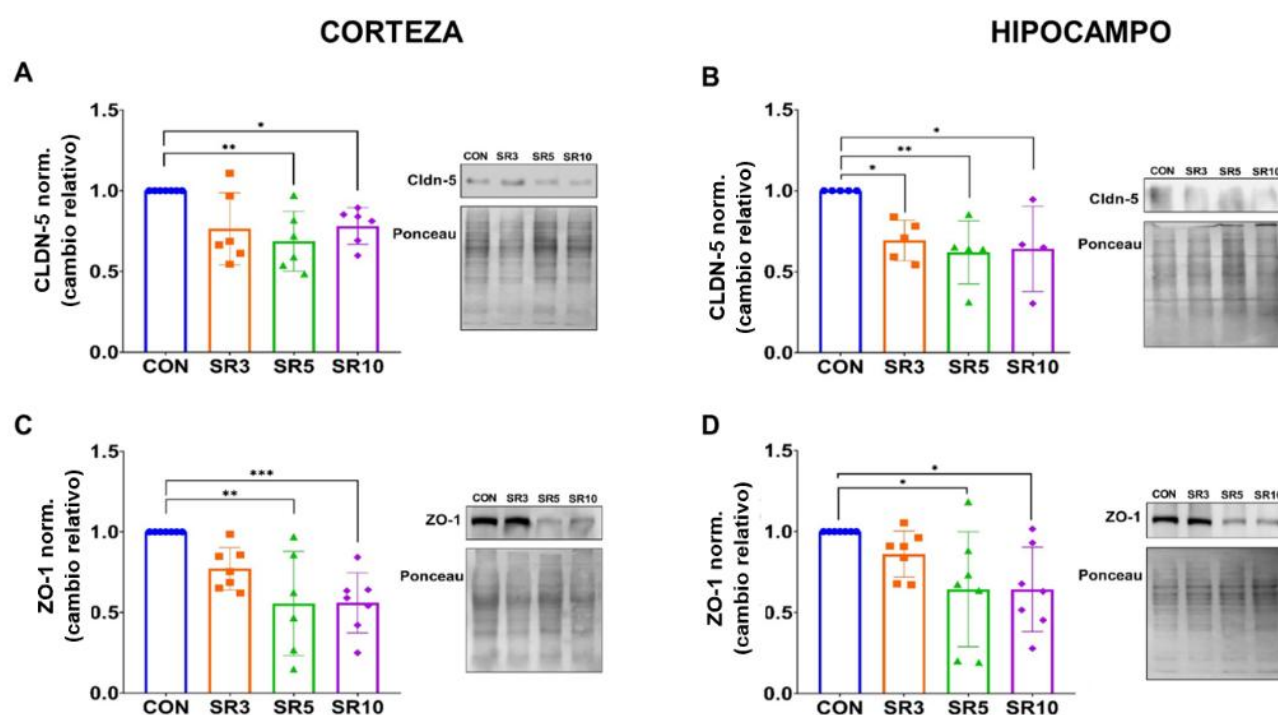


Fig. 6 | La restricción de sueño induce cambios en la estructura de la BHE.

Análisis semicuantitativos de las uniones estrechas tejido de ratones restringidos de sueño 3 (SR3), 5 (SR5) o 10 (SR10) días comparados contra controles (CON). El panel A) muestra los ensayos de western blot para cada grupo. Las gráficas muestran los niveles normalizados expresados en cambio relativo (fold change) de las proteínas Cldn-5 (B, C) y ZO-1 (D, E). Media $\pm$ desviación estándar, $n = 5$ por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparado contra el CON.

6A), niveles que se mantuvieron disminuidos en el grupo SR10. En el hipocampo se observó la disminución desde el tercer día de restricción de sueño ($F_{3, 19} = 5.883$, $p = 0.0051$, **Fig. 6C**), efecto que se mantuvo hasta los 10 días de restricción de sueño. Estos datos correlacionan con los observados previamente en la permeabilidad de BHE, donde se observó que el hipocampo incrementó la permeabilidad para el azul de Evans desde el tercer día de restricción de sueño (**Fig. 5B**) La proteína ZO-1 también disminuyó a partir de los 5 días de restricción de sueño tanto en corteza ($F_{3, 23} = 8.309$, $p = 0.0006$, **Fig. 6D**) como en el hipocampo ($F_{4, 24} = 4.013$, $p = 0.0190$, **Fig. 6E**).

9.2 La restricción crónica de sueño induce reactividad astrogliar

La restricción crónica de sueño promueve inflamación de bajo grado, lo cual, después de 10 días, se asocia con incremento de permeabilidad de BHE así como reactividad astrogliar (Hurtado-Alvarado et al., 2017). Sin embargo, no se han descrito los cambios progresivos en los astrocitos y su relación con la regulación en la BHE, debido a esto se evaluó la reactividad astrogliar a diferentes puntos temporales, para determinar si podría ser uno de los precursores de la neuroinflamación generada después de la restricción de sueño.

En primer lugar, evaluamos el marcador clásico de astrocitos, la proteína GFAP. Encontramos que los niveles de GFAP incrementan tanto en la corteza cerebral ($F_{3, 20} = 6.867$, $p = 0.0023$, **Fig. 7A, G**), así como en el hipocampo ($F_{3, 23} = 10.40$, $p = 0.0002$, **Fig. 7B, H**) después de 5 días de restricción sueño, los cuales se mantienen elevados hasta el décimo día de restricción de sueño, en ambas regiones evaluadas (**Fig. 7A,**

B). La astrogliá reactiva puede presentar diferentes respuestas celulares como la secreción de la proteína C3 del sistema de complemento (Liddelow et al., 2017) y la proteína S100a10 (Liddelow et al., 2017). Por lo que se evaluaron ambos marcadores para diferenciar entre la respuesta neurotóxica y neuroprotectora.

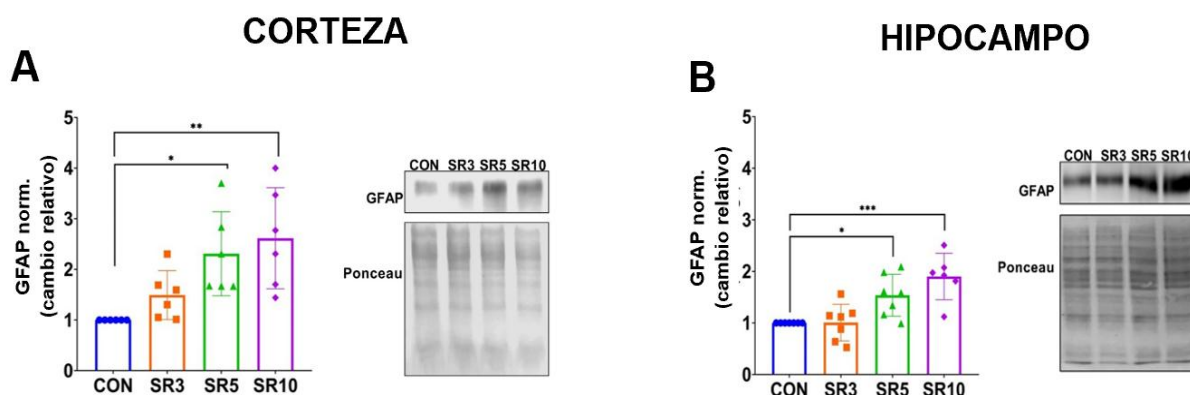


Fig. 7 | La restricción crónica de sueño induce cambios tempranos en la reactividad glial. Análisis semicuantitativos de las uniones estrechas de tejido de ratones restringidos de sueño 3 (SR3), 5 (SR5) o 10 (SR10) días comparados contra controles (CON). Se observan los niveles normalizados de GFAP en corteza (A) e hipocampo (B). Media $\pm$ desviación estándar, $n = 5$ por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparado contra el CON.

Nuestros datos muestran que los niveles de la proteína C3 incrementa después de 5 días de restricción de sueño en corteza cerebral ($F_{3, 18} = 5.377$, $p = 0.0081$, **Fig. 8A**), niveles que se mantienen hasta los 10 días de restricción de sueño, tiempo en el que el incremento se ve reflejado en el hipocampo ($F_{3, 22} = 5.969$, $p = 0.0039$, **Fig. 8B**). Por otro lado, los niveles de la proteína S100a10 tanto en corteza ($F_{3, 16} = 3.629$, $p = 0.0360$,

Fig. 8C) como en hipocampo ($F_{3, 22}=8.055$, $p=0.0008$, **Fig. 8D)** disminuye en los animales restringidos de sueño 10 días.

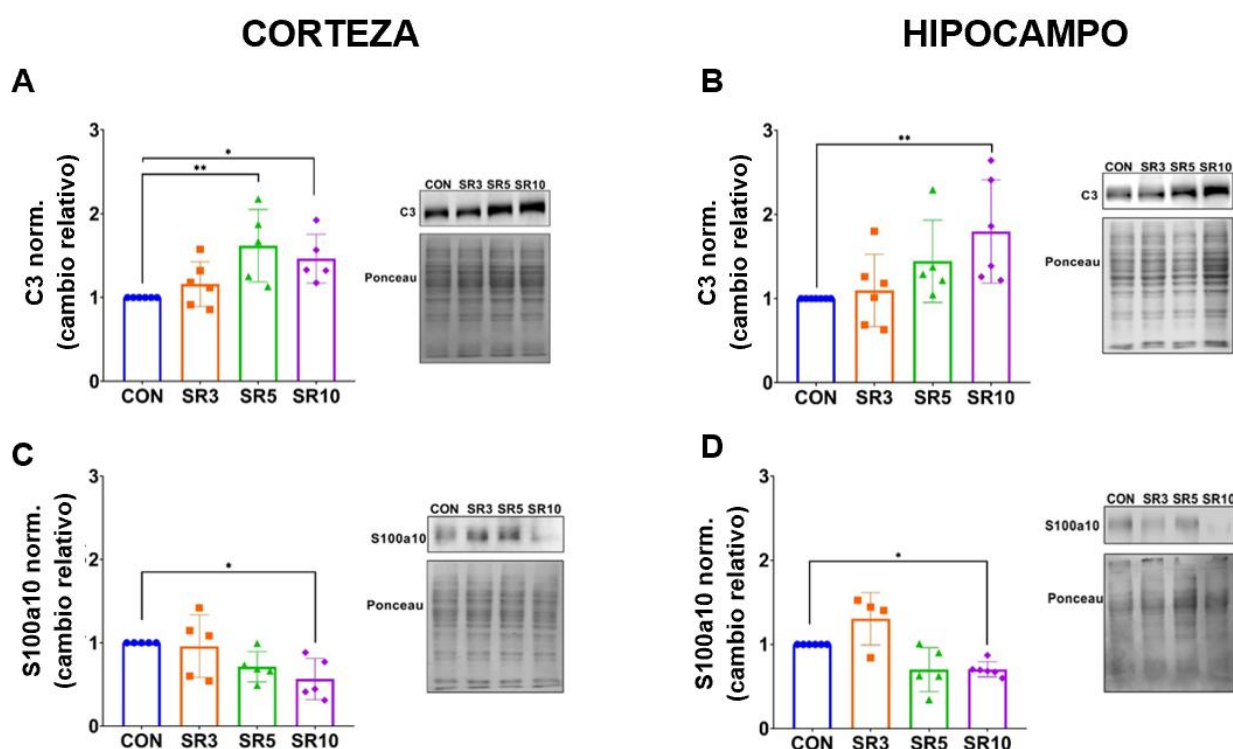


Fig. 8 | La restricción crónica de sueño induce incremento del marcador de astroglía neurotóxica. Las gráficas muestran los niveles de la proteína C3 (respuesta neurotóxica) y S100a10 (respuesta neuroprotectora) en corteza e hipocampo de ratones controles (CON), restringidos de sueño durante 3 (SR3), 5 (SR5) o 10 días (SR10). Media $\pm$ desviación estándar, $n = 5-7$ por grupo, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ comparado contra CON.

Si bien a nivel de SNC la proteína C3 es producida principalmente por los astrocitos, no es exclusiva de este tipo celular (Pekna y Pekni, 2021), por esta razón se evaluó la proteína C3 en el grupo dónde se presentaron los mayores niveles, es decir, en los

animales restringidos de sueño durante 10 días. La marca de C3 fue determinada en células positivas a GFAP e Iba-1, marcador de microglía, mediante microscopía confocal, en las regiones CA1 (**Fig. 9**) y CA3 (**Fig. 10**) del hipocampo y la corteza cerebral (**Fig. 11**). En las imágenes representativas observamos que la proteína C3 colocaliza con las células positivas a GFAP, pero no con las células positivas a Iba-1, es decir, estos datos nos indican que en este caso la proteína C3 se encuentra presente en los astrocitos.

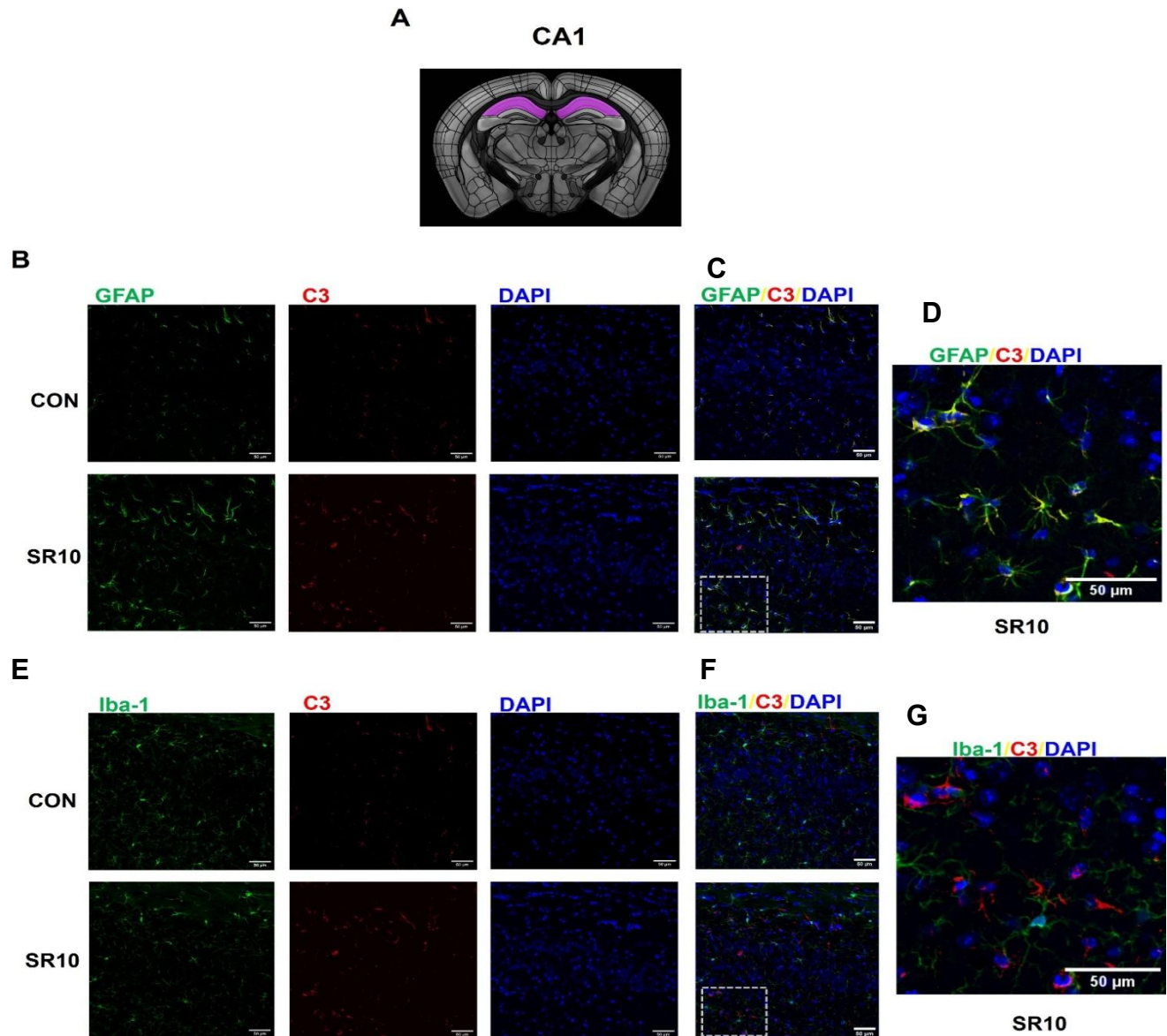


Fig. 9 | Evaluación de la proteína C3 del complemento en la región CA1 del hipocampo, en el grupo SR10. Se muestra un esquema de la región cerebral CA1 en color rosa (A), en la cual se observan a los astrocitos (B) marcados con GFAP (verde), simultáneamente se marcó la proteína C3 (rojo) y los núcleos/DAPI (azul), las imágenes de la sección superior corresponden al grupo CON; las imágenes de la sección inferior al grupo SR10. Se observa el empalme de las tres marcas (C), y el recuadro punteado en SR10 se magnifica en D. De la misma forma, se muestra la microglia (E-G) marcada con Iba-1 (n = 1).

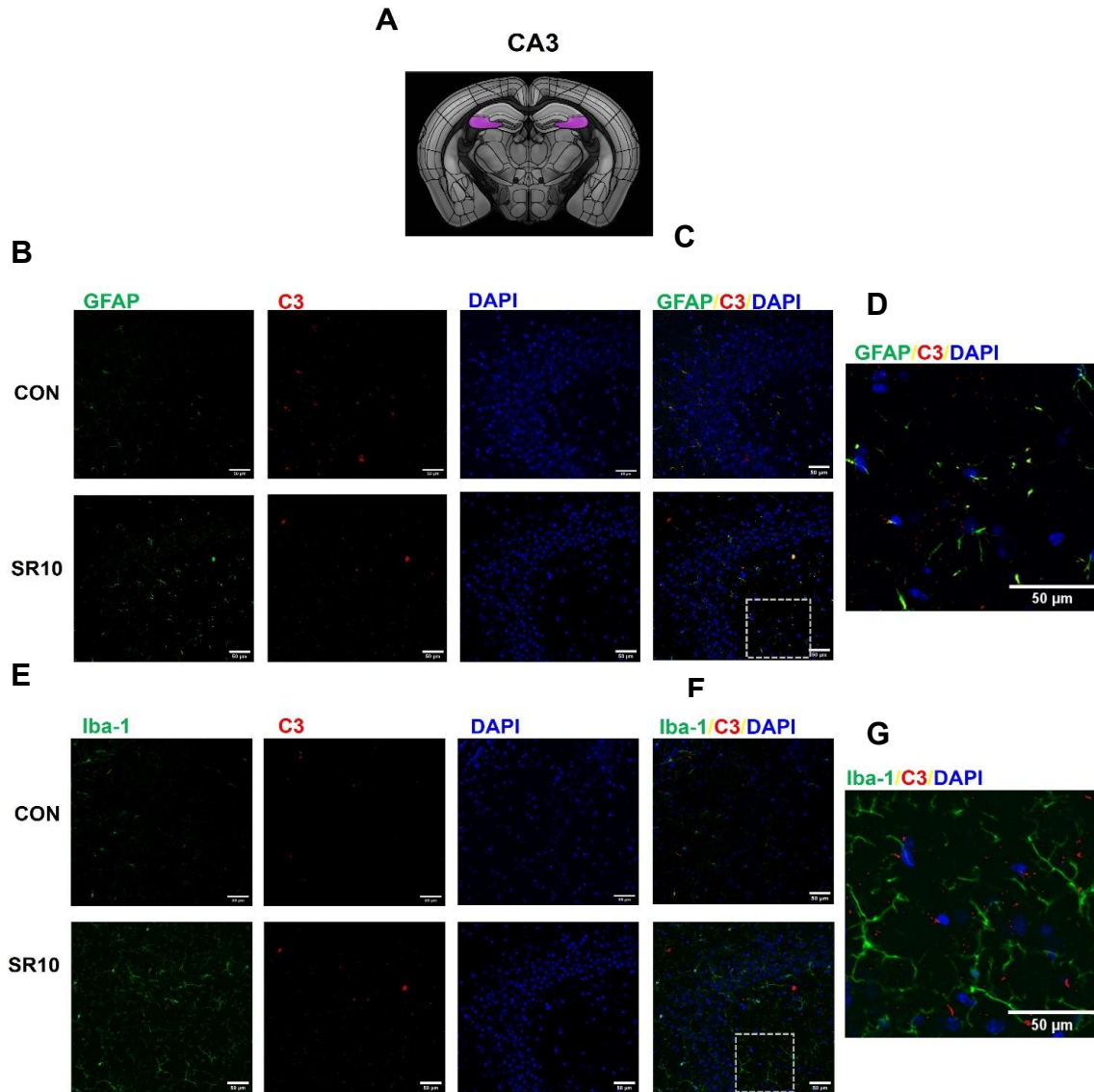


Fig. 10| Evaluación de la proteína C3 del complemento en la región CA3 del hipocampo, en el grupo SR10. Se muestra un esquema de la región cerebral CA1 en color rosa (A), en la cual se observan a los astrocitos (B) marcados con GFAP (verde), simultáneamente se marcó la proteína C3 (rojo) y los núcleos/DAPI (azul), las imágenes de la sección superior corresponden al grupo CON; las imágenes de la sección inferior al grupo SR10. Se observa el empalme de las tres marcas (C), y el recuadro punteado en SR10 se magnifica en D. De la misma forma, se muestra la microglia (E-G) marcada con Iba-1 (n = 1).

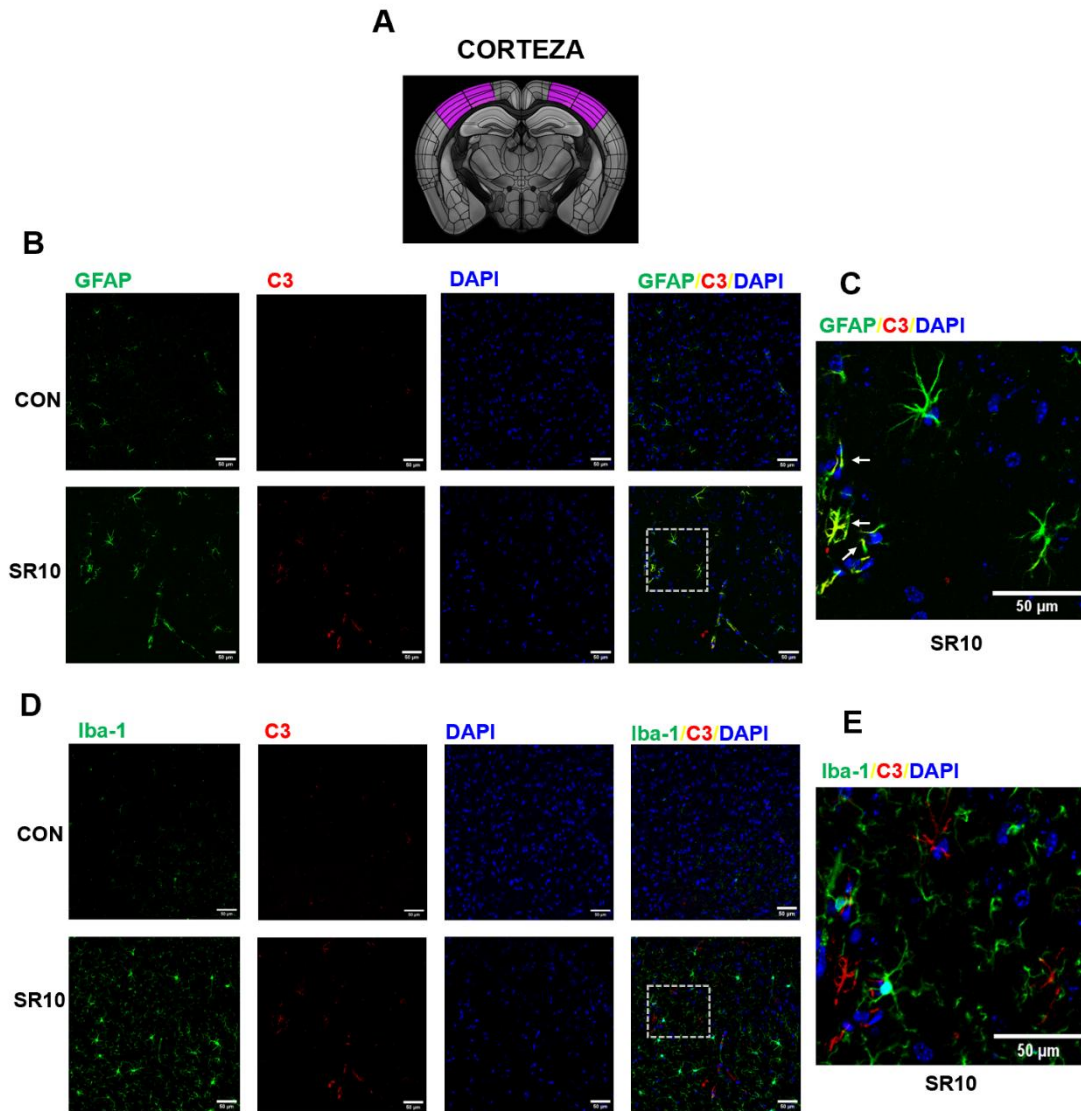


Fig. 11 | Evaluación de la proteína C3 del complemento en la corteza cerebral, en el grupo SR10. Se muestra un esquema de la región cerebral CA1 en color rosa (A), en la cual se observan a los astrocitos (B) marcados con GFAP (verde), simultáneamente se marcó la proteína C3 (rojo) y los núcleos/DAPI (azul), las imágenes de la sección superior corresponden al grupo CON; las imágenes de la sección inferior al grupo SR10. Se observa el empalme de las tres marcas (C), y el recuadro punteado en SR10 se magnifica en D. De la misma forma, se muestra la microglia (E-G) marcada con Iba-1 ($n = 1$).

9.3 La restricción crónica de sueño modifica el perfil de citocinas de manera diferencial en hipocampo y corteza cerebral.

Previamente nuestro grupo de investigación reportó que 10 días de restricción de sueño en ratones C57BL/6 promueve el incremento de algunas moléculas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ a nivel sistémico (Hurtado-Alvarado et al., 2017). Además, el incremento en factores proinflamatorios se ha visto implicado en diversos procesos a nivel de SNC, como el incremento de la permeabilidad de la BHE, procesos de senescencia celular y neurotoxicidad (Preininger & Kaufer, 2022). Debido a estos cambios previamente reportados decidimos evaluar un perfil de citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias a nivel de SNC.

Encontramos que el TNF- α incrementa de manera progresiva desde los 3 días de restricción de sueño en la corteza ($F_{3, 16} = 111$, $p < 0.0001$; **Fig. 12A**) y en el hipocampo ($F_{3, 16} = 52.70$, $p < 0.0001$, **Fig. 12B**), al igual que la IL-1 β que también presenta un incremento progresivo, que inicia a los 5 días de restricción de sueño en la corteza ($F_{3, 16} = 57.78$, $p < 0.0001$, **Fig. 12C**) y desde los 3 días de restricción de sueño en el hipocampo ($F_{3, 16} = 70.78$, $p < 0.0001$, **Fig. 12D**), en ambas regiones el nivel máximo se observó después de 10 días de restricción de sueño. En el caso de la IL-6, se observó el incremento únicamente en el hipocampo ($F_{3, 16} = 4.277$, $p < 0.0213$, **Fig. 12F**) después de 10 días de restricción de sueño. Se evaluaron los niveles de IL-1 β a nivel sistémico y encontramos que los niveles incrementaron después de 10 días de restricción de sueño ($F_{3, 16} = 5.191$, $p = 0.0108$, **Fig. 12G**).

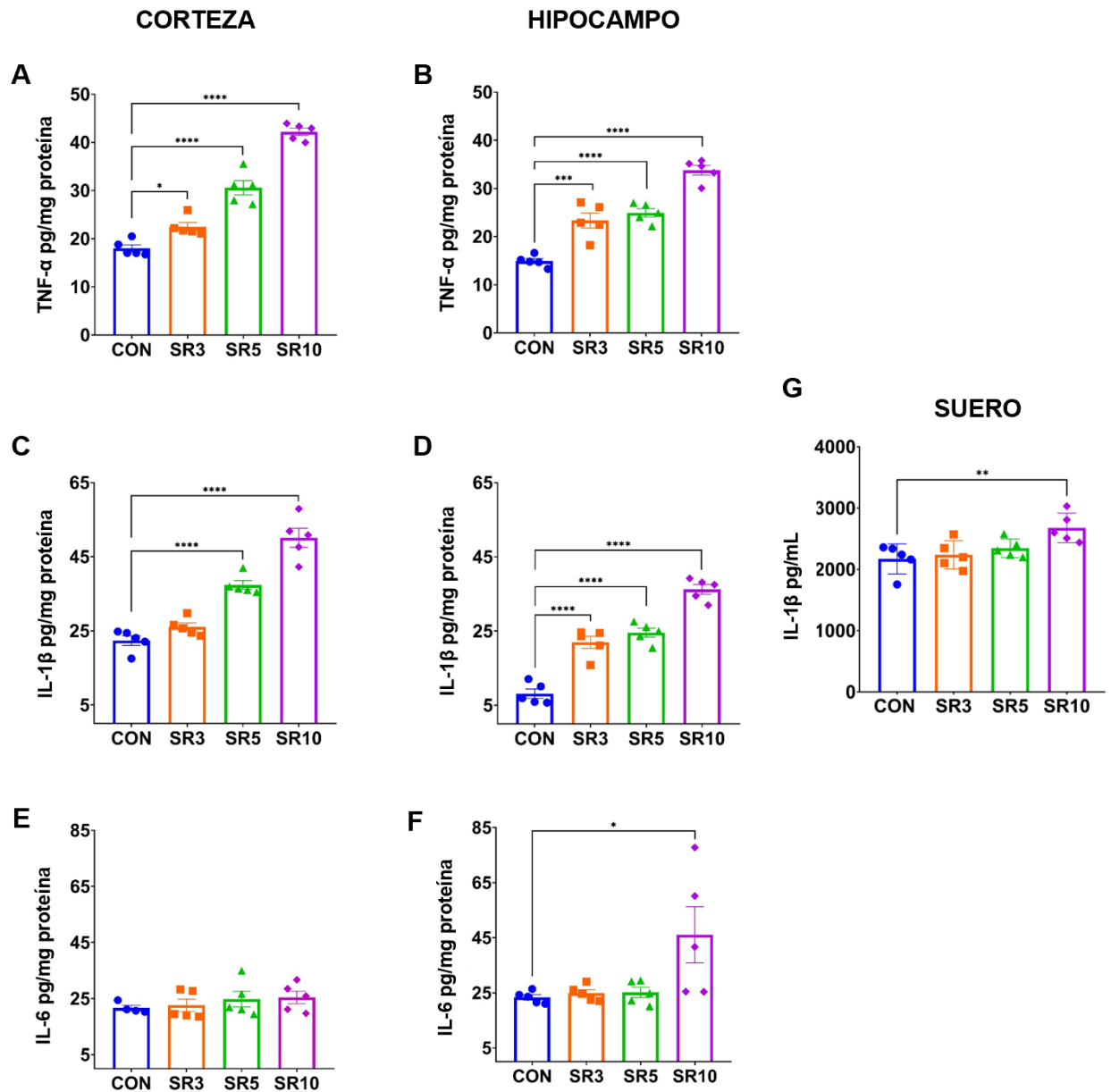


Fig. 12| La restricción de sueño modifica citocinas proinflamatorias de forma diferencial. Las gráficas muestran los niveles de citocinas proinflamatorias TNF- α (A-B), IL-1 β (C- D) e IL-6 (E-F) en corteza cerebral, hipocampo e IL-1 β en suero (G) de ratones restringidos de sueño 3 (SR3), 5 (SR5) o 10 (SR10) días comparados contra controles (CON). Los valores se expresan en pg/mg proteína. Media $\pm$ desviación estándar, n = 5 por grupo, *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001 comparado contra el CON.

Por otro lado, en el perfil anti-inflamatorio se observó disminución de la IL-4

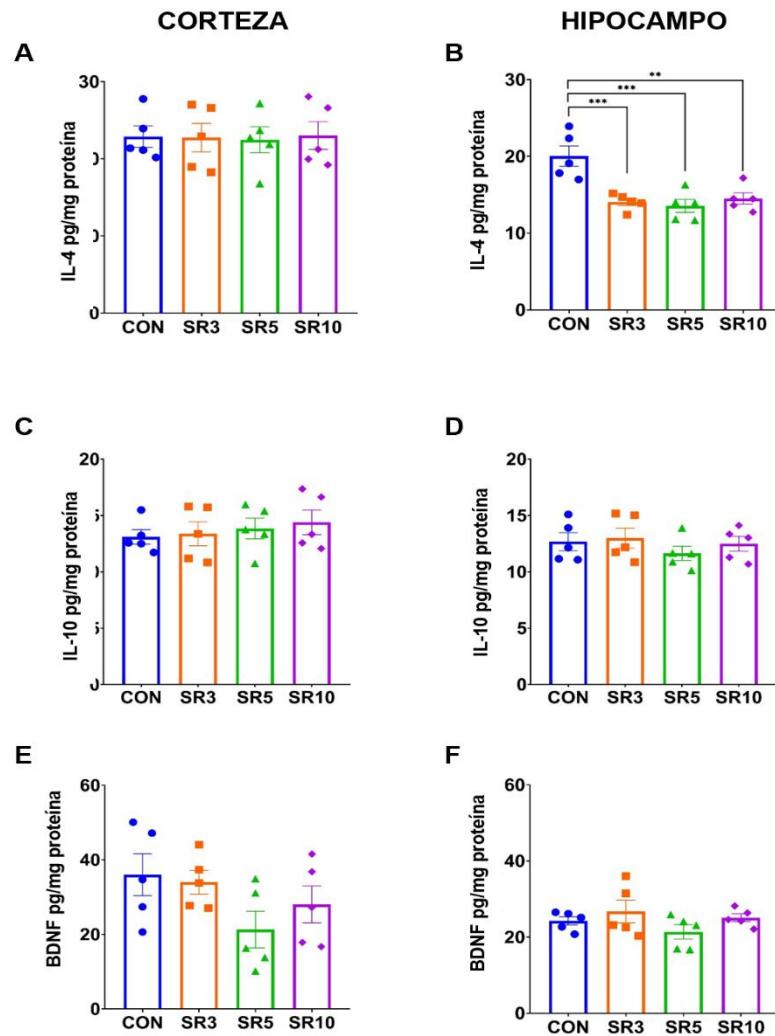


Fig. 13. La restricción de sueño modifica citocinas antiinflamatorias de forma diferencial. Las gráficas muestran los niveles de citocinas antiinflamatorias IL-4 (A-B), IL-10 (C-D) y BDNF (E-F) en corteza cerebral (Izquierda) e hipocampo (derecha) de ratones restringidos de sueño 3 (SR3), 5 (SR5) o 10 (SR10) días comparados contra controles (CON). Los valores se expresan en pg/mg proteína. Media $\pm$ desviación estándar, n = 5 por grupo, *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001 comparado contra el CON.

únicamente en el hipocampo ($F_{3,16} = 11.18$, $p < 0.0003$, **Fig. 13B**) desde los 3 días de restricción de sueño, niveles que se mantuvieron hasta los 10 días de restricción de sueño. No encontramos cambios en IL-10 ni en BDNF.

9.4 La restricción crónica de sueño induce senescencia celular en el sistema nervioso central de animales jóvenes.

La senescencia celular puede ser inducida en respuesta a ambientes inflamatorios, en donde el estrés oxidativo incrementa (López-Teros et al., 2022). Teniendo en cuenta que la restricción de sueño promueve este tipo de ambiente, evaluamos si la restricción de sueño puede favorecer este fenómeno en el SNC. Determinamos dos proteínas que se usan como marcadores de senescencia celular, la enzima β -galactosidasa (β -gal) y la proteína p21. Observamos que los niveles de β -gal incrementan después de 10 días de restricción de sueño en ambas regiones, corteza ($F_{3,20} = 4.798$, $p = 0.0112$, **Fig. 14A**) e hipocampo ($F_{3,16} = 5.292$, $p = 0.0100$, **Fig. 14B**). Mientras que la proteína p21 incrementa en el grupo SR10 en la corteza ($F_{3,20} = 3.398$, $p = 0.0379$, **Fig. 14C**) y desde los 5 días de restricción de sueño en el hipocampo ($F_{3,19} = 10.48$, $p = 0.0003$, **Fig. 14D**) manteniendo los niveles elevados a los 10 días.

Además de los niveles en el contenido proteico, se llevaron a cabo ensayos de la actividad de la enzima β -gal, mediante el reactivo X-gal (SA- β -gal), en cerebros de animales restringidos de sueño durante 10 días, quienes presentaron niveles elevados en ambas regiones cerebrales. Se evaluó la actividad de la enzima en cortes

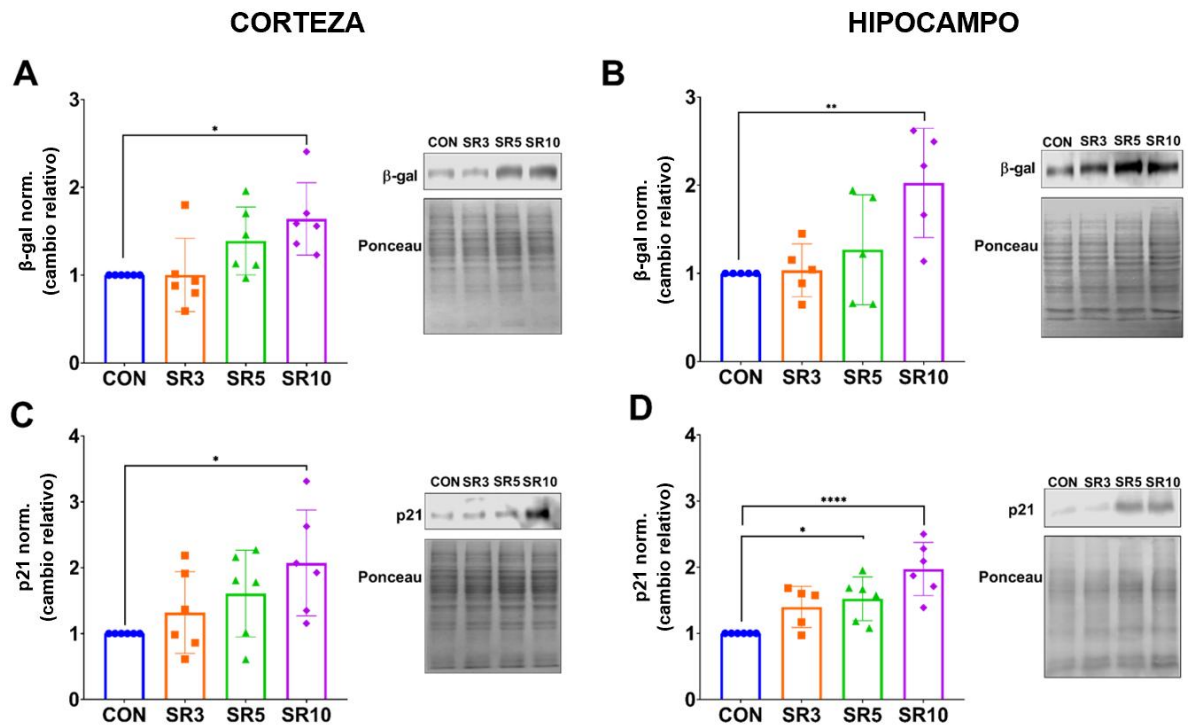


Fig. 14. La restricción crónica de sueño induce senescencia celular en el sistema nervioso central. Se muestran los niveles de los marcadores de senescencia β-galactosidasa y p21 en corteza cerebral (A, C) e hipocampo (B, D), en los grupos de control (CON), restringidos de sueño 3 (SR3), 5 (SR5) o 10 días (SR10). Se muestran blots representativos en E (n=6). Media ± SEM. n=5-6 por grupo, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado contra el grupo CON.

cerebrales, que incluían las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, así como de la corteza cerebral. La actividad de la enzima es evidenciada por la coloración azul, es decir, a mayor intensidad, mayor actividad. Observamos que los cortes cerebrales de los ratones SR10 presentaban mayor actividad enzimática en comparación con el grupo CON, lo cual, sugiere que existe mayor senescencia (**Fig. 15**).

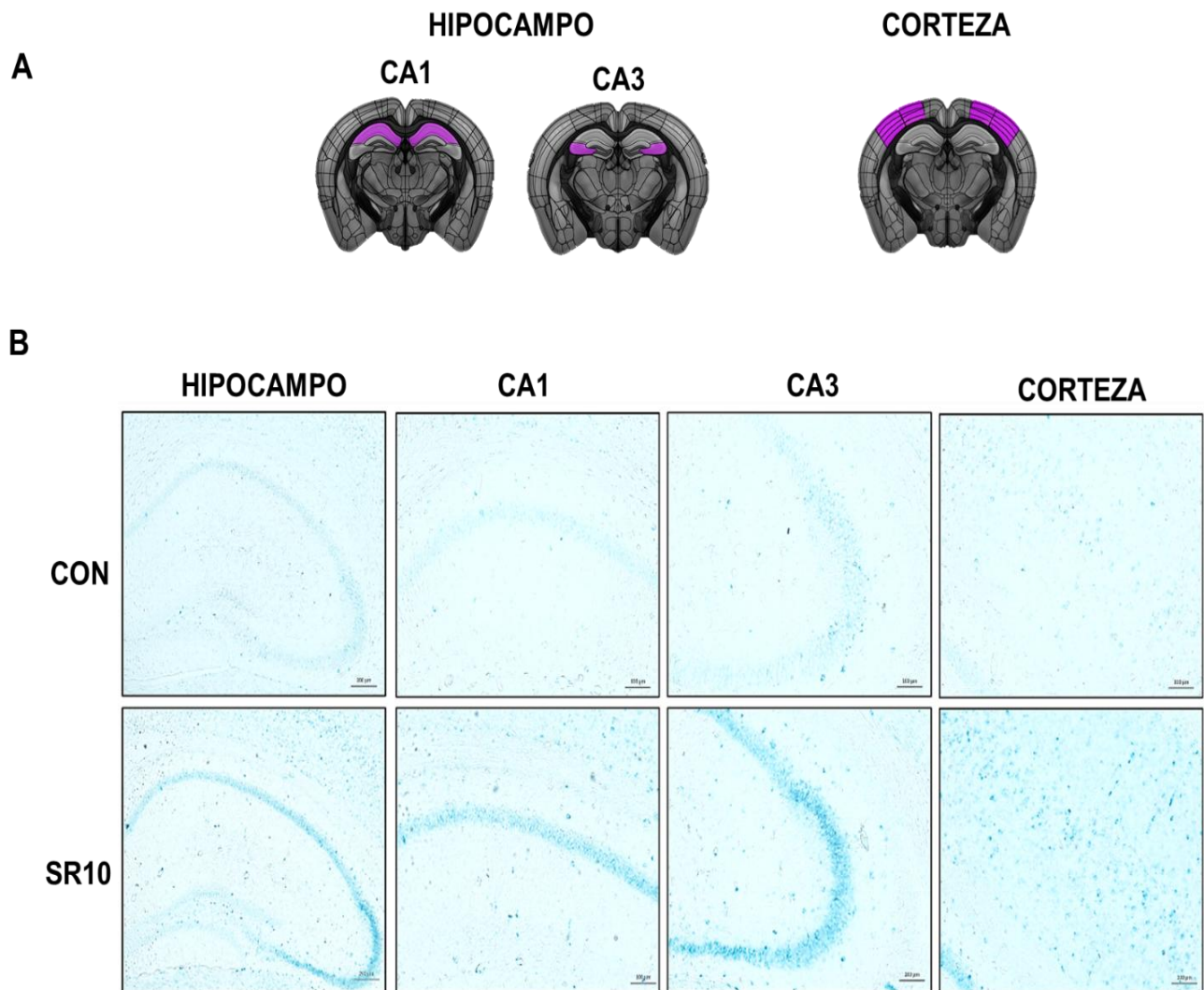


Fig.15 | Ensayos de la actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal) después de 10 días de restricción crónica de sueño. A) Esquemas de las regiones cerebrales en las que se evaluó la actividad de β-galactosidasa, SA-β-gal. B) Micrografías representativas de los ensayos de actividad de SA-β-gal (azul) en las regiones hipocampales CA1 y CA3, así como en la corteza cerebral de cerebros de animales controles (CON) y restringidos de sueño 10 días (SR10).

10. DISCUSIÓN

El sueño es una actividad fundamental en los animales, formando parte de un reloj interno a través del cual se regulan múltiples funciones en los organismos. El sueño contribuye con la regulación de diversos procesos fisiológicos, que incluye procesos de memoria, aprendizaje, salud mental, homeostasis metabólica, entre otros (Zhai et al., 2023; Kincheski et al., 2017; Li et al., 2023; Baranwalet al., 2023). Sin embargo, actualmente se ha reportado la pérdida de sueño tanto en calidad como en cantidad, considerándolo, así como un problema de salud pública (Chattu et al., 2018). Más del 35% de la población adulta en México presenta problemas en la calidad de sueño (Arrona-Palacios y Gradisar, Michael, 2021). Además, aún se desconocen muchos de los mecanismos celulares y moleculares regulados por el sueño, incluyendo en el SNC.

Debido a ello, evaluamos cómo la restricción de sueño afecta la función celular en el cerebro, incluyendo el funcionamiento de la BHE, neuroinflamación y senescencia celular. Demostramos que la restricción crónica de sueño induce disfunción de la BHE, que se acompaña de neuroinflamación y que contribuye al proceso de senescencia celular, en las regiones cerebrales de corteza e hipocampo. Para lo cual utilizamos ratones macho de la cepa C57BL6, los cuales fueron restringidos de sueño durante 3,5 ó 10 días, así como los que tuvieron sueño normal (grupo control).

En este modelo observamos que la permeabilidad de la BHE incrementa desde los primeros días de restricción de sueño (Fig. 5), así como el decremento en proteínas de uniones estrechas (Fig. 6), seguido del incremento de GFAP, indicando reactividad

astroglial (Fig. 7). Estos cambios se presentan simultáneamente al incremento de citocinas proinflamatorias (Fig. 12), desencadenando al décimo día con niveles elevados de marcadores de senescencia (Fig. 14) en corteza e hipocampo.

Observamos que la restricción crónica de sueño induce cambios progresivos en la estructura y función de la BHE. Previamente, nuestro grupo de investigación reportó el incremento en la permeabilidad de la BHE después de 10 días de restricción de sueño (Gómez-González et al., 2013; Hurtado-Alvarado et al., 2017), sin embargo, aquí observamos que estos cambios se presentan desde los 3 días de restricción de sueño, en donde se observa el incremento de permeabilidad al azul de Evans a los 3 días de restricción de sueño en el hipocampo (Fig. 5B), lo cual correlaciona con la disminución de la Cldn-5 en el hipocampo del grupo SR3. Mientras que la corteza cerebral muestra incremento de la permeabilidad al azul de Evans después del quinto día de restricción sueño, al igual que la disminución de las proteínas Cldn-5 y ZO-1. La permeabilidad a Na-F incrementa en la corteza cerebral en el grupo SR10 (Fig. 5C) y en el hipocampo en el grupo SR5 (Fig. 5D).

Estos datos nos indican que la BHE se regula de forma distinta dependiendo de la región cerebral, siendo más susceptible el hipocampo y que la permeabilidad de la BHE se presenta de forma diferencial entre los trazadores utilizados, siendo más susceptible a azul de Evans que a Na-F. El azul de Evans es una molécula que tiene un peso molecular de 961 Da, al ser administrado periféricamente se une con albúmina sérica, creando una molécula con un peso de aproximadamente 69 kDa ,por lo que

además funciona como un método indirecto para evaluar la extravasación de albúmina hacia el parénquima cerebral. En el caso de la Na-F, ésta tiene un peso molecular de aproximadamente 370 Da (Ahishali & Kaya, 2021). A pesar de que el azul de Evans tiene un mayor peso molecular, puede ingresar antes que otros trazadores al parénquima cerebral (Wu et al., 2021), sin embargo, algunos estudios indican que la Na-F podría ingresar antes que el azul de Evans (Ahishali & Kaya, 2021). Considerando que la Na-F es una molécula con carga negativa, al igual que la membrana de la célula endotelial, podría considerarse necesaria la ausencia de proteínas de unión ocluyente para que pueda ingresar al parénquima cerebral a través de la vía paracelular (Ahishali and Kaya, 2021). Esto sugiere que la alteración de la BHE no depende primordialmente del tamaño molecular, sino de la vía y dinámica de extravasación, sugiriendo el ingreso de macromoléculas como la albúmina, alterando la homeostasis del SNC y con ello, contribuyendo a la generación de reactividad celular. Por otro lado, sería importante evaluar los mecanismos de expulsión del sodio en el contexto de la pérdida de sueño, ya que estos mecanismos podrían influir en el tiempo de la acumulación de Na-F en el parénquima cerebral.

Se ha reportado que los procesos neuroinflamatorios se acompañan de disfunción en la BHE, reflejado por el incremento de la permeabilidad lo cual se deriva de cambios en la estructura, particularmente la disminución en las proteínas de unión estrecha como son claudina-5, ocludina y zónula ocludens-1 (Hurtado-Alvarado et al, 2017). Se ha reportado que la pérdida de sueño promueve inflamación de bajo grado, que es

suficiente para generar cambios en la estructura y función de la BHE (Hurtado-Alvarado et al., 2017; Medina-Flores et al., 2020). Además, la mala calidad de sueño contribuye a exacerbar patologías como la enfermedad de Alzheimer (Verheggen et al., 2018) e incrementar marcadores asociados a la senescencia celular en adultos mayores en suero (Carroll et al., 2016).

Durante los procesos neuroinflamatorios se ha observado que las células gliales, tanto la microglía como la astrogía pueden generar diferentes respuestas. Los cambios en los astrocitos se conocen como astrogliosis, en donde se presenta incremento de GFAP derivado de la proliferación celular, así como del cambio en la morfología del astrocito en condiciones neuroinflamatorias (Escartin et al., 2021). Previamente se había reportado el incremento de GFAP en roedores restringidos de sueño durante 10 días en comparación con los controles, lo cual también se ha asociado a cambios en la funcionalidad de la BHE (Hurtado-Alvarado, et al., 2016). En este trabajo se observó un incremento en la astrogliosis, desde los 5 días de restricción de sueño, sugiriendo que la astrogliosis es uno de los eventos tempranos que podrían contribuir a la disminución de las proteínas de unión ocluyente observada en este trabajo.

Los astrocitos son reguladores clave de la BHE, gracias a los factores tróficos que liberan hacia las células endoteliales (Abbott et al., 2006). En modelos de inflamación aguda, como es el caso de enfermedades neurodegenerativas o procesos infecciosos, los astrocitos reactivos presentan un incremento en los niveles de GFAP. A pesar de que la restricción crónica de sueño promueve un estado inflamatorio de bajo grado

(Hurtado-Alvarado et al., 2016, 2018; Manchanda et al., 2018), hemos encontrado incrementados los niveles de GFAP desde los 5 días de restricción de sueño (Fig. 7), lo que indica que la reactividad glial inicia antes de lo reportado previamente (Hurtado-Alvarado et al., 2016).

En condiciones normales, los astrocitos son fundamentales para la homeostasis en el SNC (Liu et al., 2017). Sin embargo, los astrocitos reactivos pueden perder algunas de sus funciones (Clayton and Liddelow, 2025), por ejemplo, el suministro de factores tróficos que contribuyen con la estabilidad de la BHE, además contribuyen con la generación del microambiente inflamatorio, ya que son capaces de liberar moléculas que incluyen citocinas proinflamatorias, metaloproteinasas de matriz, y componentes del sistema de complemento, como la proteína C3 (Liddelow et al., 2017b; López-Teros et al., 2024; Ranaivo et al., 2012).

Los astrocitos reactivos pueden generar diferentes respuestas según el estímulo al que se enfrentan, sin embargo, se ha descrito que pueden contribuir con una respuesta neurotóxica, la cual involucra el incremento del componente C3 del sistema de complemento; por otro lado, en condiciones de bajo oxígeno como los modelos de hipoxia, incrementa la producción de la proteína S100a10, que se ha asociado con una respuesta neuroprotectora (Chang et al., 2023; Rodriguez-Callejas et al., 2025). Debido a esto decidimos evaluar ambas proteínas en el curso de la restricción de sueño.

Similar a lo que reporta Li y col. (2020), encontramos un incremento de la proteína C3 después de 5 y 10 días de restricción de sueño en corteza cerebral e hipocampo, respectivamente; mientras la proteína S100a10 se encuentra disminuida en el grupo SR10 en ambas regiones (Fig. 8). Li y col. (2020) encontraron que después de la exposición a un estímulo inductor de neuroinflamación, los niveles de C3 incrementaron, alcanzando su nivel máximo (en los puntos ahí evaluados) después de 7 días, mientras que la proteína S100a10 disminuyó (Li et al., 2020). Este tipo de fenómenos también ha sido reportado en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), así como infecciones por *Flavivirus* y en modelos de dolor crónico postquirúrgico en donde observa que mientras los marcadores de los astrocitos con respuesta neurotóxica incrementan, al igual que GFAP, las moléculas asociadas con la respuesta neuroprotectora, como la S100a10, disminuyen (King et al., 2020; Li et al., 2020).

Los niveles de C3 fueron evaluados inicialmente en tejido completo, por lo que para determinar si efectivamente se encontraban en los astrocitos, procedimos a evaluar la presencia de C3 en astrocitos usando GFAP y en microglía con Iba-1, mediante microscopía confocal, en las regiones CA1 (Fig. 9) y CA3 (Fig. 10) del hipocampo, así como en la corteza cerebral (Fig. 11). Encontramos que la marca de C3 se co-expresó en las células GFAP+, pero no en las Iba-1+, como reportó previamente Taylor y col. (2022). Además, la marca de C3 se observa cerca de los procesos microgliales. Esto podría sugerir que la proteína C3 podría estar interactuando con su receptor, C3aR en

la microglía (Litvinchuk et al., 2018). Esta interacción C3-C3aR puede presentarse con diversos tipos celulares, incluyendo microglía y células endoteliales, lo cual por un lado promueve la activación persistente de la microglía y a su vez, la neuroinflamación (Litvinchuk et al., 2018), y por otro, puede ser clave en la disfunción de la BHE. Se ha reportado en modelos *in vitro* (Taylor et al., 2022) e *in vivo*, que el incremento en C3 y su asociación con C3aR induce la activación endotelial, ya que C3 promueve la disminución en las proteínas de uniones estrechas e incrementa las moléculas de adhesión celular que favorecen la infiltración leucocitaria. Así mismo, la inhibición de esta vía promueve la restauración de la función de la BHE (Propson et al., 2021).

La activación de los astrocitos puede deberse al ambiente proinflamatorio generado por la restricción crónica de sueño. Se ha descrito que la microglía secreta una serie de moléculas que incluyen a TNF- α , IL-1 y la proteína C1q (Liddel et al., 2017). Estas proteínas están involucradas en la activación de los astrocitos mediante su interacción vía CXCR7, que subsecuentemente activa la vía PI3K/AKT (Li et al., 2020).

Se sabe que 10 días de restricción de sueño promueven el incremento de citocinas proinflamatorias a nivel sistémico, incluyendo a TNF- α e IFN- γ (Hurtado-Alvarado et al., 2018), es por ello que evaluamos un perfil pro-inflamatorio y un perfil anti-inflamatorio en la corteza y el hipocampo, a lo largo de la restricción de sueño. Encontramos un incremento en las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , e IL-1 β desde el tercer día de restricción de sueño (Fig. 12). Teniendo en cuenta que la reactividad astrogliar se observa desde el día 5 de la restricción de sueño, es posible que la

microglía se active a días más tempranos, promoviendo el incremento en estas citocinas pro-inflamatorias y la inducción de la reactividad astrogial (Liddelow et al., 2017). Por otro lado, también observamos que este proceso inflamatorio inicia a nivel de SNC, ya que al evaluar los niveles de IL-1 β a nivel sistémico (Fig. 12G), estos incrementaron únicamente en el grupo SR10. Además, la IL-6 también mostró incremento en el grupo SR10 en el hipocampo. La IL-6 es considerada una de las citocinas secundarias, que pudiera ser inducida por TNF- α e IL-1 β (Guisasola et al., 2018), lo cual podría explicar este resultado. En cuanto a las citocinas anti-inflamatorias, se observó una disminución en los niveles de la IL-4 en el hipocampo. Nuevamente el hipocampo muestra ser más susceptible en comparación con la corteza. Carroll et al., (2016) reportaron incremento en marcadores de senescencia a nivel sistémico con una noche de privación de sueño en pacientes mayores de 60 años (Carroll et al., 2016).

No obstante, no hay suficientes estudios que evalúen si la restricción crónica de sueño en edades tempranas es capaz de inducir senescencia a nivel de SNC. Nuestros datos muestran como factor común que después de 10 días de restricción de sueño, a nivel de SNC incrementan las citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Fig. 12), moléculas que forman parte del SASP, que es uno de los marcadores clave de la senescencia celular. Debido a la heterogeneidad del fenómeno de la senescencia celular y para asegurarnos de que estaba presente en nuestros modelos experimentales evaluamos 2 marcadores más de senescencia celular a lo largo de la restricción de sueño. Incluimos un marcador

lisosomal, la enzima β -galactosidasa (β -gal) y el inhibidor del ciclo celular, la proteína p21 (Suryadevara et al., 2024). Encontramos un incremento de p21 desde los 5 días de restricción de sueño en el hipocampo (Fig. 14D). En ambas regiones cerebrales los niveles incrementaron a los 10 días de restricción de sueño (Fig. 15). Por lo tanto, además de los niveles de β -gal, evaluamos la actividad de la enzima en el grupo CON y SR10. En las imágenes representativas, se observa mayor actividad de la enzima β -galactosidasa, confirmando la senescencia inducida por la restricción de sueño.

Similar a otros de los procesos aquí evaluados, observamos que el hipocampo parece ser más susceptible que la corteza cerebral en cuanto a la inducción de la senescencia celular, en condiciones de restricción de sueño. Además de presentar niveles elevados de p21 de forma más temprana que la corteza, se observaron diferencias regionales en la regulación de la BHE, así como en los niveles de claudina-5, e IL-1 β , además de las alteraciones que se observaron únicamente en el hipocampo como el incremento en IL-6 y la disminución de IL-4.

En el contexto de la BHE, se ha descrito que algunas regiones cerebrales reestablecen su función con periodos cortos de recuperación de sueño, sin embargo, el hipocampo no es una estas regiones, lo que sugiere que requiere de tiempos prolongados para reestablecer su función (Gómez-González et al., 2013). Es posible que la reactividad microglial temprana tenga un papel importante, ya que, en comparación con otras regiones cerebrales, el hipocampo presenta una mayor tasa proliferativa, lo cual se podría asociar con una alta densidad y por lo tanto una rápida respuesta a estímulos,

como la restricción crónica de sueño, contribuyendo a mantener el ambiente inflamatorio y con ello, reactividad astrogliar (Tan et al., 2020). Respecto a la densidad de astrocitos, algunos estudios señalan que hay una mayor densidad de astrocitos en hipocampo en comparación con la corteza cerebral (Grosche et al., 2013; Olude et al., 2015). Sin embargo, esto depende de las subregiones evaluadas en cada estructura, así como de los marcadores astrocíticos empleados (Forrest et al., 2023). También se ha reportado que los astrocitos forman redes, las cuales presentan una mayor conectividad funcional en el hipocampo que en la corteza (Zonca et al., 2025). Cabe la posibilidad de que esta alta conectividad funcional de las redes astrocíticas en el hipocampo facilite la propagación de la reactividad entre astrocitos, contribuyendo a mantener el microambiente inflamatorio en esta región. Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar esta hipótesis.

Dado que la senescencia celular y la inflamación pueden ser eventos que comparten moléculas, es complicado discernir entre ambos procesos, Suryadevara et al., (2024) recomiendan evaluar al menos 3 marcadores de senescencia. Es por ello que en este trabajo incluimos 5 marcadores.

En las células senescentes, la capacidad replicativa queda comprometida, resultando en el arresto de ciclo celular, cambios en la expresión génica, así como la generación del SASP (Vitorelli & Passos, 2017). Algunos estudios han demostrado que la restricción de sueño puede promover el acortamiento de telómeros en células periféricas, como leucocitos (Sabot et al., 2023; Zhang et al., 2019). Por otro lado,

algunos de los inductores de senescencia celular pueden ser el daño al DNA, las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ben-Porath & Weinberg, 2004), las citocinas proinflamatorias como el TNF- α , los cuales también incrementan con la pérdida de sueño (Alzoubi et al., 2012; Homann et al., 2022; Mir et al., 2025; Vaccaro et al., 2020), lo cual genera un ambiente que favorece la senescencia celular. En condiciones fisiológicas los astrocitos son la mayor fuente de glutatión (Chen et al., 2020), es posible que al volverse reactivos disminuyan su actividad antioxidante, contribuyendo con el daño hacia la BHE.

Nuestros datos sugieren que la senescencia celular podría ser producto de la suma del incremento en las citocinas proinflamatorias que inicia desde el día 3 de la restricción de sueño, más la reactividad astrogliar, contribuyendo a mantener la disfunción de la BHE. Se ha reportado que tanto la enzima β -galactosidasa como p21 pueden presentarse en astrocitos senescentes (Lazic et al., 2022; López-Teros et al., 2022). Sin embargo, aquí se evaluaron la corteza y el hipocampo completos, por lo que se requieren más estudios para determinar qué tipo de células en el SNC presentan senescencia celular en consecuencia a la restricción de sueño.

Adicionalmente a las alteraciones inducidas por la restricción crónica de sueño aquí mostradas, la mala calidad de sueño se ha visto relacionada con la enfermedad de Alzheimer (Vasciaveo et al., 2023; Verheggen et al., 2018), lo cual por una parte se debe a que el sistema glinfático se ve comprometido, permitiendo la acumulación de desechos celulares y metabolitos en el parénquima cerebral (Hablitz et al., 2020;

Reddy & van der Werf, 2020; Vasciaveo et al., 2023; Rainey-Smith et al., 2018). Los resultados de este trabajo muestran que la restricción crónica de sueño, incluso en modelos jóvenes puede inducir procesos de senescencia celular en el cerebro, lo cual puede ser un clave para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas de forma prematura.

11. CONCLUSIÓN

Nuestros hallazgos demuestran cómo la restricción crónica de sueño puede generar alteraciones progresivas en el SNC, impactando en función de BHE, de astrocitos y promoviendo procesos de senescencia en un modelo murino de adultos jóvenes, acompañado de procesos inflamatorios locales en SNC, en los cuales, los astrocitos reactivos tienen una participación importante que inicia desde los primeros días de restricción de sueño. Aunado a que este conjunto de cambios neurológicos induce procesos de senescencia celular en el SNC. Este es el primer trabajo en donde se demuestra que la restricción crónica de sueño induce senescencia celular a nivel de SNC en animales jóvenes. Sin embargo, se requieren más estudios que contribuyan a dilucidar los mecanismos involucrados, así como los efectos a largo plazo que puede ocasionar la restricción crónica de sueño.

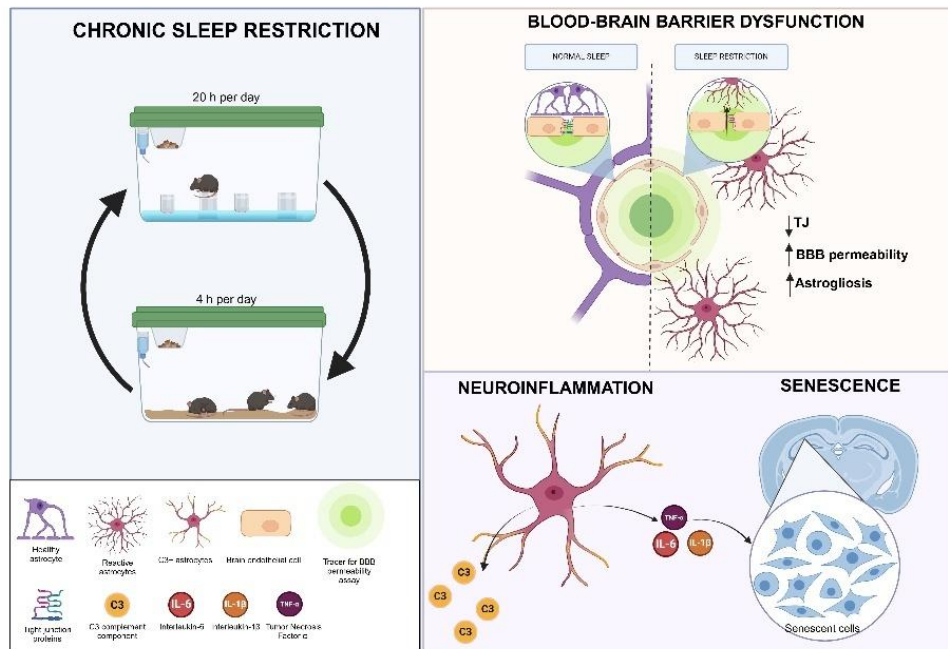


Fig. 16 | Alteraciones en el sistema nervioso central derivadas de la restricción crónica de sueño. Avilez-Aviles et al., 2025.

12. PERSPECTIVAS

- Evaluar los cambios morfológicos de los astrocitos en los diferentes puntos de la restricción de sueño evaluados.
- Evaluar los cambios microgliales dentro de los 3 días de restricción de sueño, para determinar si son iniciadores del proceso inflamatorio.
- Determinar los tipos de células a nivel de SNC que se vuelven senescentes, en consecuencia, de la restricción crónica de sueño.

13. REFERENCIAS

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Ahishali, B., & Kaya, M. (2021). Evaluation of Blood-Brain Barrier Integrity Using Vascular Permeability Markers: Evans Blue, Sodium Fluorescein, Albumin-Alexa Fluor Conjugates, and Horseradish Peroxidase. In K. Turksen (Ed.), *Permeability Barrier: Methods and Protocols* (pp. 87–103). Springer US. https://doi.org/10.1007/7651_2020_316
- Alvarez, J. I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P. J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, L., Bernard, M., van Horssen, J., de Vries, H. E., Charron, F., & Prat, A. (2011). The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science (New York, N. Y.)*, 334(6063), 1727–1731. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>
- Alzoubi, K. H., Khabour, O. F., Rashid, B. A., Damaj, I. M., & Salah, H. A. (2012). The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: The role of oxidative stress. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.017>
- Avilez-Avilez, J. J., Medina-Flores, M. F., & Gómez-Gonzalez, B. (2024). Sleep loss impairs blood-brain barrier function: Cellular and molecular mechanisms. *Vitamins and Hormones*, 126, 77–96. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2024.02.003>
- Bakeche, A., Djouini, A., Nouacer, M., Chebbah, F., Manseur, A., Retem, C., Bairi, A., & Tahraoui, A. (2021). Activity and rest alternation: Temporal distribution and influencing factors in nocturnal rodents. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, 9(3), 2126–2126. <https://doi.org/10.31893/jabb.21026>
- Bellesi, M., de Vivo, L., Chini, M., Gilli, F., Tononi, G., & Cirelli, C. (2017). Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(21), 5263–5273. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3981-16.2017>
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2004). When cells get stressed: An integrative view of cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(1), 8–13. <https://doi.org/10.1172/JCI20663>
- Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: Many therapeutic avenues. *Genes & Development*, 34(23–24), 1565–1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>
- Cabezas, R., Ávila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R. S., Báez, E., García-Segura, L. M., Jurado Coronel, J. C., Capani, F., Cardona-Gomez, G. P., & Barreto, G. E. (2014). Astrocytic modulation of blood

- brain barrier: Perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00211>
- Carroll, J. E., Cole, S. W., Seeman, T. E., Breen, E. C., Witarama, T., Arevalo, J. M. G., Ma, J., & Irwin, M. R. (2016). Partial sleep deprivation activates the DNA damage response (DDR) and the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in aged adult humans. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.024>
- Carroll, J. E., & Prather, A. A. (2021). Sleep and Biological Aging: A Short Review. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 18, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.03.021>
- Carskadon, M. A., & Dement, W. C. (2017). Chapter 2 - Normal Human Sleep: An Overview. In M. Kryger, T. Roth, & W. C. Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine (Sixth Edition)* (pp. 15-24.e3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24288-2.00002-7>
- Chang, J., Qian, Z., Wang, B., Cao, J., Zhang, S., Jiang, F., Kong, R., Yu, X., Cao, X., Yang, L., & Chen, H. (2023). Transplantation of A2 type astrocytes promotes neural repair and remyelination after spinal cord injury. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-01036-6>
- Chaput, J.-P., Dutil, C., Featherstone, R., Ross, R., Giangregorio, L., Saunders, T. J., Janssen, I., Poitras, V. J., Kho, M. E., Ross-White, A., Zankar, S., & Carrier, J. (2020). Sleep timing, sleep consistency, and health in adults: A systematic review. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, 45(10 (Suppl. 2)), S232–S247. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0032>
- Chattu, V. K., Manzar, Md. D., Kumary, S., Burman, D., Spence, D. W., & Pandi-Perumal, S. R. (2018). The Global Problem of Insufficient Sleep and Its Serious Public Health Implications. *Healthcare*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/healthcare7010001>
- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., Xu, J., Guo, G., Tong, A., & Zhou, L. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Proliferation*, 53(3), e12781. <https://doi.org/10.1111/cpr.12781>
- Chokroverty, S. (2017). Overview of Normal Sleep. In S. Chokroverty (Ed.), *Sleep Disorders Medicine: Basic Science, Technical Considerations and Clinical Aspects* (pp. 5–27). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6578-6_2
- Christensen, M. A., Bettencourt, L., Kaye, L., Moturu, S. T., Nguyen, K. T., Olgin, J. E., Pletcher, M. J., & Marcus, G. M. (2016). Direct Measurements of Smartphone Screen-Time: Relationships with Demographics and Sleep. *PloS One*, 11(11), e0165331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165331>

- Chu, C., Holst, S. C., Elmenhorst, E.-M., Foerges, A. L., Li, C., Lange, D., Hennecke, E., Baur, D. M., Beer, S., Hoffstaedter, F., Knudsen, G. M., Aeschbach, D., Bauer, A., Landolt, H.-P., & Elmenhorst, D. (2023). Total Sleep Deprivation Increases Brain Age Prediction Reversibly in Multisite Samples of Young Healthy Adults. *Journal of Neuroscience*, 43(12), 2168–2177. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0790-22.2023>
- Clayton, B. L. L., & Liddel, S. A. (2025). Heterogeneity of Astrocyte Reactivity. *Annual Review of Neuroscience*, 48(1), 231–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112723-031738>
- Colavito, V., Fabene, P. F., Grassi Zucconi, G., Pifferi, F., Lamberty, Y., Bentivoglio, M., & Bertini, G. (2013). Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00106>
- Egebjerg, C., Kolmos, M. G., Lemcke, R., Abelson, K., & Kornum, B. R. (2025). Introduction of novel objects to the home cage of mice repeatedly disturbs sleep for seven days with minimal stress induction. *Npj Biological Timing and Sleep*, 2(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s44323-025-00027-3>
- Engert, L. C., & Besedovsky, L. (2025). Sleep and inflammation: A bidirectional relationship. *Somnologie*, 29(1), 3–9. <https://doi.org/10.1007/s11818-025-00495-6>
- Erlacher, D. (2024). Insights into Sleep Research. In D. Erlacher (Ed.), *Sport and Sleep: Applied Sleep Research for Sports Science* (pp. 13–27). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-68754-3_2
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O’Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Fan, X., & Agid, Y. (2018). At the Origin of the History of Glia. *Neuroscience*, 385, 255–271. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.05.050>
- Forrest, S. L., Kim, J. H., Crockford, D. R., Huynh, K., Cheong, R., Knott, S., Kane, M. A., Ittner, L. M., Halliday, G. M., & Kril, J. J. (2023). Distribution Patterns of Astrocyte Populations in the Human Cortex. *Neurochemical Research*, 48(4), 1222–1232. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03700-2>
- Genzel, L., Kroes, M. C., Dresler, M., & Battaglia, F. P. (2014). Light sleep versus slow wave sleep in memory consolidation: a question of global versus local processes?. *Trends in neurosciences*, 37(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.002>

- Gomez-Arboledas, A., Acharya, M. M., & Tenner, A. J. (2021). The Role of Complement in Synaptic Pruning and Neurodegeneration. *ImmunoTargets and Therapy*, 10, 373–386. <https://doi.org/10.2147/ITT.S305420>
- Gómez-González, B., Hurtado-Alvarado, G., Esqueda-León, E., Santana-Miranda, R., Rojas-Zamorano, J. Á., & Velázquez-Moctezuma, J. (2013). REM sleep loss and recovery regulates blood-brain barrier function. *Current Neurovascular Research*, 10(3), 197–207. <https://doi.org/10.2174/15672026113109990002>
- Guisasola, M. C., Alonso, B., Bravo, B., Vaquero, J., & Chana, F. (2018). An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients. *Cell Stress & Chaperones*, 23(4), 483–489. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0859-9>
- Grosche, A., Grosche, J., Tackenberg, M., Scheller, D., Gerstner, G., Gumprecht, A., Pannicke, T., Hirrlinger, P. G., Wilhelmsson, U., Hüttmann, K., Härtig, W., Steinhäuser, C., Pekny, M., & Reichenbach, A. (2013). Versatile and Simple Approach to Determine Astrocyte Territories in Mouse Neocortex and Hippocampus. *PLOS ONE*, 8(7), e69143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069143>
- Hablitz, L. M., Plá, V., Giannetto, M., Vinitzky, H. S., Stæger, F. F., Metcalfe, T., Nguyen, R., Benrais, A., & Nedergaard, M. (2020). Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. *Nature Communications*, 11(1), 4411. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18115-2>
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Han, R. T., Kim, R. D., Molofsky, A. V., & Liddelow, S. A. (2021). Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity*, 54(2), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.013>
- Hashimoto, Y., & Campbell, M. (2020). Tight junction modulation at the blood-brain barrier: Current and future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(9), 183298. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183298>
- He, J., Hsueh, H., He, Y., Kastin, A. J., Wang, Y., & Pan, W. (2014). Sleep restriction impairs blood-brain barrier function. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(44), 14697–14706. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2111-14.2014>
- Hirshkowitz, M., Whiton, K., Albert, S. M., Alessi, C., Bruni, O., DonCarlos, L., Hazen, N., Herman, J., Katz, E. S., Kheirandish-Gozal, L., Neubauer, D. N., O'Donnell, A. E., Ohayon, M., Peever, J., Rawding, R., Sachdeva, R. C., Setters, B., Vitiello, M. V., Ware, J. C., & Adams Hillard, P. J.

- (2015). National Sleep Foundation's sleep time duration recommendations: Methodology and results summary. *Sleep Health*, 1(1), 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.sleh.2014.12.010>
- Holth, J. K., Fritschi, S. K., Wang, C., Pedersen, N. P., Cirrito, J. R., Mahan, T. E., Finn, M. B., Manis, M., Geerling, J. C., Fuller, P. M., Lucey, B. P., & Holtzman, D. M. (2019). The sleep-wake cycle regulates brain interstitial fluid tau in mice and CSF tau in humans. *Science*, 363(6429), 880–884. <https://doi.org/10.1126/science.aav2546>
- Homann, L., Rentschler, M., Brenner, E., Böhm, K., Röcken, M., & Wieder, T. (2022). IFN- γ and TNF Induce Senescence and a Distinct Senescence-Associated Secretory Phenotype in Melanoma. *Cells*, 11(9), 1514. <https://doi.org/10.3390/cells11091514>
- Hurtado-Alvarado, G., Becerril-Villanueva, E., Contis-Montes de Oca, A., Domínguez-Salazar, E., Salinas-Jazmín, N., Pérez-Tapia, S. M., Pavon, L., Velázquez-Moctezuma, J., & Gómez-González, B. (2018). The yin/yang of inflammatory status: Blood-brain barrier regulation during sleep. *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.009>
- Hurtado-Alvarado, G., Domínguez-Salazar, E., Pavon, L., Velázquez-Moctezuma, J., & Gómez-González, B. (2016). Blood-Brain Barrier Disruption Induced by Chronic Sleep Loss: Low-Grade Inflammation May Be the Link. *Journal of Immunology Research*, 2016, 4576012. <https://doi.org/10.1155/2016/4576012>
- Irwin, M. R., & Vitiello, M. V. (2019). Implications of sleep disturbance and inflammation for Alzheimer's disease dementia. *The Lancet. Neurology*, 18(3), 296–306. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30450-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30450-2)
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, 40(12), 2583–2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*, 11(9), 1361. <https://doi.org/10.3390/biom11091361>
- Kim, S., Jung, U. J., & Kim, S. R. (2025). The Crucial Role of the Blood–Brain Barrier in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms of Disruption and Therapeutic Implications. *Journal of Clinical Medicine*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jcm14020386>
- King, A., Szekely, B., Calapkulu, E., Ali, H., Rios, F., Jones, S., & Troakes, C. (2020). The Increased Densities, But Different Distributions, of Both C3 and S100A10 Immunopositive Astrocyte-Like Cells in Alzheimer's Disease Brains Suggest Possible Roles for Both A1 and A2 Astrocytes in the Disease Pathogenesis. *Brain Sciences*, 10(8), E503. <https://doi.org/10.3390/brainsci10080503>

- Krueger, J. M., Frank, M. G., Wisor, J. P., & Roy, S. (2016). Sleep function: Toward elucidating an enigma. *Sleep Medicine Reviews*, 28, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2015.08.005>
- Langen, U. H., Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35(1), 591–613. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062608>
- Lazic, A., Balint, V., Stanisavljevic Ninkovic, D., Peric, M., & Stevanovic, M. (2022). Reactive and Senescent Astroglial Phenotypes as Hallmarks of Brain Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms23094995>
- Leger, D., Ferini-Strambi, L., Han, F., Poyares, D., Uchiyama, M., & Zee, P. C. (2024). Novel perspective of ‘poor sleep’ in public health: A narrative review. *BMJ Public Health*, 2(2). <https://doi.org/10.1136/bmjph-2024-000952>
- Li, T., Liu, T., Chen, X., Li, L., Feng, M., Zhang, Y., Wan, L., Zhang, C., & Yao, W. (2020). Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01891-5>
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017a). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017b). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), Article 7638. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lim, D. C., Najafi, A., Afifi, L., Bassetti, C. L., Buysse, D. J., Han, F., Högl, B., Melaku, Y. A., Morin, C. M., Pack, A. I., Poyares, D., Somers, V. K., Eastwood, P. R., Zee, P. C., Jackson, C. L., & World Sleep Society Global Sleep Health Taskforce. (2023). The need to promote sleep health in public health agendas across the globe. *The Lancet. Public Health*, 8(10), e820–e826. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(23\)00182-2](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(23)00182-2)
- Litvinchuk, A., Wan, Y.-W., Swartzlander, D. B., Chen, F., Cole, A., Propson, N. E., Wang, Q., Zhang, B., Liu, Z., & Zheng, H. (2018). Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer’s Disease. *Neuron*, 100(6), 1337–1353.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.031>

- Liu, B., Teschemacher, A. G., & Kasparov, S. (2017). Neuroprotective potential of astroglia. *Journal of Neuroscience Research*, 95(11), 2126–2139. <https://doi.org/10.1002/jnr.24140>
- López-Teros, M., Alarcón-Aguilar, A., Castillo-Aragón, A., Königsberg, M., & Luna-López, A. (2024). Cytokine profiling in senescent and reactive astrocytes: A systematic review. *Neurobiology of Aging*, 138, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2024.02.012>
- López-Teros, M., Alarcón-Aguilar, A., López-Diazguerrero, N. E., Luna-López, A., & Königsberg, M. (2022). Contribution of senescent and reactive astrocytes on central nervous system inflammaging. *Biogerontology*, 23(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s10522-022-09952-3>
- Lu, H., Xie, Y., Tran, L., Lan, J., Yang, Y., Murugan, N. L., Wang, R., Wang, Y. J., & Semenza, G. L. (2020). Chemotherapy-induced S100A10 recruits KDM6A to facilitate OCT4-mediated breast cancer stemness. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(9), 4607–4623. <https://doi.org/10.1172/JCI138577>
- Manchanda, S., Singh, H., Kaur, T., & Kaur, G. (2018). Low-grade neuroinflammation due to chronic sleep deprivation results in anxiety and learning and memory impairments. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 449(1–2), 63–72. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3343-7>
- Manu, D. R., Slevin, M., Barcutean, L., Forro, T., Boghitoiu, T., & Balasa, R. (2023). Astrocyte Involvement in Blood–Brain Barrier Function: A Critical Update Highlighting Novel, Complex, Neurovascular Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17146. <https://doi.org/10.3390/ijms242417146>
- McKenna, J. T., Zielinski, M. R., & McCarley, R. W. (2017). Neurobiology of REM Sleep, NREM Sleep Homeostasis, and Gamma Band Oscillations. In S. Chokroverty (Ed.), *Sleep Disorders Medicine: Basic Science, Technical Considerations and Clinical Aspects* (pp. 55–77). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6578-6_5
- McKillop, L. E., & Vyazovskiy, V. V. (2020). Sleep and ageing: From human studies to rodent models. *Current Opinion in Physiology*, 15, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.03.004>
- Medina-Flores, F., Hurtado-Alvarado, G., Contis-Montes de Oca, A., López-Cervantes, S. P., Königsberg, M., Deli, M. A., & Gómez-González, B. (2020). Sleep loss disrupts pericyte-brain endothelial cell interactions impairing blood-brain barrier function. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.077>
- Medina-Flores, F., Hurtado-Alvarado, G., Deli, M. A., & Gómez-González, B. (2023). The Active Role of Pericytes During Neuroinflammation in the Adult Brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(2), 525–541. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01208-5>

- Michinaga, S., & Koyama, Y. (2019). Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 571. <https://doi.org/10.3390/ijms20030571>
- Mir, F. A., Lark, A. R. S., & Nehs, C. J. (2025). Unraveling the interplay between sleep, redox metabolism, and aging: Implications for brain health and longevity. *Frontiers in Aging*, 6. <https://doi.org/10.3389/fragi.2025.1605070>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Okechukwu, C. E. (2022). The neurophysiologic basis of the human sleep–wake cycle and the physiopathology of the circadian clock: A narrative review. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 58(1), 34.
- Olude, M. A., Mustapha, O. A., Aderounmu, O. A., Olopade, J. O., & Ihunwo, A. O. (2015). Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Cricetomys gambianus*). *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00067>
- Park, S. W., Nhu, L. H., Cho, H. Y., Seo, M. K., Lee, C. H., Ly, N. N., Choi, C. M., Lee, B. J., Kim, G.-M., Seol, W., Lee, J. G., & Kim, Y. H. (2016). P11 mediates the BDNF-protective effects in dendritic outgrowth and spine formation in B27-deprived primary hippocampal cells. *Journal of Affective Disorders*, 196, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.02.010>
- Pekna, M., & Pekny, M. (2021). The Complement System: A Powerful Modulator and Effector of Astrocyte Function in the Healthy and Diseased Central Nervous System. *Cells*, 10(7), 1812. <https://doi.org/10.3390/cells10071812>
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427–434. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Preininger, M. K., & Kaufer, D. (2022). Blood–Brain Barrier Dysfunction and Astrocyte Senescence as Reciprocal Drivers of Neuropathology in Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms23116217>
- Propson, N. E., Roy, E. R., Litvinchuk, A., Köhl, J., & Zheng, H. (2021). Endothelial C3a receptor mediates vascular inflammation and blood-brain barrier permeability during aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(1), e140966, 140966. <https://doi.org/10.1172/JCI140966>
- Ranaivo, H. R., Hodge, J. N., Choi, N., & Wainwright, M. S. (2012). Albumin induces upregulation of matrix metalloproteinase-9 in astrocytes via MAPK and reactive oxygen species-dependent pathways. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-68>

- Raven, F., Meerlo, P., Van der Zee, E. A., Abel, T., & Havekes, R. (2019). A brief period of sleep deprivation causes spine loss in the dentate gyrus of mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 160, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.03.018>
- Reddy, O. C., & van der Werf, Y. D. (2020). The Sleeping Brain: Harnessing the Power of the Glymphatic System through Lifestyle Choices. *Brain Sciences*, 10(11), 868. <https://doi.org/10.3390/brainsci10110868>
- Reynolds, A. C., & Banks, S. (2010). Total sleep deprivation, chronic sleep restriction and sleep disruption. *Progress in Brain Research*, 185, 91–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53702-7.00006-3>
- Rodriguez-Callejas, J. de D., Irene-Fierro, M., Aguilar-Navarro, S. G., Fuchs, E., & Perez-Cruz, C. (2025). Astroglial morphological alterations associated with loss of nuclear S100A10 in the hippocampus of male tree shrews during aging. *Glial Health Research*, 2, 100008. <https://doi.org/10.1016/j.ghres.2025.100008>
- Sabot, D., Lovegrove, R., & Stapleton, P. (2023). The association between sleep quality and telomere length: A systematic literature review. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 28, 100577. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2022.100577>
- Schmitt, L. I., Sims, R. E., Dale, N., & Haydon, P. G. (2012). Wakefulness affects synaptic and network activity by increasing extracellular astrocyte-derived adenosine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(13), 4417–4425. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5689-11.2012>
- Semyachkina-Glushkovskaya, O., Postnov, D., Penzel, T., & Kurths, J. (2020). Sleep as a Novel Biomarker and a Promising Therapeutic Target for Cerebral Small Vessel Disease: A Review Focusing on Alzheimer's Disease and the Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6293. <https://doi.org/10.3390/ijms21176293>
- Siegel, J. M. (2023). REM sleep function: Mythology vs. reality. *Revue Neurologique*, 179(7), 643–648. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2023.08.002>
- Suryadevara, V., Hudgins, A. D., Rajesh, A., Pappalardo, A., Karpova, A., Dey, A. K., Hertz, A., Agudelo, A., Rocha, A., Soygur, B., Schilling, B., Carver, C. M., Aguayo-Mazzucato, C., Baker, D. J., Bernlohr, D. A., Jurk, D., Mangarova, D. B., Quardokus, E. M., Enninga, E. A. L., ... Neretti, N. (2024). SenNet recommendations for detecting senescent cells in different tissues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(12), 1001–1023. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00738-8>
- Taylor, X., Cisternas, P., Jury, N., Martinez, P., Huang, X., You, Y., Redding-Ochoa, J., Vidal, R., Zhang, J., Troncoso, J., & Lasagna-Reeves, C. A. (2022). Activated endothelial cells induce a distinct

- type of astrocytic reactivity. *Communications Biology*, 5(1), 282. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03237-8>
- Timonina, D., Hormazabal, G. V., Heckenbach, I., Anderton, E., Haky, L., Floro, A., Riley, R., Kwok, R., Breslin, S., Ingle, H., Tiwari, R., Bielska, O., Scheibye-Knudsen, M., Kasler, H., Campisi, J., Walter, M., & Verdin, E. (2023). *Chronically disrupted sleep induces senescence in the visceral adipose tissue of C57BL/6 mice* (p. 2023.10.17.562803). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.10.17.562803>
- Vaccaro, A., Kaplan Dor, Y., Nambara, K., Pollina, E. A., Lin, C., Greenberg, M. E., & Rogulja, D. (2020). Sleep Loss Can Cause Death through Accumulation of Reactive Oxygen Species in the Gut. *Cell*, 181(6), 1307-1328.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.049>
- Vasciaveo, V., Iadarola, A., Casile, A., Dante, D., Morello, G., Minotta, L., Tamagno, E., Cicolin, A., & Guglielmotto, M. (2023). Sleep fragmentation affects glymphatic system through the different expression of AQP4 in wild type and 5xFAD mouse models. *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01498-2>
- Verheggen, I. C. M., Van Boxtel, M. P. J., Verhey, F. R. J., Jansen, J. F. A., & Backes, W. H. (2018). Interaction between blood-brain barrier and glymphatic system in solute clearance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 90, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.03.028>
- Vitorelli, S., & Passos, J. F. (2017). Telomeres and Cell Senescence—Size Matters Not. *EBioMedicine*, 21, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.027>
- Wadhwa, M., Prabhakar, A., Anand, J. P., Ray, K., Prasad, D., Kumar, B., & Panjwani, U. (2019). Complement activation sustains neuroinflammation and deteriorates adult neurogenesis and spatial memory impairment in rat hippocampus following sleep deprivation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 82, 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.08.004>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 217. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
- Wu, F., Zou, Q., Ding, X., Shi, D., Zhu, X., Hu, W., Liu, L., & Zhou, H. (2016). Complement component C3a plays a critical role in endothelial activation and leukocyte recruitment into the brain. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 23. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0485-y>
- Yu, X., Nagai, J., & Khakh, B. S. (2020). Improved tools to study astrocytes. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0264-8>

- Yuan, H., Sun, D., Ji, Y., Meng, B., Lu, B., Liu, R., Xing, X., Wang, R., & Chen, J. (2023). Pericyte loss impairs the blood–brain barrier and cognitive function in aged mice after anesthesia/surgery. *Brain Research Bulletin*, 204, 110799. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.110799>
- Zhai, Q., Zhang, Y., Ye, M., Zhu, S., Sun, J., Wang, Y., Deng, B., Ma, D., & Wang, Q. (2023). Reducing complement activation during sleep deprivation yields cognitive improvement by dexmedetomidine. *British Journal of Anaesthesia*, 131(3), 542–555. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2023.04.044>
- Zhang, P., & Sung, M. H. (2022). Cellular senescence in neurodegenerative diseases. In *Cellular Senescence in Disease* (pp. 363-381). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822514-1.00012-2>
- Zhang, X., Wang, Y., Zhao, R., Hu, X., Zhang, B., Lv, X., Guo, Z., Zhang, Z., Yuan, J., Chu, X., Wang, F., Li, G., Geng, X., Liu, Y., Sui, L., & Wang, F. (2019). Folic Acid Supplementation Suppresses Sleep Deprivation-Induced Telomere Dysfunction and Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 4569614. <https://doi.org/10.1155/2019/4569614>
- Zhao, Y., Fang, R., Bian, H., Zhang, K., Yu, S., Wang, Y., & Huang, L. (2025). Comparative analysis of sleep deprivation models: Impacts on sleep architecture, emotional state, cognitive function, and biochemical indicators in male rats. *Behavioural Brain Research*, 482, 115451. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2025.115451>
- Zhao, Y., Gan, L., Ren, L., Lin, Y., Ma, C., & Lin, X. (2022). Factors influencing the blood-brain barrier permeability. *Brain Research*, 1788, 147937. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147937>
- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., & Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*, 163(5), 1064–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>
- Zhong, C., Masters, M., Donzella, S. M., Diver, W. R., & Patel, A. V. (2025). Electronic Screen Use and Sleep Duration and Timing in Adults. *JAMA Network Open*, 8(3), e252493.
- Zonca, L., Bellier, F. C., Milior, G., Aymard, P., Visser, J., Rancillac, A., Rouach, N., & Holcman, D. (2025). Unveiling the functional connectivity of astrocytic networks with AstroNet, a graph reconstruction algorithm coupled to image processing. *Communications Biology*, 8(1), 114. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-07390-0>

14. ANEXO

PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIOS



Progressive Blood–Brain Barrier Disruption in Sleep-Restricted Young Mice: Cellular Senescence and Neuroinflammation Crosstalk

Jessica J. Avilez-Avilez^{1,2} · Jesús Enrique García-Aviles^{1,3} · Ricardo Jair Ramírez-Carreto^{4,5} ·
Verónica Salas-Venegas^{4,6} · Mara A. Guzmán-Ruiz³ · Fernanda Medina-Flores⁷ · Mina Königsberg⁸ ·
Anahí Chavarría⁴ · Beatriz Gómez-González²

Received: 27 May 2025 / Revised: 29 June 2025 / Accepted: 22 July 2025
© The Author(s) 2025

Abstract

Sleep loss promotes a chronic low-grade inflammatory status with increased levels of inflammatory cytokines. Sleep loss also induces low-grade neuroinflammation characterized by glial reactivity and blood–brain barrier (BBB) dysfunction, as evidenced by BBB hyperpermeability and tight junction disassembly. Additionally, it raises molecules related to the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in aged subjects, suggesting an increase in senescent cells. Here, we assessed the impact of sleep restriction on cellular senescence, neuroinflammation, and BBB function in the cerebral cortex and hippocampus of young male C57BL/6 mice. Sleep restriction induced a progressive increase in BBB permeability after 3, 5, and 10 days, along with a higher expression of the astroglial marker, the glial fibrillary acidic protein (GFAP), and the expression of the C3 complement component. The pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) increased in a region-dependent form. Furthermore, the progressive increase of the senescence markers β -galactosidase and p21 observed in both brain regions was accompanied

Jesús Enrique García-Aviles and Ricardo Jair Ramírez-Carreto have contributed equally to this work.

✉ Anahí Chavarría
anahi.chavarria@facmed.unam.mx

✉ Beatriz Gómez-González
bgomezglez@gmail.com; bgomez@izt.uam.mx

Jessica J. Avilez-Avilez
cbs2203802600@izt.uam.mx

Jesús Enrique García-Aviles
jega222@xanum.uam.mx

Ricardo Jair Ramírez-Carreto
qfb.jairramirez@quimica.unam.mx

Verónica Salas-Venegas
vsalas@xanum.uam.mx

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

Fernanda Medina-Flores
mmflor2@emory.edu

Mina Königsberg
mkf@xanum.uam.mx

¹ Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

² Área de Neurociencias, Departamento de la Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

³ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁴ Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Medicina Experimental “Dr. Ruy Pérez Tamayo”, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁵ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁶ Programa de Becas Posdoctorales, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁷ Cell Biology Department, Emory University, Atlanta, GA, USA

⁸ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico



Sleep loss impairs blood-brain barrier function: Cellular and molecular mechanisms

Jessica Janeth Avilez-Avilez^{a,b,1}, María Fernanda Medina-Flores^{a,b,1},
and Beatriz Gómez-Gonzalez^{b,*}

^aGraduate Program in Experimental Biology, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

^bArea of Neurosciences, Department of Biology of Reproduction, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

*Corresponding author. e-mail address: bgomez@izt.uam.mx; bgomezglez@gmail.com

Contents

1. Sleep	78
2. Sleep regulates the neurovascular unit and blood-brain barrier function	79
2.1 Sleep loss disrupts blood-brain barrier physiology	81
2.2 Role of endothelial cells in regulating blood-brain barrier function during sleep	82
2.3 Role of pericytes in regulating blood-brain barrier function during sleep	83
2.4 Role of glial cells in regulating blood-brain barrier function during sleep	84
2.5 Role of inflammatory mediators in regulating BBB physiology during sleep	85
3. Sleep and the lymphatic system	87
4. Conclusion	88
Funding	89
References	89

Abstract

Sleep is a physiological process that preserves the integrity of the neuro-immune-endocrine network to maintain homeostasis. Sleep regulates the production and secretion of hormones, neurotransmitters, cytokines and other inflammatory mediators, both at the central nervous system (CNS) and at the periphery. Sleep promotes the removal of potentially toxic metabolites out of the brain through specialized systems such as the glymphatic system, as well as the expression of specific transporters in the blood-brain barrier. The blood-brain barrier maintains CNS homeostasis by selectively transporting metabolic substrates and nutrients into the brain, by regulating the efflux of metabolic waste products, and maintaining bidirectional communication between the periphery and the CNS. All those processes are disrupted during sleep loss. Brain endothelial cells express the blood-brain barrier phenotype, which arises after cell-to-cell interactions with mural cells, like pericytes, and after the release of soluble factors by astroglial endfeet.

¹ Both authors contributed equally to the work.



MICROGLIA: EL EJÉRCITO DEL CEREBRO

Por: JESSICA AVILEZ AVILEZ* y BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ**

El sistema nervioso central se caracteriza por presentar células con funciones muy particulares, las más conocidas y estudiadas son las neuronas; sin embargo las neuronas no son las únicas células que residen en el sistema nervioso central o las únicas que forman el cerebro. Además de las neuronas encontramos otro tipo de células, denominadas globalmente como glia, que incluye a los astrocitos, los oligodendrocitos y la microglia.

La microglia es una célula inmune que reside en el sistema nervioso central y su tarea principal es la de proteger al cerebro de diversos daños que se puedan presentar, por ejemplo infección o invasión de células ajenas al cerebro. De tal modo que podríamos decir que las células microgliales son un sistema de defensa del cerebro. Fue Pio del Rio Horteiga, estudiante y colaborador de Santiago Ramón y Cajal, el primer investigador en describir estas células, y quien le llamó microglia por su pequeño tamaño en comparación con las neuronas.

Las células microgliales son un tipo de glia, caracterizada por contener citoplasma escaso y prolongaciones irregulares. A pesar de que estas células residen en el sistema nervioso central, esto no siempre es así. Estas células migran desde la periferia hacia el cerebro a través de los vasos sanguíneos en etapas tempranas del desarrollo, en el caso de los humanos esto ocurre a partir de la mitad del primer trimestre de gestación y hasta la mitad del segundo trimestre; en el caso de los roedores ocurre entre los días embrionarios 10 a 19. La morfología de las células microgliales en esta etapa es semejante a la de los monocitos, es decir redonda. Sin embargo, una vez que llegan al cerebro, la morfología cambia, se convierten en células ramificadas, es decir, extienden prolongaciones largas y espinosas. Una vez instalada en su puesto de vigilancia, la microglia ramificada mueve lentamente sus prolongaciones para detectar cambios en el microambiente cerebral.

Dependiendo de las condiciones del ambiente cerebral, la microglia puede modificar su morfología, adecuándose para generar la mejor respuesta ante esos cambios. En condiciones adversas para el cerebro la microglia se vuelve reactiva, las ramificaciones de la célula se vuelven algo robustas y abundantes. La microglia reactiva puede presentar diferentes respuestas que dependen del estímulo nocivo al que se enfrentan; sin embargo, existen dos fenotipos extremos, los fenotipos M1 y M2. La microglia reactiva M1 se caracteriza por la generación de moléculas como citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno. Todos esos agentes bioquímicos le permiten a la microglia eliminar patógenos y agentes dañinos para el sistema nervioso, así como reclutar (llamar) a otras células del sistema inmune. Al igual que ocurre con el ejército que se mueve a zonas de guerra, la microglia reactiva migra de manera numerosa desde sus posiciones originales hacia regiones nerviosas con procesos infecciosos, daño por traumatismo o por enfermedades neurodegenerativas. También podemos encontrar la contraparte de la microglia agresiva que busca dañar a los agentes patógenos, se trata de la microglia reactiva de tipo anti-inflamatorio o M2; que sería similar al ejército atendiendo una emergencia por desastres naturales. La microglia reparadora M2 libera factores tróficos, que promueven el crecimiento y reparación de las prolongaciones neuronales.

La microglia puede adquirir la habilidad de fagocitar, que es el proceso en el que la célula modifica su morfología para engullir o “comerse” diversas partículas y fragmentos de células con el propósito de degradarlas. En la fagocitosis la microglia adquiere la morfología de un macrófago, es decir, las prolongaciones irregulares disminuyen, el citosol se vuelve más abundante y presenta movimientos ameboides. Además de fagocitar microorganismos patógenos, esa morfología ayuda a la limpieza de residuos que generan las neuronas, a la eliminación

* Estudiante de Doctorado en Biología Experimental, CBS, UAM-I.

** Área de Neurociencias, Dpto. Biología de la Reproducción, UAM-I.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00169

Matricula: 2203802600

Papel de la astrogliá en la alteración de la barrera hematoencefálica durante la pérdida de sueño.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de octubre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. VERONICA SALAS VENEGAS
DRA. ADRIANA ALARCON AGUILAR
DRA. HILDA MARTINEZ CORIA
DRA. MARA ALAIDE GUZMAN RUIZ

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

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: JESSICA JANETH AVILEZ AVILEZ

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

Aprobar

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

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

DRA. VERONICA SALAS VENEGAS

VOCAL

DRA. ADRIANA ALARCON AGUILAR

VOCAL

DRA. HILDA MARTINEZ CORIA

SECRETARIA

DRA. MARA ALAIDE GUZMAN RUIZ