

CARACTERIZACIÓN DE LA ARQUITECTURA DEL SUEÑO EN EL MODELO MURINO DE DESMIELINIZACIÓN POR CUPRIZONA

DIANA CAROLINA CÁRDENAS CORREDOR

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias
Bogotá, Colombia
2016

CARACTERIZACIÓN DE LA ARQUITECTURA DEL SUEÑO EN EL MODELO MURINO DE DESMIELINIZACIÓN POR CUPRIZONA

DIANA CAROLINA CÁRDENAS CORREDOR

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Neurociencias

Director:

Manuel J. Rojas Barreto DVM, MSc.

Codirector:

Luis Fernando Cárdenas P. Ph.D.

Línea de Investigación:

Enfermedades Neurodegenerativas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2016

Dedicatoria

A mis tres padres dedico esta tesis por su especial apoyo y comprensión, por ser el motor en mi corazón, la persistencia, la fuerza y el confort que permitió el logro de este objetivo.

Agradecimientos

Agradezco a mis dos tutores, el profesor asociado de la Universidad Nacional de Colombia, Manuel J. Rojas y el profesor asociado de la Universidad de los Andes Fernando Cárdenas P. por el constante apoyo, asesoría, interés y paciencia que demostraron a lo largo de este proceso. Por su calidad humana y por la constante motivación que me impartieron en momentos críticos de este estudio. Agradezco especialmente su ejemplo, dedicación y compromiso en el área investigativa, el cual me estimuló a llegar al final de la investigación.

A Alejandro Osorio, candidato a MSc en Ingeniería Biomédica de la Universidad de los Andes y a Melissa Cárdenas Molano psicóloga de la Universidad del Bosque, mi agradecimiento de corazón, por su constante e incondicional colaboración.

A mis amigos y estudiantes de la maestría en Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia Irene Riveros, Angélica Alarcón, Johanna Folleco y Cristian Giraldo un agradecimiento por su colaboración y ánimo cuando lo necesité.

Agradezco a Andrea Zarrate, Karen Corredor, Juan David Peña, Laura León, Diego Liévano, Cristian García, Daniela Marín, Angie Correa, Ángela Gómez y a toda la familia del semillero de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de los Andes por haberme adoptado en su casa, por enseñarme con cariño y paciencia y por siempre estar dispuestos a ser un soporte en mi vida académica y personal.

Finalmente agradezco a la División de investigación de la sede Bogotá por la financiación obtenida a través de la convocatoria del programa nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, la creación y la innovación en posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015.

Resumen

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica, inflamatoria y desmielinizante, que afecta el sistema nervioso central. En humanos con esclerosis múltiple se han reportado alteraciones de sueño que tienen impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes. Este estudio tiene como objetivo la caracterización de la arquitectura del sueño en el modelo murino de desmielinización por cuprizona. Para este propósito ocho animales derivados de ratas wistar del laboratorio Charles Rivers fueron utilizados. Los sujetos fueron divididos en dos grupos, experimental y control. Los animales experimentales fueron implantados con cinco electrodos craneales y uno cervical, para registrar electroencefalograma (EEG) y electromiograma (EMG), en el día 7 postquirúrgico, durante 3 días antes del inicio de la administración con cuprizona (registro basal) y 3 días después de la finalización del tratamiento (Semana 8 de intoxicación con cuprizona). Los resultados mostraron diferencias significativas en la arquitectura del sueño en la fase postratamiento. Se encontró aumento en el porcentaje de sueño MOR de 4,46% en el pretratamiento a 7,49% en el postratamiento $p= 0,025$ durante el periodo de oscuridad, con una menor duración de los eventos de sueño MOR durante el periodo de luz luego del tratamiento $z= -2,27$, $p= 0,023$. En el registro continuo de 72 horas se evidencia una tendencia al aumento de tiempo de sueño a expensas de la vigilia. El sueño MOR incrementa de 5,9% a 8,9% en el postratamiento, el sueño NMOR incrementa de 37,7% a 47,7% y la vigilia decrece de 56,22% a 44,07%. Adicionalmente, hubo disminución en el desempeño de la prueba de la viga de equilibrio con un puntaje medio de 3,5 en la medición basal a 2,56 en la semana 8 postratamiento $p= 0,022$, denotando deterioro de la función motora. El estudio concluye que existen cambios en la arquitectura del sueño en el modelo murino de desmielinización por cuprizona evidenciados por aumento del porcentaje de sueño luego del tratamiento, relacionada con una disminución de mielina en proyecciones de estructuras cerebrales asociadas con la modulación del ciclo sueño/vigilia, como *Locus Coeruleus* y Núcleo mesencefálico trigeminal.

Palabras clave: Sueño, Esclerosis Múltiple, Desmielinización, Cuprizona.

Abstract

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, and demyelinating disease that affects the central nervous system. Humans with MS show sleep disorders, which have a negative impact for the patient's life quality. The aim of this study is to characterize the sleep architecture in the murine model of demyelination by cuprizone. Eight Charles River derived Wistar rats were used. The experimental subjects were divided into two groups, experimental and control. The experimental animals were implanted with five cranial electrodes and one cervical electrode, for recording electroencephalogram (EEG), and electromyogram (EMG) for 3 days before and 3 after treatment with cuprizone. The results showed significant differences in the sleep architecture during the post-treatment. An increase in REM sleep with 4,46% in pretreatment vs. 7,49% in posttreatment $p=0,025$ during the darkness period, with a shorter duration of REM sleep events during the light period after treatment $z = -2.27$, $p = 0.023$. During the 72 hours recording there was a trend to increase sleep at the expense of wakefulness. REM sleep increases from 5.9 % to 8.9 % in the post-treatment, NREM sleep increases from 37.7 % to 47.7 % and wakefulness decreases from 56,22% to 44,07%. Additionally, there was a decreasing in performance on the balance beam test with scoring of 3,5 in pretreatment vs. 2,56 in posttreatment $p=0,022$ that demonstrate worsening of the motor function. This study concludes that there are changes in the sleep architecture of the murine model of demyelination by cuprizone. There is an increasing on the percentage of sleep after treatment related with a decreasing in myelin of the projections to brain structures associated with the sleep/wake cycle such as *locus coeruleus* and mesencephalic trigeminal nucleus.

Keywords: Sleep, Multiple Sclerosis, Demyelination and Cuprizone

Contenido

Resumen.....	VII
Lista de Figuras	XI
Lista de Tablas.....	XII
Lista de abreviaturas	XIII
Introducción.....	1
1. Capítulo 1: Justificación	3
2. Capítulo 2: Planteamiento del problema.....	7
2.1. Definición del Problema.....	8
3. Capítulo 3: Objetivos	9
3.1. Objetivo General	9
3.2. Objetivos Específicos.....	9
4. Capítulo 4: Marco teórico	11
4.1. Arquitectura del Sueño.....	16
4.2. Desórdenes del Sueño Asociados a EM.....	18
4.2.1. Narcolepsia- Cataplexia.....	18
4.3. Modelo de desmielinización por Cuprizona.....	20
5. Capítulo 5: Metodología	23
5.1. Implantación de electrodos y registro de actividad electrofisiológica	24
5.2. Registros de EEG Y EMG- Análisis de datos de sueño.....	26
5.3. Administración de Cuprizona	29
5.4. Evaluación de coordinación motora y equilibrio	30
5.5. Histología.....	31
5.6. Análisis Estadístico	31
6. Capítulo 6: Resultados	33
6.1. Arquitectura del sueño	33

6.2. Prueba de Viga de Equilibrio	43
6.3. Histología.....	44
7. Conclusiones y Recomendaciones.....	49
7.1. Conclusiones.....	49
7.2. Recomendaciones	50
8. Discusión	51
A. Anexo: Protocolo de Perfusión	57
B. Anexo: Protocolo de tinción Sudan Black B.....	59
Bibliografía	61

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 5-1. Ubicación de electrodos implantados grupo experimental	25
Figura 5-2. Análisis vigilia.....	27
Figura 5-3. Análisis sueño No MOR.....	28
Figura 5-4. Análisis sueño MOR.....	29
Figura 6-1. Porcentaje del sueño MOR.....	34
Figura 6-2. Porcentaje de sueño NMOR.....	35
Figura 6-3. Porcentaje de vigilia.....	36
Figura 6-4. Hipnogramas Rata 1.....	37
Figura 6-5. Hipnogramas Rata 2.....	38
Figura 6-6. Hipnogramas Rata 3.....	39
Figura 6-7. Hipnogramas Rata 4.....	40
Figura 6-8. Tiempo promedio de sueño por rata en 24 horas	42
Figura 6-9. Puntaje de la prueba de la viga de equilibrio	43
Figura 6-10. Tinción Sudan Black B- proyección del hipotálamo lateral: <i>Locus Coeruleus</i> , y proyección del <i>Locus Coeruleus</i> : Núcleo trigeminal mesencefálico.....	46
Figura 6-11. Tinción Sudan Black B- proyección del núcleo supraquiasmático: <i>Stria Terminalis</i>	46
Figura 6-12. Tinción Sudan Black B Cuerpo calloso.....	47

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 6-1. Estadística Arquitectura del Sueño.....	33
Tabla 6-2. Estadística de tiempos de episodios MOR.....	41
Tabla 6-3. Puntaje y latencia de la prueba de equilibrio en la viga de 12 mm....	43
Tabla 6-4. Puntaje y latencia de la prueba de equilibrio en la viga de 6mm.....	43
Tabla 6-5. Mielina en proyecciones de núcleos relacionados con modulación de sueño.....	45
Tabla 6-6. Mielina en cuerpo calloso.....	45

Lista de abreviaturas

Abreviatura Término

<i>CD</i>	Células dendríticas
<i>CMH</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<i>CPAs</i>	Células presentadora de antígenos
<i>EAE</i>	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
<i>EM</i>	Esclerosis Múltiple
<i>Fc</i>	Fragmento cristallizable
<i>IFN</i>	Interferon
<i>IL</i>	Interleuquinas
<i>IP</i>	Intraperitoneal
<i>LFDReg</i>	Lóbulo Frontal Derecho Registro
<i>LFIRef</i>	Lóbulo Frontal Izquierdo Referencia
<i>LOT</i>	Lóbulo Occipital Tierra
<i>LPDReg</i>	Lóbulo Parietal Derecho Registro
<i>LPIReg</i>	Lóbulo Parietal Izquierdo Registro
<i>MBP</i>	Myelin Basic Protein
<i>NO MOR</i>	No Movimientos Oculares Rápidos
<i>NSQ</i>	Núcleo supraquiasmático
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>MOR</i>	Movimientos oculares Rápidos
<i>SC</i>	Subcutánea
<i>SPI</i>	Síndrome de piernas inquietas
<i>TGF</i>	Factor de crecimiento transformante
<i>TH</i>	Tipo helper
<i>TLRs</i>	Receptores tipo toll
<i>TNF α</i>	Factor de necrosis tumoral alfa

Introducción

Los trastornos de sueño son frecuentes en Esclerosis Múltiple (EM) debido a las características inmunológicas e inflamatorias de la enfermedad. Se ha reportado una frecuencia de co-morbilidad de EM y desórdenes del sueño entre el 25 y 50% (Bamer, Johnson, Amtmann, & Kraft, 2008b; Caminero & Bartolomé; Leonavicius & Adomaitiene, 2014).

La temprana manifestación de estos desórdenes se ha convertido en los últimos años en materia de interés para la ciencia por su importante impacto en la calidad de vida y en la salud. Sus efectos involucran alteraciones como la depresión y la ansiedad (Pokryszko-Dragan et al., 2013), a nivel social, aislamiento y sobrecarga, y a nivel físico, fatiga y progresión acelerada de la enfermedad (Lunde, Bjorvatn, Myhr, & Bø, 2013; Christian Veauthier, 2015).

Pese a que en la actualidad la relevancia de estos desórdenes secundarios a EM, ha sido subestimada, su investigación y atención es prioritaria teniendo en cuenta que afecta principalmente a personas en edad productiva, entre 25 y 50 años (Neau et al., 2012; Vanotti, 2008), quienes presentan un pronóstico poco favorable por la alta discapacidad y riesgo a desarrollar co-morbilidades relacionadas con trastornos de sueño como enfermedad cardíaca, diabetes, obesidad y dolor crónico (Barun, 2013).

Estudios que exploran la relación entre la EM y el sueño han sido reportados con el fin de determinar el efecto de los estados comportamentales de sueño y vigilia en la neurodegeneración (Plazzi & Montagna, 2002a; Pokryszko-Dragan et al., 2013; Vetrugno et al., 2009b), pese a su existencia estos son limitados en modelos animales de

desmielinización. Por tanto este trabajo se considera un acercamiento a este aspecto, al explorar la arquitectura del sueño en un modelo animal de EM, con el fin de determinar si existen cambios en el sueño de las ratas similares a los reportados en pacientes con la patología inflamatoria, que permitan a futuro estandarizar el uso del modelo animal en el desarrollo de terapéuticas farmacológicas coherentes con la correspondencia inflamatoria y neuroquímica de estas patologías.

1.Capítulo 1: Justificación

En el mundo la prevalencia de EM es estimada en 30 casos por cada 100.000 habitantes y en Colombia 5 casos por cada 100.000 habitantes (OMS, World Health Organization, 2008). Sin embargo, algunos estudios sostienen la existencia de un sub-registro epidemiológico de la enfermedad (Pradilla & León, 2007), que puede incidir de forma determinante en los escasos esfuerzos y la mínima atención prestada a estos pacientes, en materia de salud pública, investigación, generación de programas e intervención integral.

No obstante, la EM es una entidad que demanda gran atención, dado que las consecuencias físicas y mentales producidas por la patología inflamatoria generan impacto negativo en el desempeño del paciente a lo largo de la vida (World Health Organization, 2006). La EM limita la capacidad para desarrollar las actividades cotidianas en respuesta al declive físico producido; dificulta el desempeño de roles dentro de la sociedad pues la discapacidad sumada a la fatiga, los trastornos de sueño, la depresión y el daño cognitivo, contribuyen a discriminación social y subsecuentemente a una alta tasa de desempleo, cercano al 70% entre personas con EM (Olascoaga, 2010).

La influencia de los desórdenes del sueño sobre la funcionalidad de las personas con EM (Gallup, Gallup Jr, & Feo, 2010; Merlino et al., 2009; Trojan et al., 2012) promueve la búsqueda de mecanismos encaminados a impulsar una mejoraría del sueño que permita subsanar algunas de las situaciones mencionadas y en consecuencia, impactar positivamente sobre la calidad de vida de quienes padecen EM (Attarian, 2009).

La alta frecuencia de desórdenes del sueño reportada en estudios de EM, se encuentra fuertemente vinculada con las bases moleculares y la alteración producida en el proceso de desmielinización, dado que la liberación de citoquinas, generada en respuesta a la actividad inflamatoria, se relaciona con la regulación del sueño (S. D. Brass, P. Duquette, J. I. Proulx-Therrien, & S. Auerbach, 2010b). La identificación de un daño en el sistema nervioso central, conduce a la activación de las células inmunes de la primera línea de defensa, la microglía, las cuales son reguladas a la alza por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Estas células inician la liberación de citoquinas y así dan paso a la entrada de macrófagos, linfocitos y células con un fenotipo similar a células Dendríticas (CD) en la lesión. Las citoquinas liberadas como interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina IL1, IL2, IL6 y IL12 son capaces de generar y mantener la actividad inmune a diferentes niveles. Estas citoquinas al ser proteínas que funcionan como mensajeros químicos proinflamatorios se vinculan a la actividad de sueño al parecer con un efecto somnolento. En contraparte la IL10 y la IL4 antiinflamatorias, promueven la inhibición del sueño como efecto adicional a su función inmune (S. D. Brass, P. Duquette, J. Proulx-Therrien, & S. Auerbach, 2010a).

Con relación a cambios estructurales asociados a características de la EM que generan desmielinización del sistema nervioso central (SNC) y que repercuten sobre el sueño, se pueden observar lesiones inflamatorias hipotalámicas que dejan una disfunción reversible del sistema hipocretinérgico, resultando en bajos niveles de hipocretina 1 en el líquido cefalorraquídeo y en estructuras cerebrales de células productoras o con proyección de células hipocretinérgicas, lo cual se puede manifestar como un síndrome reversible tipo narcolepsia (Iseki et al., 2002; Vetrugno et al., 2009a). En el tallo cerebral la desmielinización del núcleo ambiguo se asocia con la apnea del sueño, debido a que esta estructura regula el control de las neuronas motoras en el área superior de la vía respiratoria y en el núcleo solitario que se ha vinculado a apnea central del sueño, al producir parálisis diafragmática (Steven D. Brass et al., 2010a). Los desórdenes del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), están asociados con lesiones en el núcleo pedúnculo pontino, *locus coeruleus* y la formación reticular, lo que conduce a la persistencia del tono muscular durante el sueño MOR (Plazzi & Montagna, 2002b). En los modelos animales de EM, las lesiones inflamatorias y el daño axonal, generados como

consecuencia de desmielinización, podrían constituirse en eventos de interferencia de la actividad del núcleo supraquiasmático (NSQ), generando cambios en el ciclo circadiano (Buenafe, 2012). Así mismo han sido reportadas alteraciones dopaminérgicas asociadas con el síndrome de piernas inquietas en pacientes con EM (Steven D. Brass et al., 2010a).

En consecuencia, la alta frecuencia de desórdenes del sueño reportada en estudios en EM demanda mayor atención e investigación y por tanto, el uso adecuado de modelos animales se convierte en una herramienta valiosa para entender con mayor precisión los mecanismos que lo generan, describir su aparición, sus características y elucidar blancos terapéuticos.

2. Capítulo 2: Planteamiento del problema

La presentación de desórdenes de sueño relacionados con EM en humanos ha sido ampliamente reportada (Bamer, Johnson, Amtmann, & Kraft, 2008a; Steven D. Brass et al., 2010a; Caminero & Bartolomé, 2011; Merlino et al., 2009; Tachibana et al., 1994). Entre los desórdenes descritos asociados se encuentran, los desórdenes del ritmo circadiano, el síndrome de piernas inquietas, los trastornos respiratorios del sueño, el insomnio, la narcolepsia y los desórdenes relacionados con el sueño MOR (Steven D. Brass et al., 2010a).

Tradicionalmente los trastornos del sueño se han descrito como co-morbilidad secundaria a la fatiga producida por la EM y no como consecuencia directa de la patología desmielinizante en correspondencia con sus bases moleculares. Estos son caracterizados principalmente en estudios de comportamiento a través de escalas que miden discapacidad, calidad de vida, fatiga y comportamiento del sueño (Mendozzi, Tronci, Garegnani, & Pugnetti, 2010; Merkelbach et al., 2011; Mills & Young, 2011; C. Veauthier et al., 2011). Los estudios que relacionan los hallazgos polisomnográficos con cambios estructurales generados directamente por la patología desmielinizante a nivel del sistema nervioso central, han aumentado en los últimos años, al considerarse fundamentales en la comprensión de la influencia de la desmielinización en el deterioro del estado de sueño (Marrie et al., 2014).

De esta forma la relación establecida entre cambios estructurales generados en la EM manifestados en lesiones desmielinizantes y alteraciones del sueño, involucran el estudio de alteraciones histopatológicas de áreas cerebrales relacionadas con el control del sueño y cambios en la arquitectura del sueño descritos por hipnogramas, para lo cual el uso del modelo de desmielinización inducida por cuprizona en rata

representa una herramienta útil y pertinente en la caracterización de posibles desórdenes del sueño, con el fin de estandarizarlos y en futuros estudios posibilitar la comprensión de fenómenos neurobiológicos de sueño relacionados con EM.

2.1. Definición del Problema

La asociación de desórdenes del sueño y EM se relaciona con frecuencia a la fatiga, que es considerada el síntoma más común y discapacitante de la enfermedad (Steven D Brass, Li, & Auerbach, 2014). Sin embargo hasta la actualidad se está comenzando a estudiar con mayor profundidad el vínculo de las características patológicas de la enfermedad y el efecto de las lesiones producidas por la EM en regiones específicas del sistema nervioso central que intervienen en la regulación de la cantidad y la calidad del sueño (Caminero & Bartolomé; Lunde et al., 2013).

Teniendo en cuenta la complejidad de la fisiopatología de la Esclerosis Múltiple, por su característica desmielinizante e inflamatoria y la comorbilidad de desórdenes del sueño asociados, se desea explorar el comportamiento del sueño en un modelo animal de desmielinización. En la literatura se han utilizado varios modelos animales para el estudio de la EM, entre los que se incluyen los modelos autoinmunes, modelos inducidos por virus y los modelos tóxicos (Rodríguez, 2007).

El modelo de desmielinización por cuprizona es el más utilizado entre los tóxicos, y el seleccionado para esta investigación teniendo en cuenta su consistente efecto desmielinizador, la marcada actividad inflamatoria y la respuesta no dependiente de la edad en la oligodendroglía considerando que la tasa y la extensión de desmielinización y remielinización en adultos afectados es similar a la encontrada en neonatos intoxicados. (Basoglu, Boylu, & Kose, 2013; Pasquini et al., 2007).

La sintomatología de la EM en el humano incluye alteraciones de la arquitectura del sueño (Trojan et al.), en modelos animales de esclerosis múltiple este tópico aún permanece casi inexplorado, dado que a nuestro saber solo se ha reportado un estudio a la fecha, por tanto utilizando el modelo de desmielinización por cuprizona nos cuestionamos si existen alteraciones de la arquitectura del sueño en un modelo tóxico.

3. Capítulo 3: Objetivos

3.1. Objetivo General

Caracterizar alteraciones en la arquitectura del sueño en el modelo de desmielinización por cuprizona.

3.2. Objetivos Específicos

- Describir la arquitectura del sueño en el modelo murino de desmielinización con cuprizona, utilizando como herramienta para su análisis, registros electrofisiológicos e hipnogramas.
- Identificar cambios histológicos asociados a desmielinización en los núcleos, supraquiasmático, hipotálamo lateral, y *locus coeruleus*, relacionados con el control de los estados de sueño y vigilia en el modelo murino de desmielinización por cuprizona.

4. Capítulo 4: Marco teórico

La EM es una enfermedad desmielinizante del SNC, caracterizada por lesiones inflamatorias y pérdida axonal, asociada a autoreactividad a proteínas de mielina por linfocitos T (Ziemann, Wahl, Hattingen, & Tumani, 2011) los cuales migran a través de la barrera hematoencefálica y median el daño contra neuronas centrales, sus vainas de mielina y sus axones (Fletcher, Lalor, Sweeney, Tubridy, & Mills, 2010).

El curso clínico en EM es caracterizado en su inicio, por episodios de discapacidad seguidos por períodos de recuperación, clasificados como recaídas-remisiones o fase remitente-recurrente (RR), en la cual se encuentran la mayoría de personas diagnosticadas con EM. Las fases crónicas de la enfermedad se constituyen en la fase primaria progresiva (PP), caracterizada por progresión de la enfermedad, sin aparición de remisiones y la fase secundaria progresiva (SP) que se presenta con discapacidad prolongada con pequeños episodios de recuperación. Los síntomas más comunes de la enfermedad son ataxia, fatiga, alteraciones sensoriales, dificultad en el mantenimiento del equilibrio, pérdida de visión y deterioro en las actividades relacionadas con memoria y cognición (Slavin, Kelly-Modis, Labadia, Ryan, & Brown, 2010).

Pese a las crecientes investigaciones sobre EM, aún no es claro el mecanismo por el cual la patología se genera. Sin embargo en la actualidad se dispone de dos hipótesis fundamentales orientadas a explicar su aparición, 1) La hipótesis autoinmune, desarrollada a partir de los estudios realizados con el modelo animal de encefalomiелitis autoinmune experimental y 2) La hipótesis relacionada con agentes infecciosos (Hemmer, Archelos, & Hartung, 2002), la cual se soporta a partir de dos

mecanismos principales: el mimetismo molecular y la activación transeúnte (Sospedra & Martin, 2005).

Dentro de la hipótesis autoinmune, la inflamación sistémica y el daño tisular en el sistema nervioso central conducen a activación tanto del sistema inmune innato, como del sistema inmune adaptativo (Kasper & Shoemaker, 2010).

Inicialmente el sistema inmune innato es el encargado de proteger al cuerpo de sustancias potencialmente peligrosas por un patrón de reconocimiento y respuesta a antígenos microbianos por la vía de la expresión de varios receptores tipo toll (TLRs), generándose consecutivamente la respuesta por el sistema inmune adaptativo, caracterizada por la producción de anticuerpos marcados que funcionan como memoria inmunológica y de esta manera recuerdan cada patógeno. El sistema inmune adaptativo comprende en mayor medida células T y células B linfocíticas. Las primeras atacan antígenos directamente por liberación de interleucinas que permite controlar la respuesta inmune y las segundas producen anticuerpos que atacan a antígenos específicos. (Kasper & Shoemaker, 2010).

Las células presentadoras de antígenos (CPAs), constituyen otro de los componentes del sistema inmune encargados de expresar receptores inmuno- estimuladores especiales, conocidos como moléculas co-estimuladoras; sobre sus superficies celulares, las cuales están específicamente diseñadas para presentar antígenos y preparar células T. Existen varios tipos de CPAs, incluyendo células dendríticas (CDs), monocitos, macrófagos y células B. Las CDs son las CPAs primarias y pueden ser clasificadas principalmente en dos tipos de células: las mieloides o las plasmacitoides. Las CDs mieloides son células tisulares encontradas a través del cuerpo como células intersticiales o células de Langerhans encontradas en la piel. Las CDs plasmacitoides están ubicadas en la médula ósea y secretan interferón (IFN) β , cuando son activadas. Adicionalmente a las CDs, los monocitos circulantes a través del cuerpo, monitorizan señales inflamatorias. Cuando la inflamación está presente, los monocitos pueden convertirse en macrófagos. Los macrófagos incluyendo células microgliales fijadas a tejido, fagocitan residuos celulares o

patógenos. Una vez estas CPAs capturan un patógeno, ellas exponen los patógenos extraños formando un complejo con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), sobre su superficie celular para permitir el reconocimiento de los antígenos por las células T (Kasper & Shoemaker, 2010).

La interacción entre CPAs y las células T es un componente esencial para preparar la respuesta inmune adaptativa, diferentes tipos de células T, incluyendo $CD4^+$ y $CD8^+$, pueden ser activadas por CPAs, dado que las células no tiene la capacidad por sí mismas de presentar antígenos. Las células Th1 y Th2 son células efectoras de $CD4^+$, que se polarizan en respuesta a la exposición a ILs específicas. Una vez polarizada a Th1 o Th2, estas células T efectoras continúan expresando y secretando ILs específicas. Por ejemplo, una célula T $CD4^+$ en exposición a IL 12 podría ser polarizada a célula Th1 y comenzar a secretar $TNF\alpha$ y $IFN\gamma$. En contraste la misma célula T $CD4^+$ en exposición a IL 4 se polarizaría a célula Th2 y comenzaría a secretar IL4 y IL13. Las células Th1 se encuentran fuertemente vinculadas a la patogénesis de la EM y las células Th2 exhiben funciones regulatorias en esta patología. Otro tipo de células, las células T $CD4^+$ reguladoras también expresan Foxp3, un factor de transcripción crítico que controla el desarrollo y la función de células T reguladoras. Otras células fundamentales involucradas en la patología de la EM, son las células Th17, que expresan IL17 y comienzan a diferenciarse en presencia del factor de crecimiento transformante (TGF) β a IL1, IL6, IL21 y IL23 (Kasper & Shoemaker, 2010).

Es así como en la Esclerosis Múltiple ante una injuria como inflamación sistémica o daño de tejido dentro del sistema nervioso central, es activada la microglía, la cual se constituye en el elemento clave del sistema inmune innato en el Sistema Nervioso Central. La activación de la microglía resulta en liberación de mediadores inflamatorios y regulación a la alta de receptores inmunes (como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad) sobre otras células del sistema nervioso central, preparando el terreno para la respuesta inmune adquirida en el sistema nervioso central. Las proteínas liberadas por el tejido dañado son rápidamente drenadas a los nodos linfáticos locales. En presencia de CPAs, como células

dendríticas se inicia la respuesta eficiente por células B y T. Después de su activación, estas células cruzan la barrera hematoencefálica, migrando al sitio de exposición antigénica y desarrollando funciones efectoras. La migración al sistema nervioso central involucra adhesión al endotelio y penetración a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo una interacción secuencial altamente coordinada de moléculas de adhesión que son recíprocamente expresadas sobre leucocitos invasores y endotelio, generando descarga de metaloproteinasa de matriz, citoquinas como TNF α , IL6, moléculas tóxicas como óxido nítrico por células T y percepción de quimioquinas por células T cerca del parénquima del Sistema Nervioso Central (Hemmer et al., 2002).

La producción de TNF α dentro del sistema nervioso central potencialmente induce inflamación por presentación antigénica aumentada, promoviendo proliferación astrocítica. Igualmente, la IL6 es necesaria para la inducción de moléculas de adhesión cerebrovascular tal como VCAM-1 que es esencial para el tráfico de leucocitos al sistema nervioso central y para la reacción proinflamatoria, activación de astrogliosis y microgliosis. De manera que, la expresión disminuida de TNF α y la IL6 en el sistema nervioso central se encuentra asociada a atenuación de la enfermedad, confirmando la importancia de estas citoquinas en la patología. (Murphy, Lalor, Lynch, & Mills, 2010).

Así mismo, el TNF α ha demostrado tener influencia en la regulación del sueño actuando sobre los circuitos que lo modulan para promover el sueño no MOR. (Churchill et al., 2008).

Dentro del proceso inmune, las células B se diferencian al reencontrar su antígeno en células plasmáticas y liberan grandes cantidades de anticuerpos en el SNC. Con igual similitud las células T CD4⁺ y T CD8⁺ se activan al reencontrarse con su antígeno sobre la molécula apropiada del complejo mayor de histocompatibilidad y liberan citoquinas o directamente se dirigen a la célula presentadora. Así como las células T CD8⁺ pueden reconocer el antígeno que es presentado por neuronas y

células gliales, las células T CD4⁺ son las responsables de activar células microgliales o macrófagos infiltrados. Estas células fagocitan residuos celulares, capturan complejos anticuerpo – antígeno eficientemente a través de sus receptores Fc (Fragmento Cristallizable) y presentan estos antígenos sobre moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad a células T CD4⁺. En su activación ellos secretan mediadores de inflamación tales como el Factor de necrosis tumoral α y de esta manera tanto el sistema inmune innato como el adquirido se dirigen sinérgicamente hacia la fuente antigénica y remueven ésta del tejido del sistema nervioso central (Hemmer et al., 2002).

En cuanto a la hipótesis relacionada con agentes infecciosos, el primer mecanismo involucrado lo constituye el mimetismo molecular, el cual implica reactividad de células T y B a los mismos péptidos o determinantes antigénicos compartidos por agentes infecciosos y autoantígenos. El reconocimiento de autoantígenos a nivel intermedio de afinidad por células T durante la selección tímica conduce a selección positiva y exportación de estas células T a la periferia. La reactividad cruzada de células T potencialmente autoreactivas con antígenos extraños puede conducir a activación durante la infección, migración a través de la barrera hematoencefálica, infiltración del SNC y si ellos reconocen antígenos expresados en el cerebro, se puede conducir a daño tisular y potencialmente a enfermedades autoinmunes como EM (Sospedra & Martín, 2005).

La proteína básica de mielina (MBP) es un candidato auto antigénico en EM. El mimetismo molecular puede ocurrir tan pronto como el contacto de CMH y receptores de células T es preservado. La activación de células T específicas a MBP derivada de pacientes con EM por péptidos bacteriales y virales comparte elementos con MBP, que dan paso al inicio de la actividad inmune, por lo cual la infección con un virus recombinante induce tempranamente el inicio de la enfermedad. La infección del SNC con un patógeno que contiene un epítipo mimetizado para un auto-antígeno de mielina puede inducir la respuesta de células T tras reactivarlas, resultando en una enfermedad autoinmune desmielinizante (Sospedra & Martín, 2005).

Otro de los mecanismos relacionados con la hipótesis asociada a agentes infecciosos, es la activación transeúnte, la cual puede ser clasificada en dos categorías. La primera categoría abarca activación transeúnte de receptores de células T independientes de células T autoreactivas por citoquinas inflamatorias, súper antígenos y patrones de reconocimiento molecular, por ejemplo activación de receptores tipo Toll. La segunda categoría involucra el descubrimiento de antígenos huéspedes y el efecto adyuvante de agentes infecciosos sobre células presentadoras de antígenos (Sospedra & Martin, 2005).

La EM y su subsecuente desmielinización generan trastornos del sueño como desórdenes del ritmo circadiano, síndrome de piernas inquietas, trastornos respiratorios del sueño, insomnio, narcolepsia y desórdenes del comportamiento del sueño MOR, que impactan profundamente en la calidad de vida de las personas diagnosticadas con EM (Steven D. Brass et al., 2010a).

4.1. Arquitectura del Sueño

La arquitectura del sueño hace referencia al patrón de ocurrencia de los estados de sueño y vigilia, lo cual implica la cantidad de tiempo que el individuo permanece en cada fase del sueño y el porcentaje en cada uno de ellos. Este patrón se evalúa a través de polisomnografía, la cual consiste en la monitorización simultánea de diferentes parámetros fisiológicos para clasificar los registros realizados en fases de sueño/vigilia (Monti, Pandi-Perumal, Jacobs, & Nutt, 2008). El hipnograma constituye la representación gráfica de cambios cíclicos del sueño (Green, Westcombe, & Varma, 2012). En el análisis del sueño animal es frecuentemente utilizado el registro de electroencefalograma (EEG) y electromiograma (EMG) (Zoubek & Chapotot, 2012).

La electroencefalografía captura la actividad eléctrica del cerebro. Es una medida del campo eléctrico producido por un gran número de neuronas activas sincronizadas en función del tiempo. Este campo puede ser medido usando electrodos tanto en la

superficie del cuero cabelludo (electroencefalografía de superficie), como electrodos implantados quirúrgicamente en el cerebro (electroencefalografía profunda). Los registros obtenidos de la electroencefalografía de superficie son el resultado de la sincronización de la actividad de neuronas piramidales, principalmente, mientras que la electroencefalografía profunda es el resultado de la sincronización de grupos neurales de acuerdo a la estructura cerebral en la cual se inserten los electrodos (Saab, 2008).

El espectro del sueño de la rata se encuentra dividido en tres categorías: Vigilia, sueño no MOR y sueño MOR. (Robert, Guilpin, & Limoge, 1999). Estas fases se pueden identificar por particularidades en el EMG y en el EEG (Gilmour, Fang, Guan, & Subramanian, 2010).

La vigilia es caracterizada por registros de alta actividad en el EMG y por actividad electroencefalográfica de alta frecuencia y baja amplitud. Adicionalmente, el EEG durante la vigilia presenta predominio de ondas alfa (9-13 Hz), beta 1 (13-18 Hz), beta 2 (18-30 Hz) y gamma (30-80 Hz). El sueño No MOR es caracterizado por baja actividad en el EMG y un EEG de baja frecuencia y alta amplitud, con poder predominante en la banda delta (1-4 Hz). Durante el sueño MOR el EMG es característicamente plano, casi isoelectrico mientras que el EEG es muy semejante al trazado de vigilia pero con poder predominante en la banda theta (4-8 Hz) (Gilmour et al., 2010; Thakor & Tong, 2004).

Estudios realizados en pacientes con esclerosis múltiple han demostrado una fuerte relación entre la fatiga y la somnolencia, disminución de la eficiencia del sueño relacionada con fatiga, cansancio, falta de energía, aumento de despertares durante el sueño y aumento del sueño lento, con respecto a sujetos control, lo que se relaciona con la actividad de células efectoras que contribuyen a la fatiga y a la modulación de los estados de sueño (Braley, Chervin, & Segal, 2012; Lunde et al., 2012; Lunde et al., 2013; Neau et al., 2012).

En roedores, los estudios de sueño en modelos de esclerosis múltiple han permanecido casi inexplorados. El único reportado recientemente en ratones, encontró disminución en la eficiencia de sueño, aumento en el porcentaje de vigilia, fragmentación del sueño y un hallazgo que contrario a lo esperado arrojó reducción en el sueño No MOR, justificado por los autores como predominio de la actividad de citoquinas antiinflamatorias en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (He, Wang, Kastin, & Pan, 2014)

4.2. Desórdenes del Sueño Asociados a EM

Los desórdenes del sueño vinculados como co-morbilidad a EM son síndrome de piernas inquietas, desórdenes del ritmo circadiano, desorden del comportamiento del sueño de movimientos oculares rápidos y narcolepsia- Cataplexia. El último desorden se amplía a continuación, teniendo en cuenta que presenta mayor relación con el desarrollo de la presente investigación.

4.2.1. Narcolepsia- Cataplexia

La Narcolepsia es un desorden del sueño MOR (Akintomide & Rickards, 2011), caracterizado por la tétrada narcoléptica clásica compuesta por excesiva somnolencia, cataplexia, parálisis del sueño y alucinaciones hipnagógicas. La disrupción nocturna del sueño es usual en humanos con narcolepsia (American Academy of Sleep Medicine, 2005).

La cataplexia consiste en una intrusión del sueño MOR, acompañado de atonía, en la vigilia, esta podría resultar como consecuencia de una activación excesiva de la vía inhibitoria descendente motora, que se encuentra activada durante fuertes emociones o durante el sueño MOR (De la Herrán-Arita, Guerra-Crespo, & Drucker-Colín, 2011).

La asociación entre EM y el CMH, ha sido descrita desde 1970, involucrando notablemente la clase II del CMH. Las moléculas CMH son fundamentales en la selección y el establecimiento del repertorio de antígenos específicos de células T, así como de la activación de estas células durante el inicio de la respuesta inmune (Kouri et al., 2011). De esta manera el vínculo de este componente genético con los trastornos del sueño como narcolepsia y cataplexia no resulta extraño que la narcolepsia asociada a deficiencia de hipocretina hipotalámica (Vetrugno et al., 2009a) ha sido vinculada a polimorfismos de HLA DQB1*0602 y del receptor de células T (TCR) (Kornum, Faraco, & Mignot, 2011; Overeem, Black, & Lammers, 2008) y por lo tanto se encuentra estrechamente relacionado con progresión y severidad en EM.

Las hipocretinas 1 y 2, son neuropéptidos hipotalámicos, que intervienen en la regulación de los ciclos de vigilia- sueño. Entre las áreas del cerebro a las que las neuronas productoras de hipocretina se proyectan, se encuentran: el locus ceruleus, núcleo tuberomamilar, núcleo del rafe y el área ventral tegmental. Estas áreas secretan norepinefrina, histamina, serotonina y dopamina respectivamente. Es por esta razón que la deficiencia de hipocretina podría conducir a un funcionamiento anormal de este sistema y en consecuencia produciría anomalías del sueño MOR y excesiva somnolencia durante el día. Aunque estas no son las únicas áreas a las cuales las neuronas hipocretinérgicas se proyectan, también lo hacen a hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza cerebral y tálamo (Akintomide & Rickards, 2011). El tipo de lesiones encontradas en pacientes con EM corresponde generalmente a lesión inflamatoria hipotalámica (Caminero & Bartolomé, 2011; Vetrugno et al., 2009a). La narcolepsia con cataplexia en humanos se encuentra asociada a pérdida de células productoras de hipocretina del hipotálamo lateral y posterior así como una marcada reducción en el nivel de hipocretina 1 en el fluido cerebroespinal (Plazzi et al., 2011). Se ha demostrado que lesiones del hipotálamo lateral inducen un incremento en el sueño de ondas lentas e intrusión del sueño MOR durante la vigilia, exhibiendo características del fenotipo narcoléptico (De la Herrán-Arita et al., 2011).

Otro factor importante en la narcolepsia en EM, resulta ser el TNF α , el cual al ser una citoquina proinflamatoria, ha sido involucrado en la regulación de ciclo de vigilia/sueño, demostrando que la inhibición del sistema de hipocretina promueve la aparición de narcolepsia, (Zhan et al., 2011)

4.3. Modelo de desmielinización por Cuprizona

Historicamente las lesiones y la patología desarrollada en EM ha sido atribuida a la activación de linfocitos CD4, CD8, linfocitos B y monocitos de la circulación periférica que migran a través de la barrera hematoencefálica para ejercer un efecto citotóxico directo o indirecto sobre la mielina, los oligodendrocitos y los procesos neurales en el SNC. Este concepto ampliamente aceptado ha sido influenciado por el modelo de encefalomielitis autoinmune experimental, en el cual tanto la inmunización con antígenos de mielina, como la inyección de líneas de células T con antígenos específicos de mielina produce una desmielinización inflamatoria en el sistema nervioso central.

A pesar de esto, estudios recientes han demostrado que la pérdida de oligodendrocitos y neuronas se inicia en fases tempranas de la enfermedad. La patología afecta tanto la materia blanca como la materia gris y se ha evidenciado que la discapacidad clínica se encuentra más correlacionada con todo un proceso neurodegenerativo; estas nuevas observaciones han promovido diferentes revisiones del concepto clásico de esclerosis múltiple y han facilitado el cambio de uso del modelo de encefalomielitis autoinmune experimental, por el uso de otros modelos como el de desmielinización por cuprizona. (Acs & Kalman, 2012).

Se usó el modelo de desmielinización por cuprizona para el desarrollo de este trabajo, dado que: la lesión del tejido en materia gris y en materia blanca, la desmielinización y la remielinización, coinciden con la evolución de las lesiones vistas en EM, lo cual establece una mayor similitud entre el modelo animal y la

patología en humanos, permitiendo que la caracterización de la arquitectura del sueño en el modelo animal sea de gran utilidad en su uso para la comprensión de alteraciones de sueño o desarrollo de terapéuticas en sueño que tengan en cuenta la patología desmielinizante.

El modelo de cuprizona es un modelo de des- y re-mielinización secundaria a muerte oligodendrocítica, donde el efecto tóxico está mediado a través de la inhibición del cobre dependiente a enzimas mitocondriales en la cadena respiratoria. La administración a roedores del agente quelador de cobre, cuprizona (Bis-cyclohexanona oxaldihidrazona), induce la muerte oligodendrocítica generalizada y desmielinización tanto en materia gris como en materia blanca. La remielinización ocurre de forma rápida y espontánea después de la finalización de la exposición a cuprizona (Wergeland, Torkildsen, Myhr, Mørk, & Bø, 2012).

El cambio más notable en este modelo a nivel celular es la formación de una mega mitocondria, la cual es consecuencia de una deficiencia en la actividad del cobre, un componente crucial de la fosforilación oxidativa; el cobre es requerido para el transporte de electrones en la citocromo oxidasa (Matsushima & Morell, 2001).

Dado que la cuprizona induce alteraciones metabólicas en los oligodendrocitos, es posible que este agente conduzca a muerte celular mediada por el factor inductor de apoptosis, independiente de caspasas, involucrando un mecanismo mitocondrial.

La masiva apoptosis oligodendrocítica es seguida por una extensiva desmielinización. La pérdida de mielina es precedida y acompañada por una regulación a la baja de proteínas relacionadas con mielina. La desmielinización afecta tractos de materia blanca como el cuerpo calloso y el pedunculo cerebelar superior y otras regiones en las que se incluyen el hipocampo, el putamen, el cerebelo y en general diferentes áreas de materia gris, hasta en la corteza (Acs & Kalman, 2012).

Otra característica patológica prominente es la asociada con la invasión de células microgliales activadas en áreas desmielinizadas. Estas células se originan desde la microglia residente, sin embargo, investigadores han reportado que macrófagos migrantes desde la sangre también contribuyen al marcado número de células fagocíticas observadas con mayor abundancia alrededor de la tercera semana de tratamiento con cuprizona. Estas células son responsabilizadas de amplificar la muerte celular oligodendroglial por la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias (Acs & Kalman, 2012).

Después de 5-6 semanas de intoxicación con cuprizona, el cuerpo calloso está casi completamente desmielinizado, en un proceso llamado desmielinización aguda. Si la administración de la cuprizona es prolongada por 12-13 semanas o más, se produce una desmielinización crónica que involucra otras áreas como hipocampo, cerebelo, núcleo caudado y sorprendentemente también son afectadas regiones de materia gris en corteza y formación hipocámpal (Zendedel, Beyer, & Kipp, 2013)

Las características histopatológicas de la desmielinización inducida por cuprizona son cercanamente parecidas a las definidas en las lesiones tipo III de EM. Las similitudes más significativas incluyen una prominente apoptosis oligodendrocítica y activación microglial en las lesiones desmielinizantes.

Adicionalmente, el modelo comparte características comunes con el desarrollo de lesiones en fases tempranas de la EM, en donde inicialmente ocurre apoptosis oligodendrocítica en regiones con mielina intacta (Acs & Kalman, 2012).

Considerando las características histopatológicas mencionadas anteriormente, el modelo de cuprizona se considera adecuado para el estudio de los mecanismos básicos de la desmielinización aguda y crónica y la remielinización, en esclerosis múltiple (Acs & Kalman, 2012).

5. Capítulo 5: Metodología

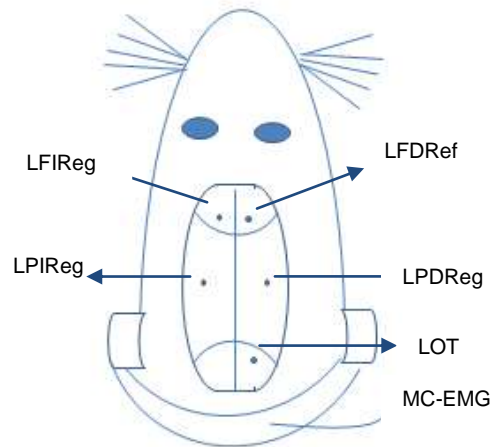
Se utilizaron 8 animales de 10 semanas de edad derivados de ratas Wistar del Laboratorio Charles Rivers US, con un peso aproximado de 350 \pm 50 g, obtenidas en el bioterio del Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento (Universidad de los Andes, Bogotá), donde fueron albergados bajo idénticas condiciones ambientales controladas, de temperatura, con ciclos de luz/oscuridad invertido de 12:12 horas, con acceso a agua y comida *ad libitum*, siguiendo las normas establecidas para el mantenimiento y uso de animales de experimentación. La variabilidad generada por diferentes factores en el experimento fue minimizada al utilizar animales en las mismas condiciones de cepa, edad, sexo, peso y condiciones de manutención.

Los sujetos fueron divididos en grupo experimental y grupo control. Los animales del primer grupo fueron sus propios controles para los registros electrofisiológicos en la implementación del modelo de desmielinización por cuprizona y contaron con grupo control para los estudios histológicos.

5.1. Implantación de electrodos y registro de actividad electrofisiológica

El procedimiento quirúrgico en el grupo experimental se inició con inducción de anestesia con Ketamina 75 mg/kg y Xilacina 10 mg/Kg IP. La profundidad de la anestesia fue monitoreada por medio del control de la respuesta motora al estímulo producido por la presión en la pata y por monitoreo de la función cardíaca y respiratoria. La temperatura corporal se mantuvo a 37°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) usando una manta termoregulada. Se administraron 5 ml de Lactato de Ringer vía subcutánea (SC) al inicio del procedimiento quirúrgico y se aplicó ungüento oftálmico para prevenir deshidratación corneal.

Después de rasurar el campo quirúrgico y fijar la cabeza en el marco estereotáxico, se realizó incisión en la porción correspondiente a la línea media craneal, para exponer el área de trepanación. Los electrodos fueron ubicados, 1 Lóbulo Frontal izquierdo de registro (LFIReg), 1 Lóbulo Frontal Derecho de Referencia (LFDRef), 1 Lóbulo parietal derecho de registro (LPDReg), 1 Lóbulo parietal izquierdo de registro (LPIReg), 1 Lóbulo Occipital Tierra (LOT) como se ilustra en la Figura 5-1, de acuerdo a las suturas de referencia determinadas en el atlas de Paxinos, para el cráneo de la rata (Paxinos, Watson, Carrive, Kirkcaldie, & Ashwell, 2009). Se implantó un electrodo en un músculo cervical para registro de electromiografía. Los electrodos fueron adheridos al cráneo con cemento acrílico dental.

Figura 5-1: Ubicación de electrodos implantados grupo experimental

LFDRef: Lóbulo frontal derecho referencia, LFIReg: Lóbulo frontal izquierdo registro, LPIReg: Lóbulo Parietal Izquierdo Registro, LPDReg: Lóbulo Parietal Derecho Registro, LOT: Lóbulo Occipital tierra. MC-EMG: Musculo Cervical- Electromiografía.

Se aplicó gentamicina tópica como profiláctico en la piel que circunda el implante de acrílico y como analgésico se usó Flunixin Meglumina 1,1 mg/Kg/día SC y Enrofloxacin 10 mg/kg/día SC administrados durante 3 días a partir de la cirugía.

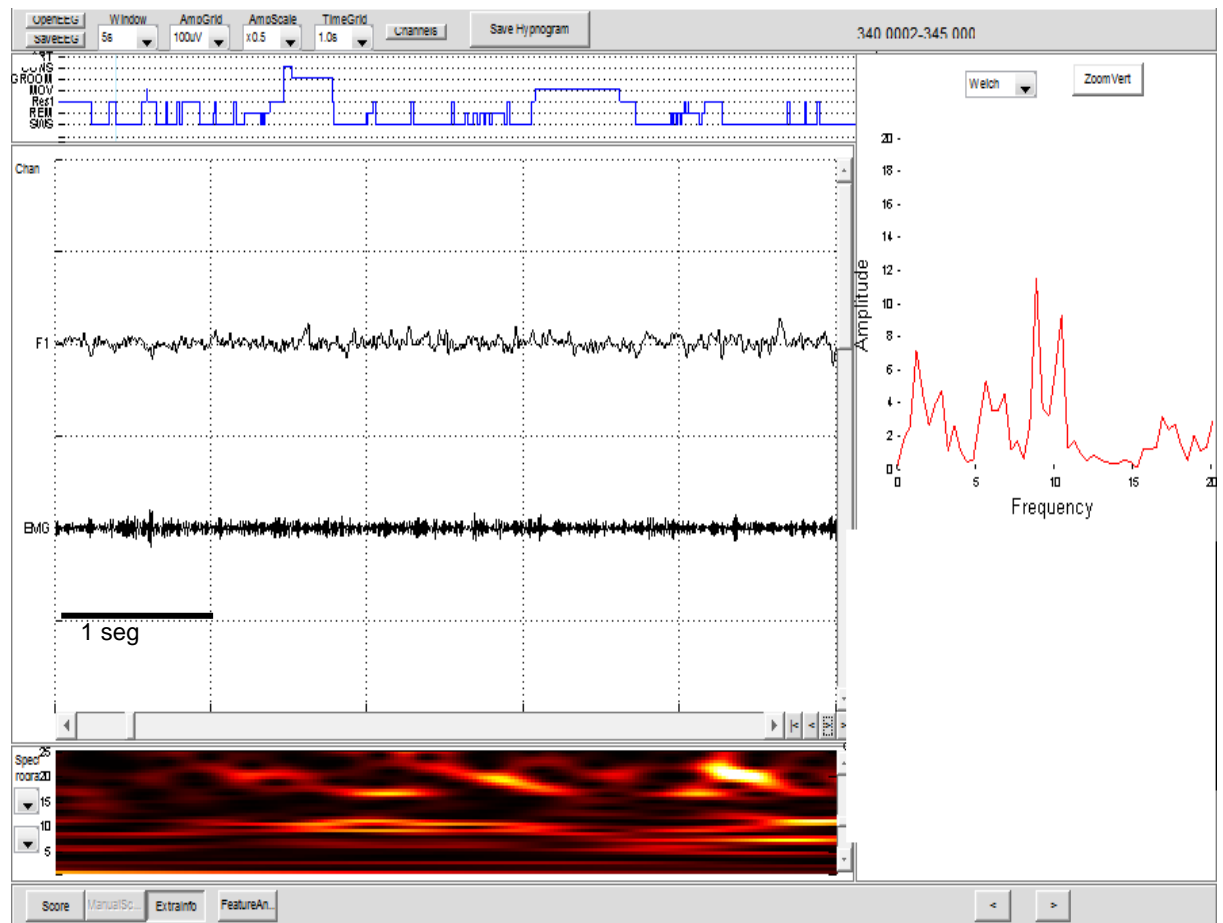
Luego del procedimiento se mantuvieron las ratas en condiciones de libre desplazamiento en cajas individuales, de 26.5 cm x 34 cm. Se permitió la recuperación por siete días y se inició habituación con el porte de chaleco en los 3 días previos al inicio de los registros. Esta habituación posibilitó la portabilidad en el lomo de la rata, del amplificador de la señal, equipo W16-HS wireless system de Multichannel systems. Los registros de electroencefalografía y electromiografía se llevaron a cabo en períodos continuos de 72 horas, previos al inicio del tratamiento con cuprizona y a la semana 8 postratamiento. Se registró manualmente el comportamiento de la rata, observado por transmisión de video y se clasificó en sus principales actividades: comida, bebida, acicalamiento, movimiento libre en caja y reposo.

5.2. Registros de EEG Y EMG- Análisis de datos de sueño

Después de 4 días de recuperación posquirúrgica y 3 días de habituación previa con chaleco, las ratas fueron conectadas al microamplificador W16-HS, a través de un conector Omnetics que permitió su portabilidad en el bolsillo ubicado en el lomo y el libre desplazamiento de la rata para los registros de 24 horas por tres días consecutivos. Las señales de EEG y EMG tuvieron una frecuencia de muestreo de 4000Hz para los registros y de 400 Hz, para la calificación de las señales obtenidas. Se utilizaron para EMG filtros de 50-99 Hz y 0.5-49 Hz para EEG. Los datos polisomnográficos fueron analizados a través del software PSGLab (Desarrollado para análisis de señales en Humanos por Miguel Navarrete, PhD Universidad de los Andes, y modificado para análisis de señales en ratas por Alejandro Osorio MSc Universidad de los Andes). Se realizó transformación de Fourier para el análisis espectral del poder de EEG a través de banda de frecuencia de EEG delta (0.5-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12Hz) sigma (12-15 Hz) y beta (15-30 Hz).

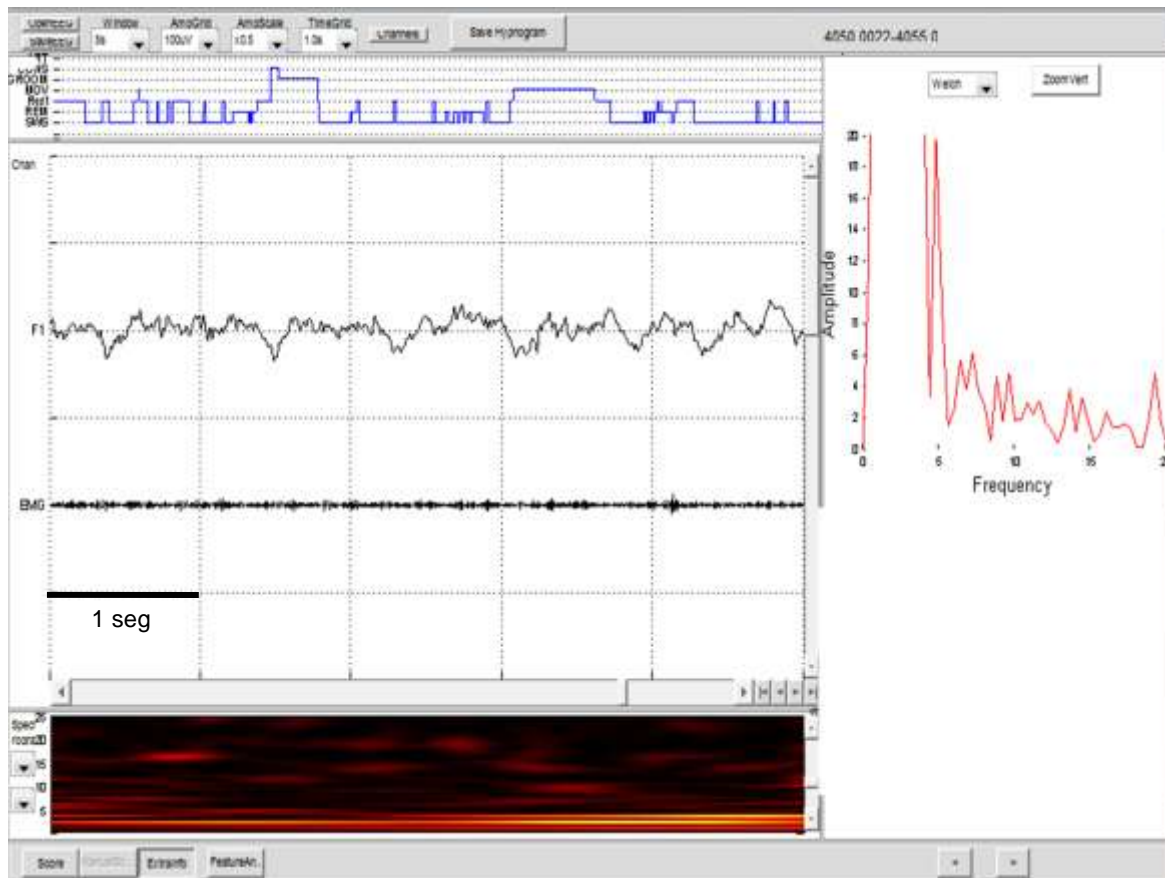
Cada uno de los estados fue analizado semi-automáticamente en períodos de 2 segundos y clasificados como vigilia (Figura 5-2: Análisis vigilia), sueño no MOR (Figura 5-3: Análisis sueño No MOR) y MOR (Figura 5-4: Análisis sueño MOR), los cuales fueron confirmados visualmente y corregidos de ser necesario. Se analizó el porcentaje de sueño no MOR, porcentaje de sueño MOR, porcentaje de actividad, así como la duración de episodios MOR (Deurveilher, Rusak, & Semba, 2011; Hodor, Palchykova, Gao, & Bassetti, 2015).

Figura 5-2: Análisis Vigilia



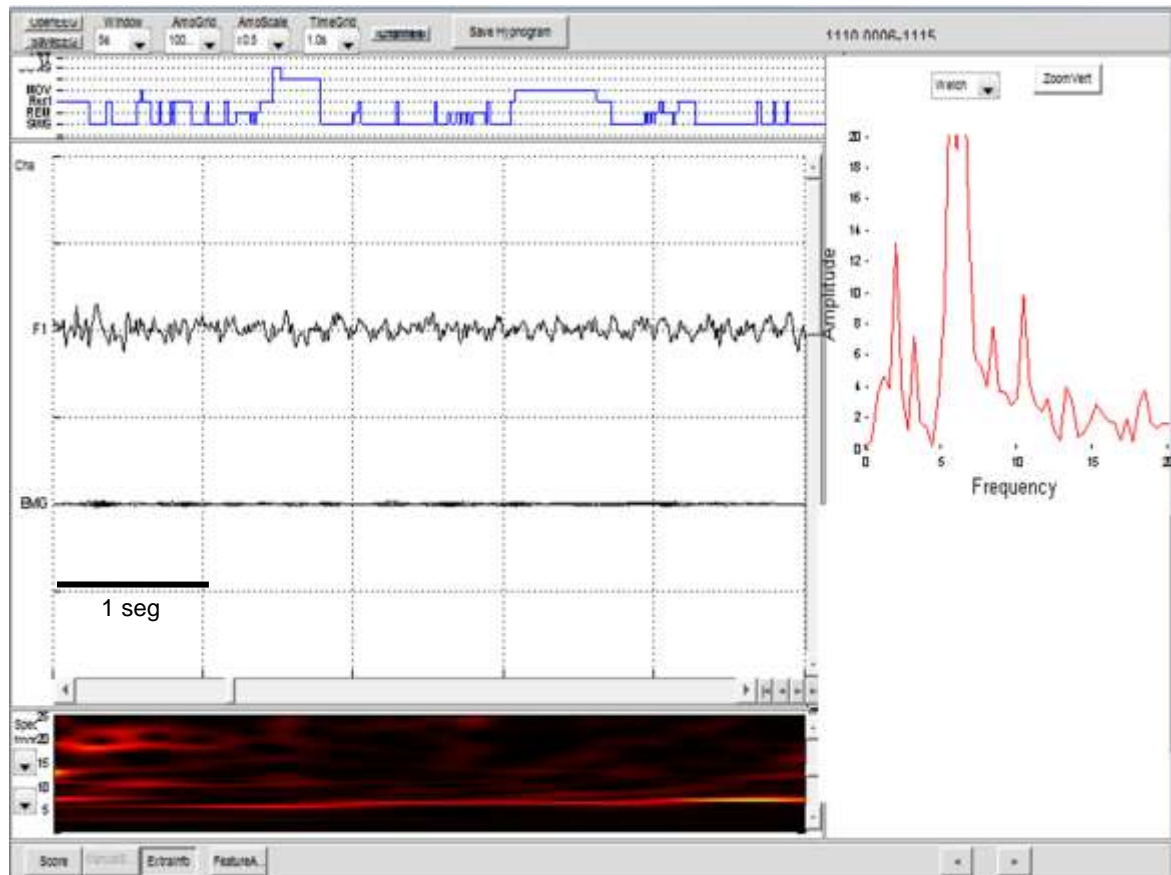
La imagen corresponde al registro de la actividad eléctrica cerebral obtenida a través de electrodos transcraneales, en el estado de vigilia. Cada cuadrado trazado en la figura donde se presentan la actividad electroencefalográfica de cada canal, corresponden a 1 seg, la grafica correspondiente a la parte superior de la figura corresponde la construcción del etograma y la grafica del costado derecho de la figura corresponde al espectro de la señal de EEG obtenido del electrodo frontal izquierdo a través del método de Welch, que presentó predominancia en la frecuencia alfa.

Figura 5-3: Análisis sueño No MOR



La imagen corresponde al registro de la actividad eléctrica cerebral obtenida a través de electrodos transcraneales, en el estado NMOR. Cada cuadrado trazado en la figura donde se presentan la actividad electroencefalográfica, corresponden a 1 seg, la grafica correspondiente a la parte superior de la figura corresponde la construcción del etograma y la grafica del costado derecho de la figura corresponde al espectro de la señal de EEG obtenido del electrodo frontal izquierdo a través del método de Welch, que presentó predominancia en la frecuencia delta.

Figura 5-4: Análisis sueño MOR



La imagen corresponde al registro de la actividad eléctrica cerebral obtenida a través de electrodos transcraneales, en el estado NMOR. Cada cuadrado trazado en la figura donde se presentan la actividad electroencefalográfica de cada canal, corresponden a 1 seg, la grafica correspondiente a la parte superior de la figura corresponde la construcción del etograma y la grafica del costado derecho de la figura corresponde al espectro de la señal de EEG obtenido del electrodo frontal izquierdo a través del método de Welch, que presentó predominancia en la frecuencia theta.

5.3. Administración de Cuprizona

Se administró una dosis de 2g/kg/día de cuprizona por rata vía oral durante 8 semanas a partir del día posterior al registro electrofisiológico basal. El tóxico fue mezclado con 700 mg aprox. de comida húmeda K/D de Hills®, prescription diet LabDiet® auto-clavable para roedores. Se monitoreó el peso de las ratas diariamente controlando que no excediera una pérdida del 20% del peso corporal al final de la administración (Acs & Kalman, 2012), ya que esto se consideró como criterio de punto final en el experimento.

5.4. Evaluación de coordinación motora y equilibrio

Con la finalidad de evaluar déficits sutiles en habilidades motoras y en equilibrio, se usó la viga de equilibrio (Luong, Carlisle, Southwell, & Patterson, 2011). Esta prueba consiste en dos vigas angostas, de 12 y 6 mm de ancho con 1 m de largo, que se encuentran elevadas a 50 cm del suelo, por las cuales la rata debe caminar una longitud de 80 cm hacia una plataforma de seguridad (Luong et al., 2011).

Inicialmente la rata debe caminar por la viga de 12 mm a partir de la primera porción (20 cm) que debe encontrarse marcada con el fin de iniciar la determinación del tiempo en que se demora en cruzar los 80 cm hasta alcanzar la caja de seguridad. Esto lo debe hacer en tres intentos consecutivos, descansando 15 segundos en la caja de seguridad antes del próximo intento. En cada intento se limpia el instrumento con alcohol al 10% y se coloca un pellet como incentivo en la caja de seguridad. Luego se repite el procedimiento en la viga de 6 mm. El test se realiza en 2 días de entrenamiento y 1 día de prueba (Luong et al., 2011).

El desempeño en la viga es cuantificado a través del promedio del tiempo que toma la rata en atravesar los 80 cm de longitud de la viga y el puntaje obtenido en los tres intentos (Korayem, Abdo, Naim, Yones, & Hosny, 2014; Luong et al., 2011).

La prueba es evaluada con una puntuación de 1 a 5, así (Korayem et al., 2014):

5: Camina la viga de equilibrio sin problemas, no necesita verificar el equilibrio, no realiza pausas y completa el recorrido hasta la caja de seguridad en seis segundos.

4: Camina sobre la viga, pero la marcha es inestable, completa el recorrido hasta la caja de seguridad dentro de seis segundos.

3: Camina sobre la viga pero es inestable, puede hacer pausas en la marcha una o más veces. Le toma más de seis segundos completar el recorrido hasta la caja de seguridad.

2: Camina sobre la viga, pero es muy inestable, casi hasta el punto de caerse de ella, puede pausar la marcha una o más veces y/o le toma más de seis segundos completar el recorrido hasta la caja de seguridad.

1: Se cae de la viga antes de completar el recorrido hasta la caja de seguridad.

0: Se cae inmediatamente de la viga.

5.5. Histología

En el día siguiente al haber completado las 8 semanas de administración de cuprizona, posterior al registro electroencefalográfico de 72 horas y a la última evaluación en la viga de equilibrio, se procedió a sacrificar las ratas, previa anestesia con Ketamina 75 mg/Kg y Xilacina 10 mg/Kg IP con el fin de realizar fijación del tejido con paraformaldehído mediante perfusión trans-cardiaca (Ver Anexo A), y se inició el protocolo de tinción con Sudan Black b para marcar mielina, descrito en el anexo B.

5.6. Análisis Estadístico

Los datos de polisomnografía obtenidos en el software PSG-Lab fueron exportados al software de análisis estadístico SPSS, versión 19.0 (2010). Se realizó prueba t y prueba de wilcoxon de muestras pareadas para hallar las diferencias en la línea base con respecto al postratamiento en los registros de sueño.

Se realizó transformación de valor z o “z -score”, para el análisis de los tiempos de sueño MOR, con el fin de normalizar los datos de la fase pre y post-experimental, y así poder realizar la comparación correspondiente de los tiempos de episodios MOR.

Los resultados de la intensidad de densidad obtenidos a través del software Image J, fueron analizados con prueba t de muestras independientes, con el fin de determinar diferencias entre el grupo experimental y el grupo control.

Se utilizó la prueba Friedman χ^2 , de medidas repetidas, con el fin de analizar el efecto del tratamiento sobre la prueba de la viga de equilibrio en la medición basal, a la semana 4 postratamiento y a la semana 8 postratamiento.

6. Capítulo 6: Resultados

6.1. Arquitectura del sueño

El sueño MOR incrementa de 5,9% a 8,9% en el postratamiento, el sueño NMOR incrementa de 37,7% a 47,7% y la vigilia decrece de 56,22% a 44,07%. En el periodo de luz (5:00 p.m. a 5:00 a.m.) oscuridad (5:00 a.m. a 5:00 p.m.), los resultados reflejaron una diferencia significativa en el aumento de sueño MOR en el período de oscuridad después del tratamiento, comparado con el pre tratamiento. Se demuestra una correspondencia de estos resultados con lo obtenido en el registro continuo de 72 horas, pese a no tener diferencias significativas, sí se evidencia una tendencia al aumento del sueño MOR $p=0,68$. (Ver Tabla 6-1 y Figura 6-1)

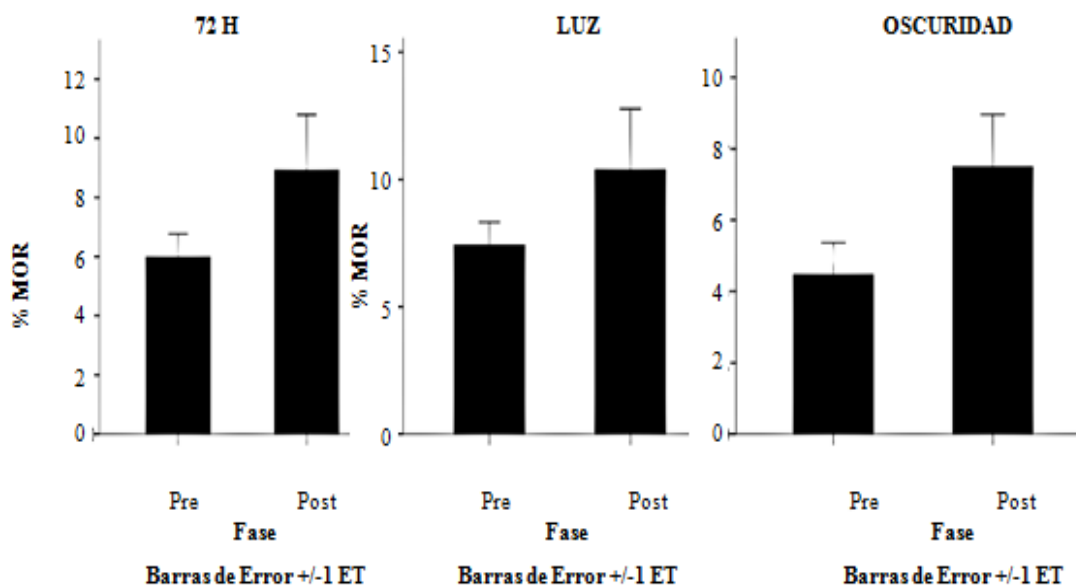
Tabla 6-1. Estadística Arquitectura del Sueño

Periodo de Luz/ Oscuridad		Estadística descriptiva				Shapiro-Wilk				Prueba de Levene		Prueba t/ Wilcoxon	
		Pre		Post		Post		Pre		F	p	t/z	p
		Media	Desv. tip.	Media	Desv. tip.	W	p valor	W	p valor				
72H	Porcentaje NMOR	37,7932	5,44029	47,0042	4,64888	0,786	0,079	0,944	0,678	0,021	0,89	*-2,033	0,135
	Porcentaje MOR	5,9792	1,57648	8,919	3,7522	0,885	0,362	0,99	0,958	11,574	0,014	°-1,826	0,068
	Porcentaje vigilia	56,22	5,711609	44,0768	4,125247	0,959	0,771	0,99	0,956	8,082	0,029	°-1,461	0,144
Luz	Porcentaje NMOR	43,764	9,30289	52,843	4,38246	0,865	0,283	0,813	0,127	*1,624	0,25	*-1,464	0,239
	Porcentaje MOR	7,4225	1,79924	10,367	4,80955	0,89	0,382	0,975	0,875	14,196	0,009	°-,730	0,465

Periodo de Luz/ Oscuridad		Estadística descriptiva				Shapiro-Wilk				Prueba de Levene		Prueba t/ Wilcoxon	
Porcentaje vigilia	48,813 5	10,03122 7	36,79	4,673273	0,87 3	0,30 8	0,79 7	0,09 7	2,367 5	0,17	*0,445	0,68 6	
Oscuridad Porcentaje NMOR	31,564 4	3,05573	41,334	5,28642	0,93 4	0,61 8	0,76 9	0,05 7	0,676 2	0,44	*-	0,09 9	
Porcentaje MOR	4,4633	1,80895	7,494	2,93368	0,92 2	0,54 7	0,86 6	0,28 3	1,612 1	0,25	*-	0,02 5	
Porcentaje vigilia	63,972 3	4,469976 8	51,172	4,456579 7	0,77 1	0,06	0,95 8	0,76 8	5,112 4	0,06	*1,397	0,25 7	

Nota: Pre: Grupo experimental pretratamiento Pos: Grupo experimental postratamiento. Desv. tip: Desviación Típica. t= estadístico prueba t, z= estadístico prueba de wilcoxon. * resultado obtenido mediante prueba paramétrica. ° resultado obtenido mediante prueba no paramétrica y p= nivel de significancia < 0.05.

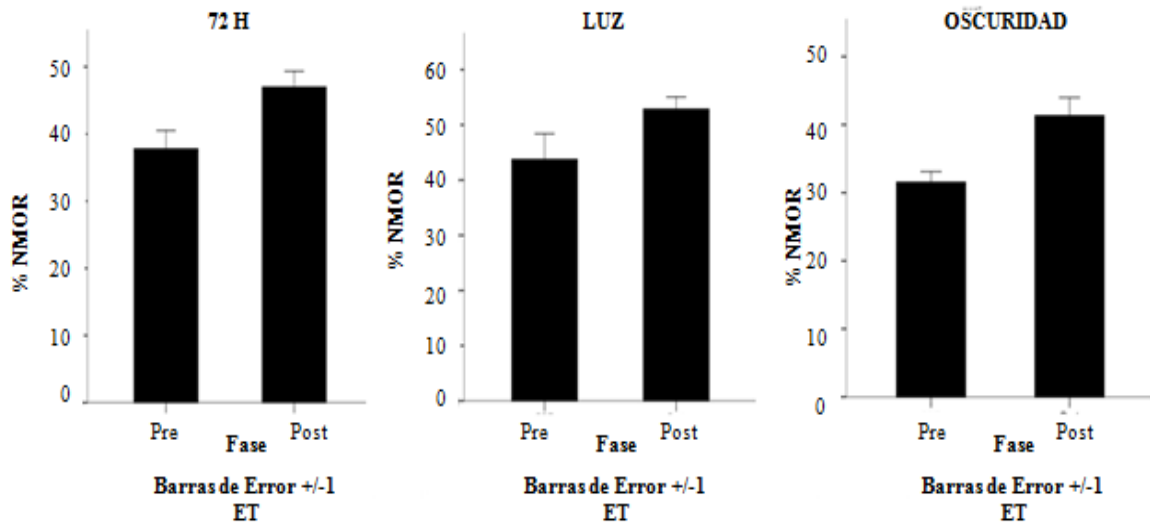
Figura 6-1. Porcentaje de sueño MOR



Pre: Grupo experimental pretratamiento Pos: Grupo experimental postratamiento.

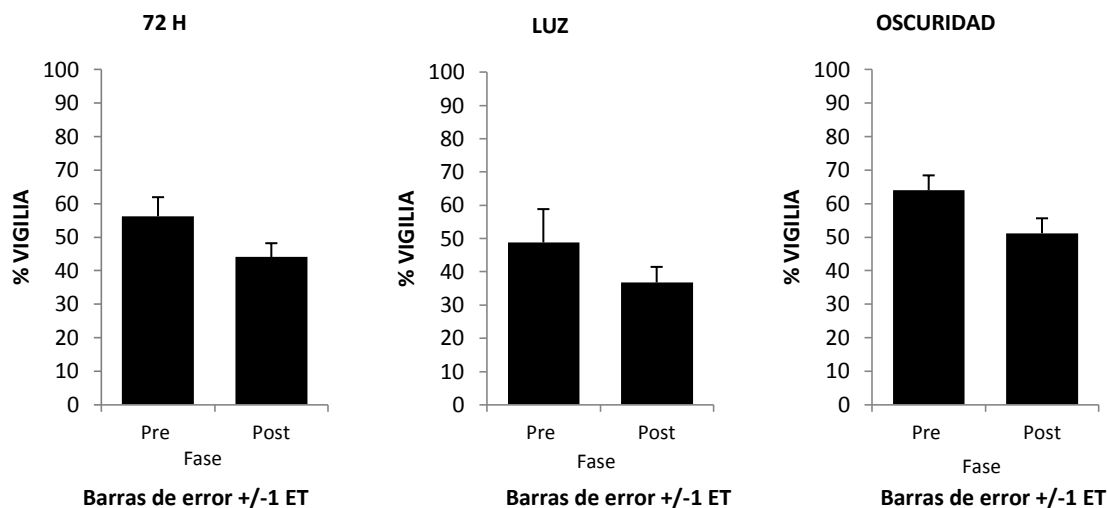
Los resultados obtenidos muestran una diferencia estadísticamente significativa en periodo de oscuridad $p=0,025$ evidenciando un aumento del sueño MOR de 4,46% en el pretratamiento a 7,49% luego del tratamiento con cuprizona

Figura 6-2. Porcentaje de sueño NMOR



Pre: Grupo experimental pretratamiento Pos: Grupo experimental postratamiento.

Los resultados para sueño NMOR, muestran una tendencia al aumento de esta fase de sueño en periodo de oscuridad 31,564% en el pretratamiento a 41,334% luego del tratamiento con cuprizona $p= 0,099$, sin diferencias significativas para el periodo de luz- oscuridad, ni para las 72 horas. (Ver Figura 6-2)

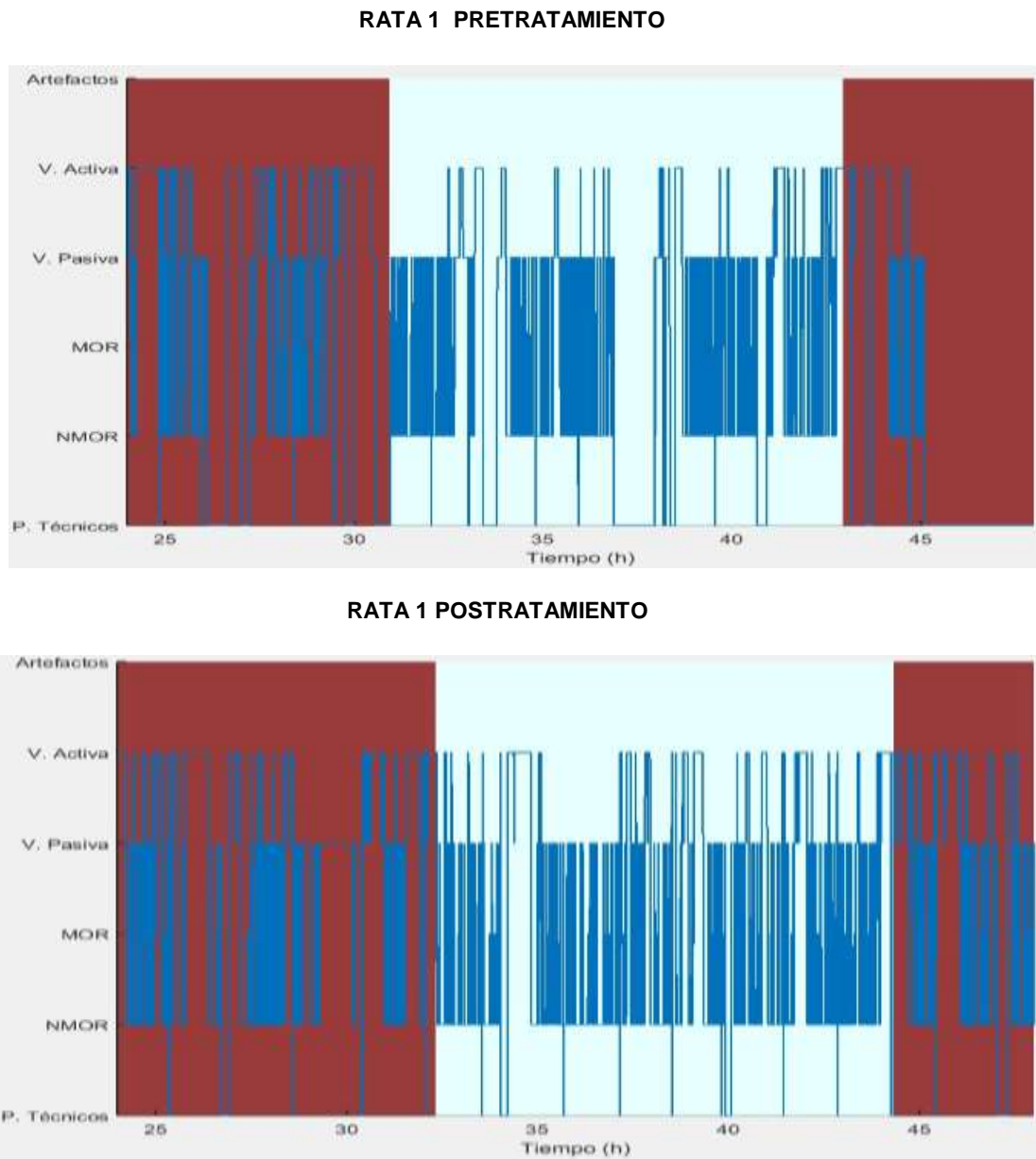
Figura 6-3. Porcentaje de vigilia

Pre: Grupo experimental pretratamiento Pos: Grupo experimental postratamiento.

Los hallazgos obtenidos con respecto al porcentaje de vigilia no muestran diferencias estadísticamente significativas, sin embargo se observa una disminución de éste en el postratamiento vs el pretratamiento evidenciado en los valores de las medias. Para las 72 horas disminuye a 44,07% respecto a un 56,22 %. En periodo de luz disminuye a 48,8% respecto a un 36,79% y en periodo de oscuridad disminuye a 51,1% respecto a 63,9% del pretratamiento. (Ver Figura 6-3)

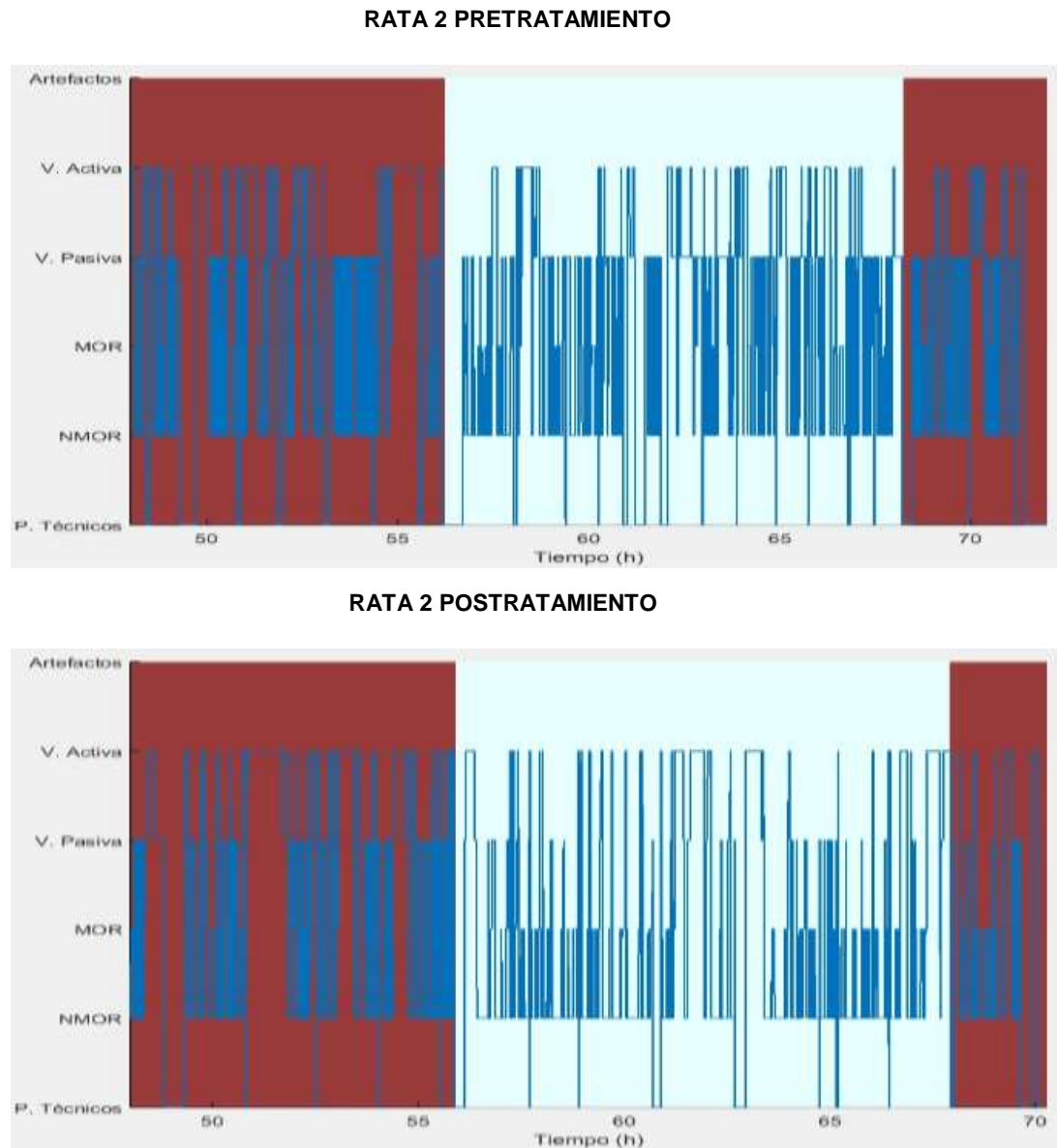
Los hipnogramas obtenidos en el análisis polisomnográfico realizado a cada una de las ratas durante 72 horas, corresponden al registro grafico de los resultados anteriormente descritos, los cuales son presentados en periodos de 24 horas y evidencian aumento del sueño MOR y tendencia al aumento de NMOR a expensas de la vigilia en el postratamiento (Ver Figura 6-4 a Figura 6-7)

Figura 6-4. Hipnogramas Rata 1



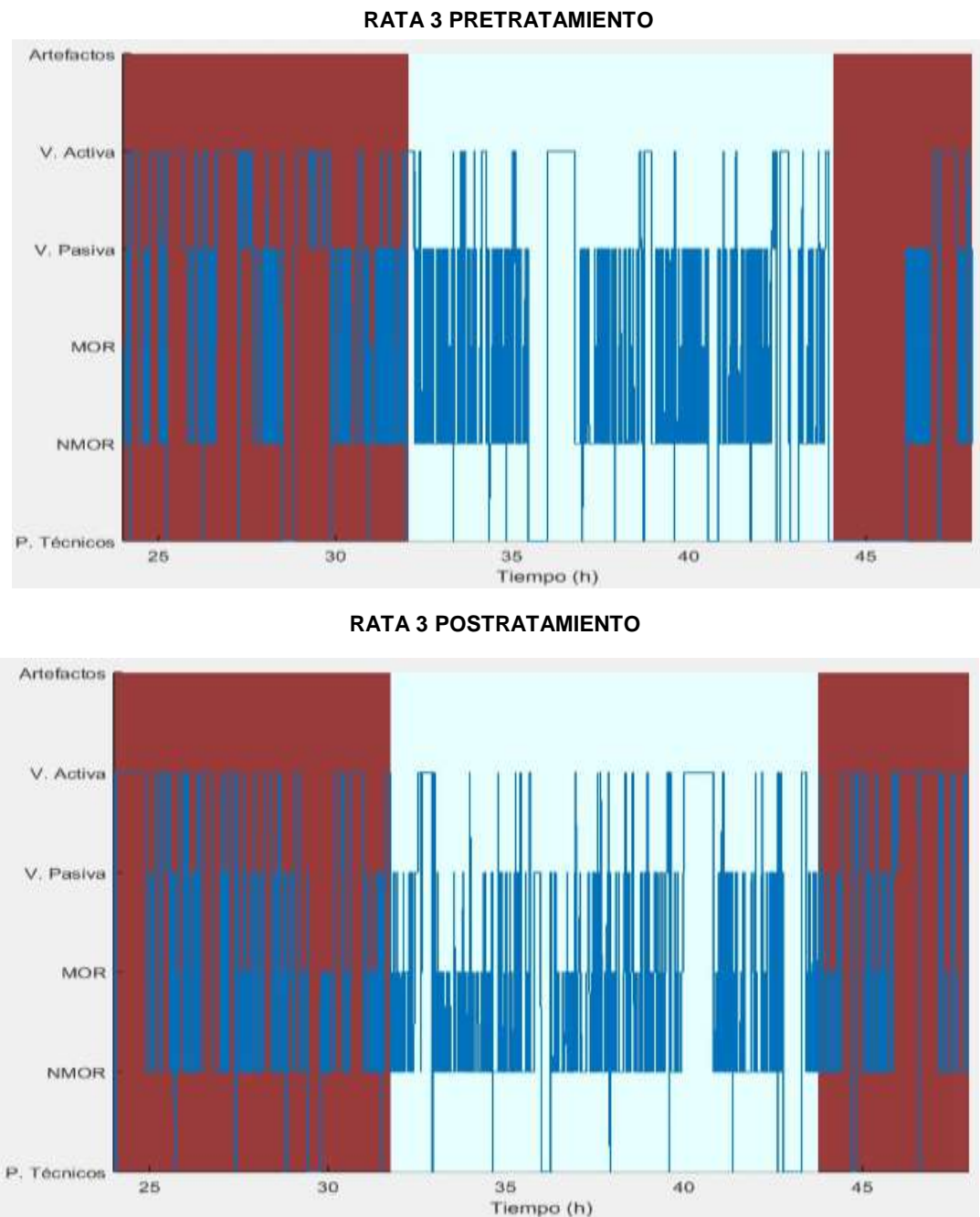
En el eje Y, Artefactos, V. Activa: Vigilia activa, V Pasiva: Vigilia pasiva, MOR: Movimientos Oculares Rápidos, NO MOR: No movimientos oculares rápidos, P Técnicos: Problemas técnicos Tiempo (h): Tiempo en horas presentado en intervalos de 5 horas en periodos de 24 h. El espacio marcado en color azul claro corresponde al periodo de luz y el espacio en rojo corresponde al periodo de oscuridad de la rata. En los hipnogramas se observa el comportamiento del sueño de la Rata 1. La gráfica superior corresponde al registro polisomnográfico pretratamiento y la gráfica inferior corresponde al postratamiento.

Figura 6-5 Hipnogramas Rata 2

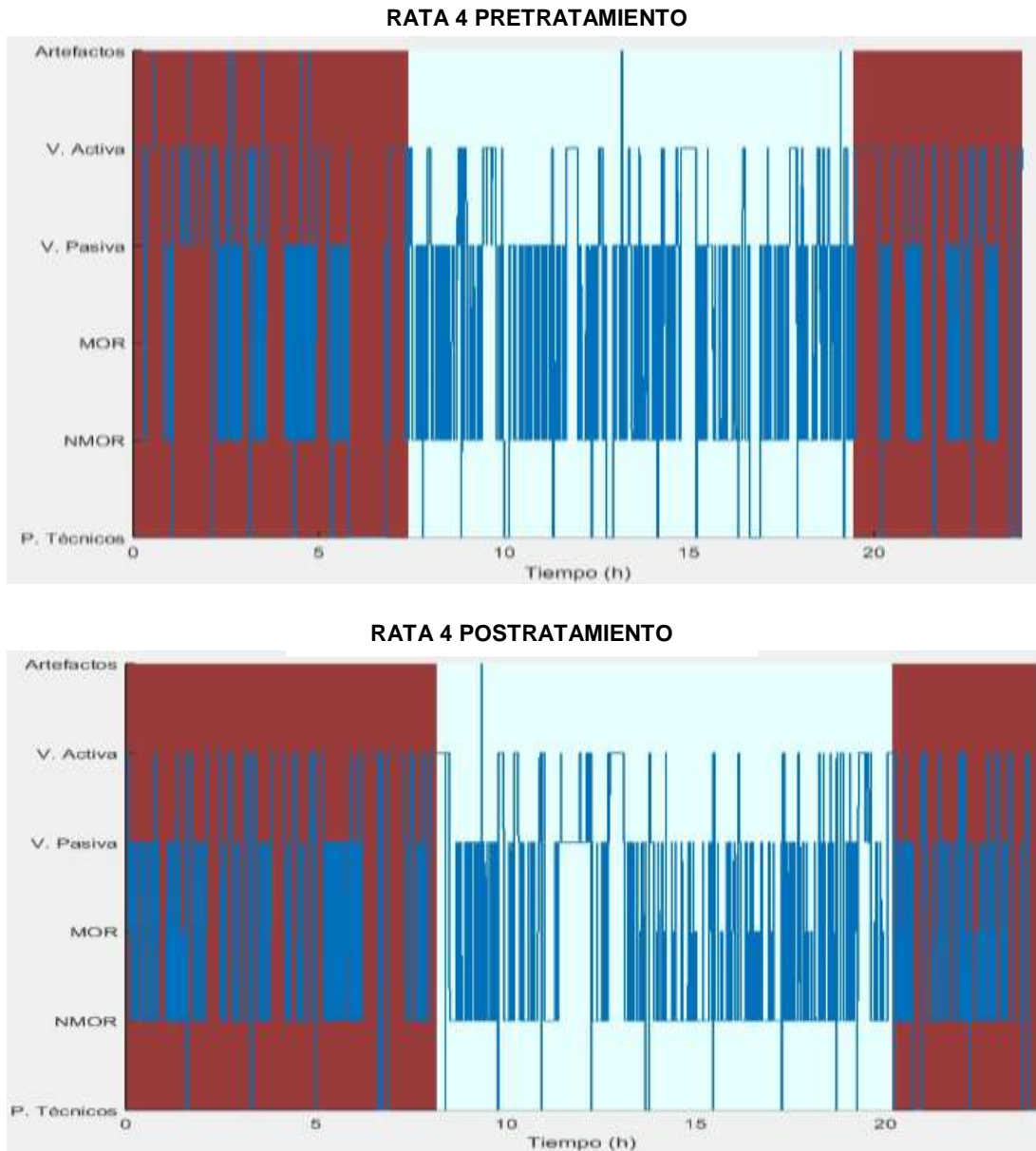


En el eje Y, Artefactos, V. Activa: Vigilia activa, V Pasiva: Vigilia pasiva, MOR: Movimientos Oculares Rápidos, NO MOR: No movimientos oculares rápidos, P Técnicos: Problemas técnicos Tiempo (h): Tiempo en horas presentado en intervalos de 5 horas en periodos de 24 h. El espacio marcado en color azul claro corresponde al periodo de luz y el espacio en rojo corresponde al periodo de oscuridad de la rata. En los hipnogramas se observa el comportamiento del sueño de la Rata 2. La gráfica superior corresponde al registro polisomnográfico pretratamiento y la gráfica inferior corresponde al postratamiento.

Figura 6-6 Hipnogramas Rata 3



En el eje Y, Artefactos, V. Activa: Vigilia activa, V Pasiva: Vigilia pasiva, MOR: Movimientos Oculares Rápidos, NO MOR: No movimientos oculares rápidos, P Técnicos: Problemas técnicos Tiempo (h): Tiempo en horas presentado en intervalos de 5 horas en periodos de 24 h. El espacio marcado en color azul claro corresponde al periodo de luz y el espacio en rojo corresponde al periodo de oscuridad de la rata. En los hipnogramas se observa el comportamiento del sueño de la Rata 3. La gráfica superior corresponde al registro polisomnográfico pretratamiento y la gráfica inferior corresponde al postratamiento.

Figura 6-7. Hipnogramas Rata 4

En el eje Y, Artefactos, V. Activa: Vigilia activa, V Pasiva: Vigilia pasiva, MOR: Movimientos Oculares Rápidos, NO MOR: No movimientos oculares rápidos, P Técnicos: Problemas técnicos Tiempo (h): Tiempo en horas presentado en intervalos de 5 horas en periodos de 24 h. El espacio marcado en color azul claro corresponde al periodo de luz y el espacio en rojo corresponde al periodo de oscuridad de la rata. En los hipnogramas se observa el comportamiento del sueño de la Rata 4. La gráfica superior corresponde al registro polisomnográfico pretratamiento y la gráfica inferior corresponde al postratamiento.

Con el fin de determinar cambios en la fase de sueño que mostró diferencias significativas, se decide analizar el tiempo promedio de los episodios de sueño MOR por hora en un periodo de 24 h en base al análisis z score.

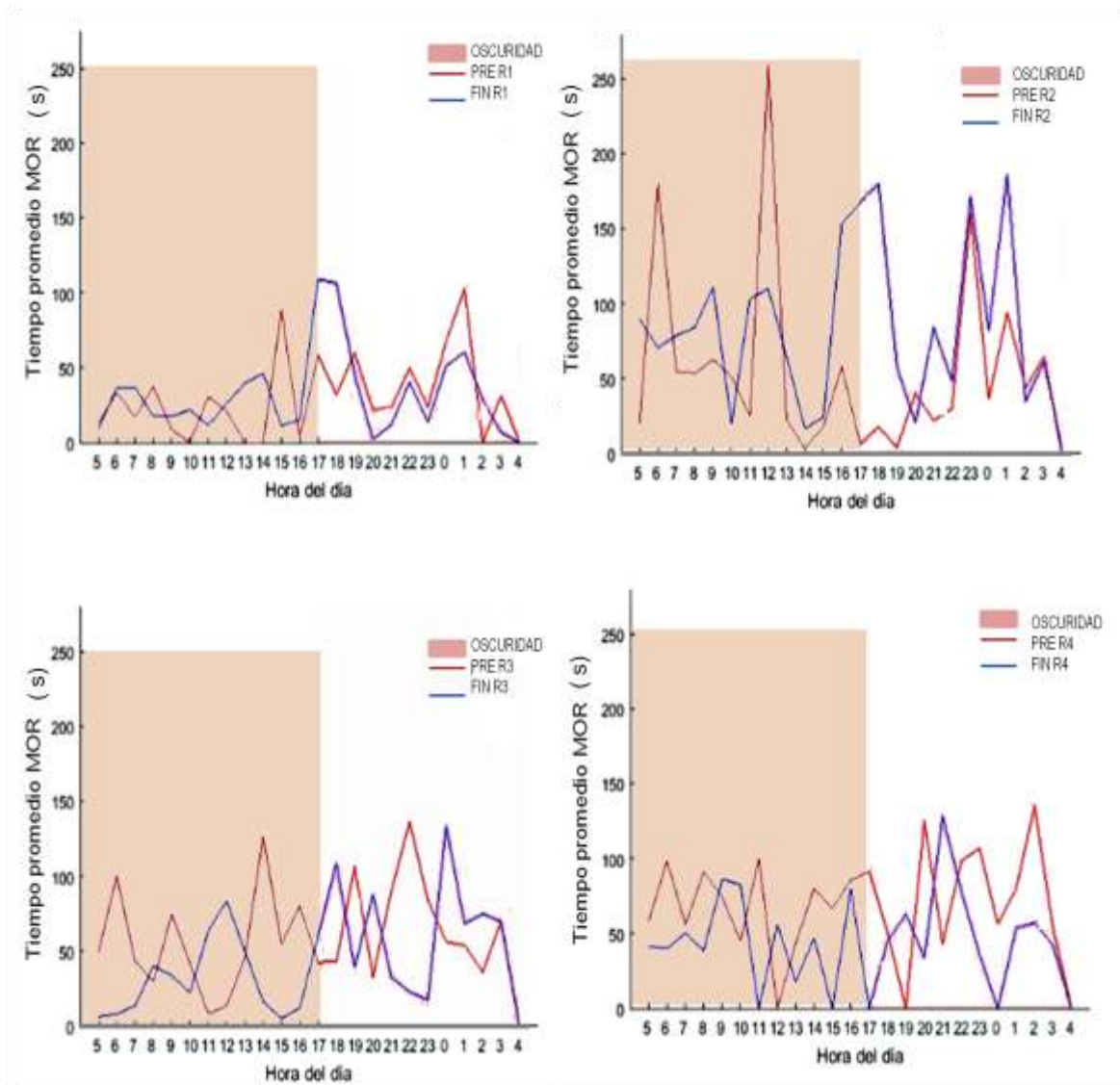
Se encuentra diferencia significativa $p= 0,023$ que demuestra disminución de tiempo en los episodios de MOR en periodo de luz en el postratamiento comparado con el pretratamiento, lo cual sugiere la disrupción del sueño MOR ocasionada por la acción del tratamiento con cuprizona. (Ver Tabla 6-3 y Figura 6-8).

Tabla 6-2. Estadística de tiempos de episodios MOR

PERIODO LUZ/ OSCURIDAD	Z	p valor
OSCURIDAD	-,695	,487
LUZ	-2,278	,023

En la figura 6-8, se evidencia el tiempo de sueño MOR promedio en el pre y postratamiento, denotando una disminución en el postratamiento.

Figura 6-8. Tiempo promedio de sueño MOR por rata en 24 horas



En el eje Y, Tiempo promedio MOR en segundos, en el eje X, Hora del día: Hora del día un periodo de 24 horas, la línea roja dibuja el comportamiento del tiempo promedio del sueño MOR en segundos en la rata antes del tratamiento con cuprizona, la línea azul dibuja el comportamiento del tiempo promedio del sueño MOR en segundos en la rata después del tratamiento con cuprizona.

6.2. Prueba de Viga de Equilibrio

Todas las ratas fueron probadas en la viga de equilibrio. En el recorrido realizado en la viga de 12 mm, no mostraron diferencias significativas, como lo demuestra la tabla 6-4

Tabla 6-3. Puntaje y latencia de la prueba de equilibrio en la viga de 12 mm

	12 mm			Friedman Chi2 (p valor)
	Línea Base Media ± DE	4 semanas Media ± DE	8 semanas Media ± DE	
Latencia*	7,5 ± 1,04	9 ± 1,25	9,67 ± 4,12	3 (0,223)
Puntaje	4,42 ± 0,5	4,08 ± 0,17	4,58 ± 0,5	2,667 (0,264)

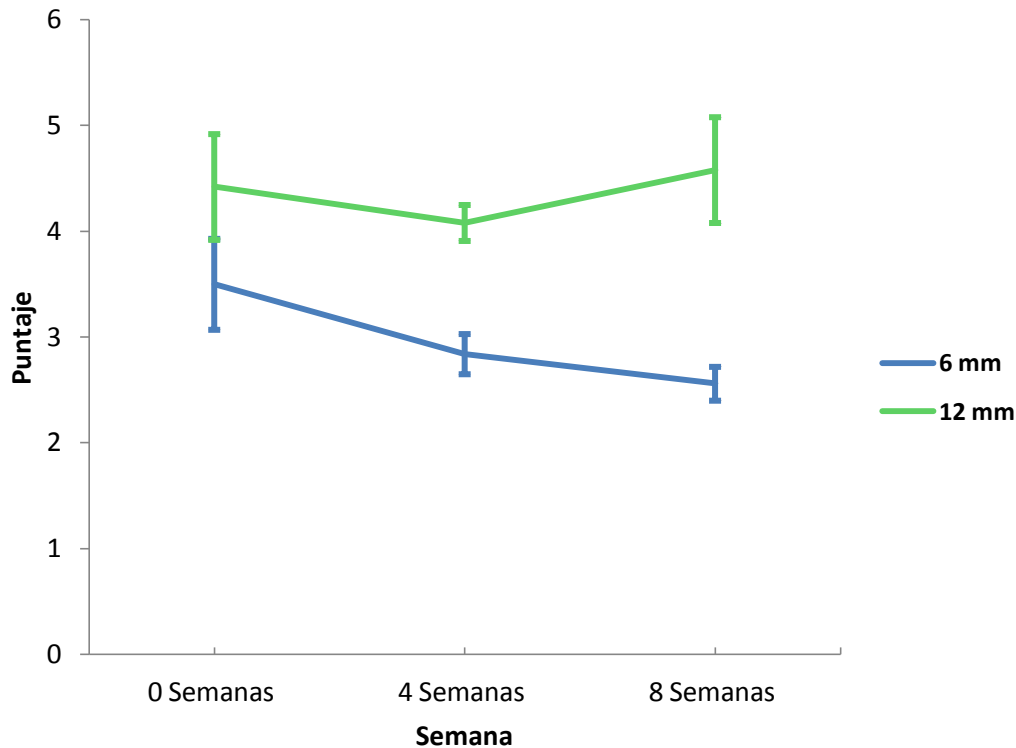
Nota: *Los resultados de la latencia mostrados en la tabla corresponden a unidades por segundo.

El recorrido realizado en la viga de 6 mm, demostró diferencias estadísticamente significativas en el puntaje obtenido en la viga de equilibrio $p=0,002$, evidenciando una disminución en el desempeño de la prueba con un puntaje medio de 3,5 en el pretratamiento a 2,56 en el postratamiento, como lo demuestra la tabla 6-5 y figura 6-9.

Tabla 6-4. Puntaje y latencia de la prueba de equilibrio en la viga de 6 mm

	6 mm			Friedman Chi2 (p valor)
	Línea Base Media ± DE	4 semanas Media ± DE	8 semanas Media ± DE	
Latencia*	5,75 ± 3,33	4,5 ± 0,79	4,83 ± 1,04	0,571 (0,751)
Puntaje	3,5 ± 0,43	2,84 ± 0,19	2,56 ± 0,16	7,60 (0,022)

Nota: *Los resultados de la latencia mostrados en la tabla corresponden a unidades por segundo.

Figura 6-9. Puntaje de la prueba de la viga de equilibrio

El eje Y, se observa el puntaje mostrado en unidades y en el eje x, la medición de la línea base, a la semana 4 postratamiento y a la semana 8 postratamiento. La línea azul esquematiza el comportamiento del puntaje en las tres mediciones en la viga de 6mm y la línea verde, esquematiza éste en la viga de 12 mm

6.3. Histología

Se realizó tinción con Sudan Black B y se desarrollo el análisis cuantitativo histológico de la mielina a través del conteo de pixeles con el software Image J en áreas específicas de proyección de tres núcleos asociados con modulación de sueño. De esa forma, para el *locus coeruleus* se analizó la proyección hacia el núcleo mesencefálico trigeminal (Figura 6-10), para el hipotálamo lateral se analizó la proyección en *locus coeruleus* (Figura 6-10) y para el núcleo supraquiasmático se analizó la proyección hacia stria terminalis (Figura

6-11). Se observaron cambios estadísticamente significativos en los animales lesionados con respecto a los controles en dos de las proyecciones de núcleos analizados. Para *locus coeruleus* se obtuvo $t=11,435$ y $p=0,00$ variando la mielina de 139,02 en los controles a 164,75 en los lesionados, para núcleo mesencefálico trigeminal varió de 136,52 en los controles a 169,145 en los lesionados con una $t=9,275$ y $p=0,00$, y para *stria terminalis* se obtuvo una $t=1,786$ $p=0,96$. (Tabla 6-6).

Tabla 6-5. Mielina en proyecciones de núcleos relacionados con modulación de sueño

Estructura	Media + DE		% Ganancia Blanco	T-student	
	Ctrl (pxl)	Lesionado (pxl)		T	p
Locus coeruleus	139.022 ± 5.043	164.755 ± 3.882	22,187	11,435	<0,001
Núcleo mesencefálico trigeminal	136.528 ± 2.734	169.145 ± 9.564	27,531	9,275	<0,001
Stria terminal	153.85 ± 20.073	168.479 ± 11.58	14,462	1,786	0,096

Nota: CTL: Control. DE: Desviación Estándar. t= valor de la prueba t y p= nivel de significación < 0.05

Se decidió analizar el cuerpo calloso por ser una zona de abundante materia blanca, con el fin de determinar si existen cambios asociados a desmielinización relacionados con la inducción del modelo. Se evidenció disminución estadísticamente significativa en la mielina, de 136,62 en el grupo lesionado a 180,4 en el grupo control con una $t=11,025$ $p=0,000$ (Tabla 6-7. Figura 6-12).

Tabla 6-6: Mielina en Cuerpo Calloso

Estructura	Media + DE		% Ganancia Blanco	T-student	
	Ctrl (pxl)	Lesionado (pxl)		t	p
Cuerpo calloso	136.625 ± 4.84	180.415 ± 10.137	36,992	11,025	<0,001

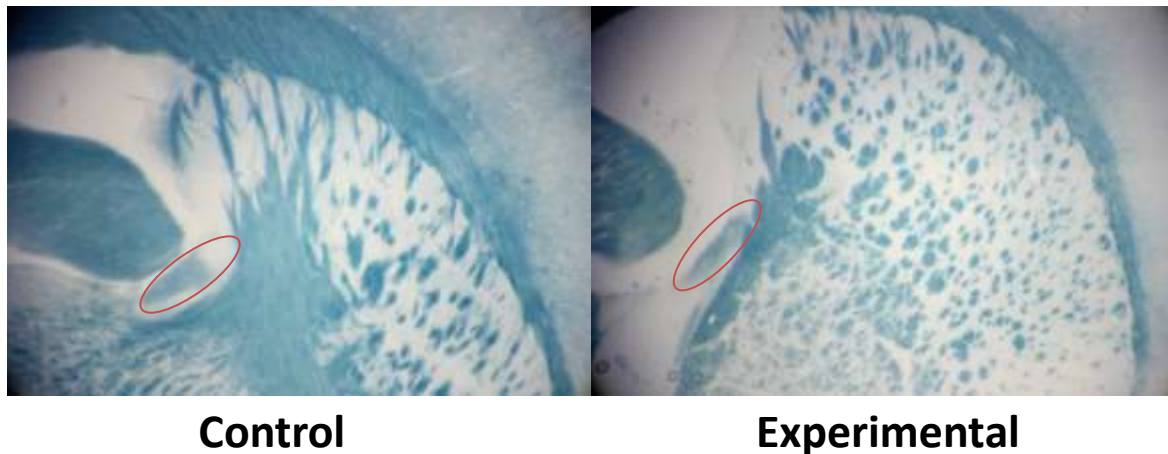
Nota: CTL: Control.. DE: Desviación Estándar

Figura 6-10. Tinción Sudan Black B- proyección del hipotálamo lateral: Locus coeruleus, y proyección del Locus Coeruleus: Núcleo trigeminal mesencefalico



En la figura se observa la histología realizada con tinción Sudan Black B, en tejido control y experimental, para cuantificar mielina en el área de locus coeruleus(LC) y núcleo mesencefalico trigeminal (Me5), señalados a través de flechas en la imagen.

Figura 6-11. Tinción Sudan Black B- proyección del núcleo supraquiasmático: Stria Terminalis



En la figura se observa la histología realizada con tinción Sudan Black B, en tejido control y experimental, para cuantificar mielina en el área de stria terminalis comprendida en el círculo en rojo.

Figura 6-12. Tinción Sudan Black B Cuerpo Calloso**Control****Experimental**

En la figura se observa la histología realizada con tinción Sudan Black B, en tejido control y experimental, para cuantificar mielina en cuerpo calloso.

7. Conclusiones y Recomendaciones

7.1. Conclusiones

- La investigación permitió identificar diferencias en la arquitectura del sueño en el modelo de desmielinización por cuprizona en ratas, con respecto a los controles, encontrando una tendencia al aumento del sueño a expensas de la vigilia, relacionada con la desmielinización observada en el *locus coeruleus*, núcleo mesencefálico trigeminal, *Stria* terminales y cuerpo calloso. Estos resultados presentaron concordancia con los cambios observados en el desempeño de la prueba de equilibrio en el postratamiento respecto al pretratamiento, con disminución en los puntajes de la prueba, deterioro motor y en el equilibrio.
- Se observó incremento en el porcentaje sueño MOR en el periodo de oscuridad.
- La tinción de mielina con Sudan Black, permitió confirmar la acción desmielinizante generada por la cuprizona.
- La prueba de equilibrio fue valiosa para determinar el grado de deterioro de la función motora en el modelo de desmielinización por cuprizona.

7.2. Recomendaciones

- Se aconseja para investigaciones que utilicen el modelo de desmielinización por cuprizona, la administración oral del tóxico, mezclándolo con alimentos palatables para el animal, con el fin de garantizar la ingesta exacta por día y la consecuente inducción del modelo.
- La realización de registros electroencefalográficos y electromiográficos a través de telemetría en animales se considera útil y fundamental en estudios de sueño teniendo en cuenta la marcada actividad motora desarrollada en condiciones basales y el privilegio en la obtención de resultados con alta consistencia y precisión por baja irrupción en el ambiente habitual del animal.
- Se recomienda llevar a cabo exploraciones en la arquitectura del sueño en otros modelos animales de esclerosis múltiple con el fin de comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en el presente estudio.

8. Discusión

En pacientes con esclerosis múltiple se ha reportado co-morbilidad con narcolepsia desde hace algunas décadas (Kanbayashi et al., 2016). Los estudios en esta materia han sido escasos, lo cual probablemente coincide con la baja prevalencia de 0- 1,6 % (Marrie et al., 2014). Tradicionalmente la aparición de desórdenes del sueño ha sido ligada al síntoma más discapacitante de la esclerosis múltiple, la fatiga, sin embargo la frecuencia de presentación de estos desórdenes y el deterioro en la calidad de vida podrían estar ocultando un problema grave en salud pública en la población con esclerosis múltiple, que algunos han denominado como una epidemia escondida, que en la actualidad se presume está separada de la fatiga (Steven D Brass et al., 2014).

Para indagar los efectos de la desmielinización sobre el sueño se seleccionó el modelo tóxico de cuprizona por su capacidad de reproducibilidad y semejanza histopatológica con la EM (Kipp, Clarner, Dang, Copray, & Beyer, 2009). Por otra parte, en estudios que indagan procesos fisiopatológicos asociados a pérdida de mielina, suelen utilizar el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), por considerar su capacidad de generar una potente respuesta inflamatoria, esto presenta un cambio significativo en los últimos años dados los reportes recientes de la actividad inflamatoria generada en la glía a partir de la injuria ocasionada por la cuprizona, y la observación de algunos linfocitos en lugares cercanos al sitio de desmielinización (Baxi et al., 2015; Schregel et al., 2012) lo cual era difícilmente reportado y explicable hasta hace poco tiempo. En este sentido el estudio de Louveau 2015, descubrió un revestimiento de vasos linfáticos localizado en las meninges (Louveau et al., 2015), que aumenta la probabilidad que las células T descritas en otros trabajos, se atribuyan al efecto de la actividad inflamatoria de la cuprizona.

Los resultados histológicos demuestran disminución en la mielina en *locus coeruleus* como proyección de las neuronas moduladoras de sueño localizadas en hipotálamo

lateral y el mismo cambio se reporta en la proyección de *locus coeruleus* a núcleo mesencefálico trigeminal.

Los hallazgos encontrados en las estructuras cerebrales analizadas en este estudio, resultan razonables teniendo en cuenta que análisis regionales de concentración de cobre en el cerebro han reportado altas concentraciones de este metal en *locus coeruleus* en condiciones normales (Prohaska, 2013), por lo que el efecto quelante de la cuprizona presenta una mayor especificidad para la estructura noradrenérgica.

Complementariamente, el hecho de que las células adrenérgicas del *locus coeruleus* estén densamente inervadas por neuronas orexinérgicas (Hervieu, Cluderay, Harrison, Roberts, & Leslie, 2001), y que esto se relacione con la regulación y el mantenimiento vigilia, permite entender la relación reportada entre el sistema glutamatérgico y la orexina 1 dado que se ha documentado que ésta última está vinculada con el incremento en la liberación de glutamato en corteza, amígdala, hipotálamo y *locus coeruleus* (Tose et al., 2009; Van Den Pol, Gao, Obrietan, Kilduff, & Belousov, 1998).

De esta forma es posible que los cambios desmielizantes encontrados en *locus coeruleus* asociados a deficiencia de cobre por la inducción del modelo utilizado en esta investigación, hayan generado un efecto antagonista sobre la actividad excitatoria del sistema noradrenérgico, produciendo los efectos reportados en el aumento de sueño en ésta investigación.

Chemelli en 1999, reportó el aumento del tiempo de sueño MOR, acompañado de aumento de sueño NMOR y disminución del tiempo de vigilia en periodo de oscuridad con disminución de la latencia de sueño MOR en periodo de luz en ratones knockout para orexina (Chemelli et al., 1999). Este mismo comportamiento fue encontrado en el estudio realizado por Bourginen el 2000, siendo asociado a la deficiencia de hipocretina en el *locus coeruleus* debida a la falta de activación de las neuronas presentes en esta área (Bourgin et al., 2000). En 1999 Wu reforzó estos hallazgos al sugerir que los mecanismos de señalización en neuronas del *locus coeruleus* se encontraban dañados en narcolepsia, lo cual fortaleció la visión de esta estructura como actor clave en la regulación del ciclo de sueño y vigilia (Wu et al., 1999).

Otra estructura relacionada con este tipo de cambios en la arquitectura del sueño es el hipotálamo lateral, que se ha visto involucrado al presentar pérdida en el número de neuronas hipocretinérgicas ocasionando aumento del tiempo de sueño MOR y NMOR, así como del tiempo total de sueño, presentando estas similitudes en estadios tempranos en narcolepsia. En humanos la variabilidad en la presentación de síntomas narcolépticos se encuentra vinculada con la extensión de pérdida neuronal a nivel del hipotálamo lateral (Gerashchenko, Blanco-Centurion, Greco, & Shiromani, 2003).

Lo descrito por Kodama y Kimura, 2002, muestra que la administración intravenosa de Orexina 1, es capaz de incrementar los niveles de éste neuropeptido y glutamato en Locus coeruleus y facilitar la vigilia (Kodama & Kimura, 2002). El presente estudio reporta desmielinización en la proyección de neuronas hipocretinérgicas, lo cual concuerda con lo descrito por Kanbayashi, 2016 quién ha indicado simultaneidad en la aparición de lesiones desmielinizantes en el área hipotalámica junto con daño de neuronas hipocretinérgicas y sus proyecciones (Kanbayashi et al., 2016). Los resultados respecto a la arquitectura del sueño coinciden con otros estudios que relacionan el incremento en el porcentaje de sueño MOR y la tendencia al aumento del sueño NMOR como característica electrofisiológica del trastorno del comportamiento del sueño MOR (Paparrigopoulos, 2005), y lo vinculan con una actividad desmielinizante hipocretinérgica asociada con signos y síntomas de narcolepsia (Baumann, Bassetti, & Scammell, 2011).

El aumento de sueño MOR encontrado en el periodo de oscuridad en esta investigación, es apoyado por estudios de otros autores quienes argumentan que las neuronas de Locus Coeruleus son más activas durante el periodo de oscuridad en ratas (Aston-Jones, Chen, Zhu, & Oshinsky, 2001) y que estas ven atenuada su actividad ante la disfunción de las neuronas orexinérgicas, generando efectos potenciadores del sueño MOR durante el estado comportamental de descanso de la rata (Chen et al., 2010; Kantor et al., 2009; Mavanji, Teske, Billington, & Kotz, 2013), que se relaciona con otro de los hallazgos reportados, vinculado con el incremento de episodios de sueño MOR (Dugovic et al., 2009) de corta duración (Kaur et al., 2009) característicos de desórdenes del comportamiento del sueño MOR (Paparrigopoulos, 2005), en específico de síndrome narcoléptico. (Chen et al., 2010; Mavanji et al., 2013).

De otro lado, los resultados de sueño MOR y disminución del tiempo de episodios de éste, también han sido asociados por otros autores como hallazgos replicados en estudios de depresión (Chang, Chen, Qiu, & Lu, 2014), lo cual no se abordó en el presente estudio con pruebas comportamentales, pero que resultaría interesante indagar, considerando el valor translacional de estos estudios y el aporte potencial que puede generar teniendo en cuenta que la depresión es otra de las co-morbilidades de enfermedades desmielinizantes como esclerosis múltiple que se genera de manera temprana y que produce una gran carga de enfermedad en los pacientes.

La literatura también soporta desde el punto de vista inflamatorio la presencia de estos cambios como consecuencia de la disfunción oligodendrocítica producida por la cuprizona que genera una desmielinización independiente de la actividad de células T y es capaz de activar el CMH II, por un mecanismo desconocido en ausencia de estas células. Se maneja la hipótesis, que agentes patógenos podrían tener mayor afinidad por neuronas orexinérgicas del hipotálamo y en consecuencia causar en éstas un estado necrótico, que es capaz de activar microglia y regular a la alta el CMH y citoquinas, incluidas el TNF. Esta microglia activada induce a neurotoxicidad a través de regulación a la alta de glutaminasa. En consecuencia el CMH II es capaz de provocar la producción de moléculas tóxicas que destruyen a las neuronas orexinérgicas (Baumann et al., 2011; Franco-Pons, Torrente, Colomina, & Vilella, 2007; Torkildsen, Brunborg, Myhr, & Bø, 2008)

Los hallazgos reportados en la histología comprueban la apropiada inducción del modelo utilizando cuprizona vía oral al 2% y confirman su reproducibilidad, teniendo en cuenta que la desmielinización es capaz de producir efectos motores. Esto determina la importancia de utilizar pruebas motoras y de equilibrio con un alto grado de dificultad para el sujeto experimental, teniendo en cuenta que los desórdenes en el movimiento en este modelo no son evidentes en las pruebas usuales de marcha y requieren tareas específicas y de mayor complejidad que faciliten el análisis de posibles alteraciones.

Este estudio representa potenciales beneficios investigativos, por cuanto aporta a la construcción de nuevo conocimiento al ser el primero en reportar cambios en la arquitectura de sueño en ratas en un modelo de desmielinización por cuprizona, siendo precedente para futuros estudios que se orienten a profundizar en las dinámicas electrofisiológicas asociadas a la modulación, alteración del sueño y su posible tratamiento vinculado al desarrollo de patologías inflamatorias desmielinizantes.

Este trabajo investigativo es útil teniendo en cuenta que permite describir en primer lugar cambios en el sueño, similares a los reportados con baja frecuencia y en estadios tempranos en humanos, lo cual pretende promover en otros investigadores la necesidad de comprensión de estos fenómenos para intervenir de forma prematura y retrasar su desarrollo. También resulta útil el uso de equipos inalámbricos en el proceso experimental por disminuir la perturbación del ambiente habitual de las ratas. Adicionalmente, como proyección sirve de referencia para el desarrollo de otras fases investigativas que permitan indagar el comportamiento de la microarquitectura del sueño y estudiar detalladamente la actividad comportamental de la rata, en cada periodo de luz con el fin de determinar si existen patrones correlacionados con la aparición o desarrollo de algún tipo específico de alteración en este modelo.

A. Anexo: Protocolo de Perfusión

Materiales:

- Anestesia: Ketamina 75 mg/Kg Xilacina 10 mg/Kg
- Tijeras, fórceps y pinzas clampadoras
- Tubos con tapa para conservar los tejidos
- Buffer fosfato salino
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Paraformaldehído
- Guantes y gafas protectoras.
- Bomba de perfusión

Procedimiento

1. Instalar la bomba de perfusión y conectar con la aguja de perfusión. Dejar correr 100 ml de agua normal a través del lumen del equipo de infusión para remover cualquier residuo, luego ubicar en el tubo del equipo de perfusión en buffer fosfato salino con un volumen en ml equivalente al peso del animal. Abrir la válvula y dejar pasar la solución por todo el equipo.
2. Instalar en un campo quirúrgico las tijeras y las pinzas clampadoras. Administrar la anestesia al animal vía Intraperitoneal y una vez esté bajo anestesia previa confirmación de ausencia de reflejos, ubicar el animal en la tabla operatoria en posición supina. Se puede asegurar las patas del animal sosteniéndolas con cinta adhesiva a la mesa operatoria.

3. Realizar una incisión con el escalpelo a través del abdomen y a lo largo del diafragma. Con las tijeras cortar a través del tejido conectivo a nivel del diafragma para permitir el acceso a la caja torácica.
4. Cortar con las tijeras las costillas hacia la periferia izquierda y luego hacia la periferia derecha alejándose de la línea medía de la caja torácica y así abrir la cavidad torácica.
5. Sostener el corazón firmemente con los fórceps e insertar directamente la aguja del equipo de perfusión dentro del ventrículo izquierdo. Abrir la válvula y permitir el flujo de buffer fosfato salino.
6. Realizar un corte en el ventrículo derecho con las tijeras para facilitar la salida del flujo sanguíneo.
7. Cuando la sangre haya sido retirada de los tejidos y reemplazada por buffer fosfato salino, cambiar al solución a paraformaldeído (Infundir en ml el peso del animal).
8. Detener la perfusión y extraer el cerebro. Ubicar estos en viales que contengan paraformaldehído y conservar en refrigerador
9. Continuar con protocolo de tinción Sudan Black b.

B. Anexo: Protocolo de tinción Sudan Black B

- Los cerebros se extraen y conservan en paraformaldehído.
- Se adhiere el bloque de tejido flotante a la plataforma de corte del vibrátomo, con adhesivo de cianocrilato. Se cubre el tejido con buffer fosfato a temperatura ambiente y se procede a realizar cortes de 20 μ m, correspondientes a áreas de proyección de núcleo supraquiasmático, hipotálamo posterior (región de secreción orexina) y *locus ceruleus* (región de secreción de norepinefrina).
- Las tajadas flotantes son colocadas en láminas gelatinizadas y secadas al aire para proceder a protocolo de tinción.
- Se lava el tejido con agua destilada corriendo durante 3 minutos
- Se trata el tejido por 5 minutos con ethanol al 70%
- Se realiza inmersión del tejido en Sudan Black B al 0.5%, por 30 minutos
- Para remover el exceso de tinción el tejido es lavado con ethanol al 70% durante 5 min.
- Se realiza montaje con glicerol (Millet, Moiola, Pasquini, Soto, & Pasquini, 2009).

Bibliografía

- Acs, P., & Kalman, B. (2012). Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. *Methods Mol Biol*, *900*, 403-431. doi: 10.1007/978-1-60761-720-4_20
- Akintomide, G. S., & Rickards, H. (2011). Narcolepsy: a review. *Neuropsychiatr Dis Treat*, *7*, 507-518. doi: ndt-7-507 [pii]
- 10.2147/NDT.S23624
- Aston-Jones, G., Chen, S., Zhu, Y., & Oshinsky, M. L. (2001). A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nature neuroscience*, *4*(7), 732-738.
- Attarian, H. (2009). Importance of sleep in the quality of life of multiple sclerosis patients: A long under-recognized issue. *Sleep Medicine*, *10*(1), 7-8. doi: 10.1016/j.sleep.2008.02.002
- Bamer, A. M., Johnson, K. L., Amtmann, D., & Kraft, G. H. (2008a). Prevalence of sleep problems in individuals with multiple sclerosis. *Mult Scler*, *14*(8), 1127-1130. doi: 1352458508092807 [pii]
- 10.1177/1352458508092807
- Bamer, A. M., Johnson, K. L., Amtmann, D., & Kraft, G. H. (2008b). Prevalence of sleep problems in individuals with multiple sclerosis (Vol. 14, pp. 1127-1130).
- Barun, B. (2013). Pathophysiological background and clinical characteristics of sleep disorders in multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*, *115*, S82-S85.
- Basoglu, H., Boylu, N., & Kose, H. (2013). Cuprizone-induced demyelination in Wistar rats; electrophysiological and histological assessment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *17*(20), 2711-2717.
- Baumann, C. R., Bassetti, C. L., & Scammell, T. E. (2011). *Narcolepsy: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*: Springer Science & Business Media.
- Baxi, E. G., DeBruin, J., Tosi, D. M., Grishkan, I. V., Smith, M. D., Kirby, L. A., . . . Gocke, A. R. (2015). Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice. *The Journal of Neuroscience*, *35*(22), 8626-8639.
- Bourgin, P., Huitrón-Reséndiz, S., Spier, A. D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J. R., . . . De Lecea, L. (2000). Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *The Journal of Neuroscience*, *20*(20), 7760-7765.
- Braley, T. J., Chervin, R. D., & Segal, B. M. (2012). Fatigue, tiredness, lack of energy, and sleepiness in multiple sclerosis patients referred for clinical polysomnography. *Multiple sclerosis international*, 2012.

- Brass, S. D., Duquette, P., Proulx-Therrien, J., & Auerbach, S. (2010a). Sleep disorders in patients with multiple sclerosis. *Sleep Medicine Reviews*, *14*(2), 121-129. doi: 10.1016/j.smrv.2009.07.005
- Brass, S. D., Duquette, P., Proulx-Therrien, J. I., & Auerbach, S. (2010b). Sleep disorders in patients with multiple sclerosis (Vol. 14, pp. 121-129).
- Brass, S. D., Li, C.-S., & Auerbach, S. (2014). The underdiagnosis of sleep disorders in patients with multiple sclerosis. *Journal of clinical sleep medicine: JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine*, *10*(9), 1025.
- Buenafe, A. C. (2012). Diurnal rhythms are altered in a mouse model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *243*(1-2), 12-17. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.12.002
- Camínero, A., & Bartolomé, M. Sleep disturbances in multiple sclerosis (Vol. 309, pp. 86-91).
- Camínero, A., & Bartolomé, M. (2011). Sleep disturbances in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *309*(1-2), 86-91. doi: 10.1016/j.jns.2011.07.015
- Chang, C. H., Chen, M. C., Qiu, M. H., & Lu, J. (2014). Ventromedial prefrontal cortex regulates depressive-like behavior and rapid eye movement sleep in the rat. *Neuropharmacology*, *86*, 125-132.
- Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scammell, T., Lee, C., . . . Kisanuki, Y. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, *98*(4), 437-451.
- Chen, L., McKenna, J. T., Bolortuya, Y., Winston, S., Thakkar, M. M., Basheer, R., . . . McCarley, R. W. (2010). Knockdown of orexin type 1 receptor in rat locus coeruleus increases REM sleep during the dark period. *European Journal of Neuroscience*, *32*(9), 1528-1536.
- Churchill, L., Rector, D. M., Yasuda, K., Fix, C., Rojas, M. J., Yasuda, T., & Krueger, J. M. (2008). Tumor necrosis factor alpha: activity dependent expression and promotion of cortical column sleep in rats. *Neuroscience*, *156*(1), 71-80. doi: S0306-4522(08)00986-X [pii] 10.1016/j.neuroscience.2008.06.066
- De la Herrán-Arita, A. K., Guerra-Crespo, M., & Drucker-Colín, R. (2011). Narcolepsy and orexins: an example of progress in sleep research. *Front Neurol*, *2*, 26. doi: 10.3389/fneur.2011.00026
- Deurveilher, S., Rusak, B., & Semba, K. (2011). Female reproductive hormones alter sleep architecture in ovariectomized rats. *Sleep*, *34*(4), 519.
- Dodson, E. R., & Zee, P. C. (2010). Therapeutics for Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Sleep Med Clin*, *5*(4), 701-715. doi: 10.1016/j.jsmc.2010.08.001
- Dugovic, C., Shelton, J. E., Aluisio, L. E., Fraser, I. C., Jiang, X., Sutton, S. W., . . . Lord, B. (2009). Blockade of orexin-1 receptors attenuates orexin-2 receptor antagonism-induced sleep promotion in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *330*(1), 142-151.
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., & Mills, K. H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*, *162*(1), 1-11. doi: CEI4143 [pii] 10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x
- Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M. T., & Vilella, E. (2007). Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology letters*, *169*(3), 205-213.

- Gallup, A. C., Gallup Jr, G. G., & Feo, C. (2010). Yawning, sleep, and symptom relief in patients with multiple sclerosis. *Sleep Medicine*, *11*(3), 329-330. doi: 10.1016/j.sleep.2009.12.007
- Gerashchenko, D., Blanco-Centurion, C., Greco, M., & Shiromani, P. (2003). Effects of lateral hypothalamic lesion with the neurotoxin hypocretin-2-saporin on sleep in Long-Evans rats. *Neuroscience*, *116*(1), 223-235.
- Gilmour, T. P., Fang, J., Guan, Z., & Subramanian, T. (2010). Manual rat sleep classification in principal component space. *Neurosci Lett*, *469*(1), 97-101. doi: S0304-3940(09)01543-2 [pii]
10.1016/j.neulet.2009.11.052
- He, J., Wang, Y., Kastin, A. J., & Pan, W. (2014). Increased sleep fragmentation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, behavior, and immunity*, *38*, 53-58.
- Hemmer, B., Archelos, J. J., & Hartung, H. P. (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, *3*(4), 291-301. doi: nrn784 [pii]
10.1038/nrn784
- Hervieu, G., Cluderay, J., Harrison, D., Roberts, J., & Leslie, R. (2001). Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*, *103*(3), 777-797.
- Hodor, A., Palchykova, S., Gao, B., & Bassetti, C. L. (2015). Baclofen and gamma-hydroxybutyrate differentially altered behavior, EEG activity and sleep in rats. *Neuroscience*, *284*, 18-28.
- Iseki, K., Mezaki, T., Oka, Y., Terada, K., Tomimoto, H., Miki, Y., & Shibasaki, H. (2002). Hypersomnia in MS. *Neurology*, *59*(12), 2006-2007.
- Ju, Y. E., Larson-Prior, L., & Duntley, S. (2011). Changing demographics in REM sleep behavior disorder: possible effect of autoimmunity and antidepressants. *Sleep Med*, *12*(3), 278-283. doi: S1389-9457(11)00023-2 [pii]
10.1016/j.sleep.2010.07.022
- Kanbayashi, T., Imanishi, A., Ohmori, Y., Sagawa, Y., Takahashi, Y., Omokawa, M., . . . Nishino, S. (2016). Symptomatic Narcolepsy or Hypersomnolence with and Without Hypocretin (Orexin) Deficiency *Narcolepsy* (pp. 95-128): Springer.
- Kang, J. H., & Lin, H. C. (2012). Obstructive sleep apnea and the risk of autoimmune diseases: a longitudinal population-based study. *Sleep Med*, *13*(6), 583-588. doi: S1389-9457(12)00134-7 [pii]
10.1016/j.sleep.2012.03.002
- Kantor, S., Mochizuki, T., Janisiewicz, A. M., Clark, E., Nishino, S., & Scammell, T. E. (2009). Orexin neurons are necessary for the circadian control of REM sleep. *Sleep*, *32*(9), 1127.
- Kasper, L. H., & Shoemaker, J. (2010). Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology*, *74* Suppl 1, S2-8. doi: 74/1_Supplement_1/S2 [pii]
10.1212/WNL.0b013e3181c97c8f
- Kaur, S., Thankachan, S., Begum, S., Liu, M., Blanco-Centurion, C., & Shiromani, P. J. (2009). Hypocretin-2 saporin lesions of the ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG) increase REM sleep in hypocretin knockout mice. *PLoS one*, *4*(7), e6346-e6346.

- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica*, *118*(6), 723-736.
- Kodama, T., & Kimura, M. (2002). Arousal effects of orexin-A correlate with GLU release from the locus coeruleus in rats. *Peptides*, *23*(9), 1673-1681.
- Korayem, H., Abdo, M., Naim, M., Yones, S., & Hosny, S. (2014). Potential Therapeutic Effect of Hematopoietic Stem Cells on Cerebellar Ataxia in Adult Female Rats Subjected to Cerebellar Damage by Monosodium Glutamate. *J Neurol Neurophysiol*, *5*, 240.
- Kornum, B. R., Faraco, J., & Mignot, E. (2011). Narcolepsy with hypocretin/orexin deficiency, infections and autoimmunity of the brain. *Curr Opin Neurobiol*, *21*(6), 897-903. doi: S0959-4388(11)00147-4 [pii]
10.1016/j.conb.2011.09.003
- Kouri, I., Papakonstantinou, S., Bempes, V., Vasiliadis, H. S., Kyritsis, A. P., & Pelidou, S. H. (2011). HLA associations with multiple sclerosis in Greece. *J Neurol Sci*, *308*(1-2), 28-31. doi: S0022-510X(11)00372-8 [pii]
10.1016/j.jns.2011.06.037
- Leonavicius, R., & Adomaitiene, V. (2014). Features of sleep disturbances in multiple sclerosis patients. *Psychiatr Danub*, *26*(3), 249-255.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., . . . Lee, K. S. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*.
- Lunde, H. M. B., Aae, T. F., Indrevåg, W., Aarseth, J., Bjorvatn, B., Myhr, K.-M., & Bø, L. (2012). Poor sleep in patients with multiple sclerosis.
- Lunde, H. M. B., Bjorvatn, B., Myhr, K. M., & Bø, L. (2013). Clinical assessment and management of sleep disorders in multiple sclerosis: a literature review. *Acta Neurologica Scandinavica*, *127*(s196), 24-30.
- Luong, T. N., Carlisle, H. J., Southwell, A., & Patterson, P. H. (2011). Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *Journal of visualized experiments: JoVE*(49).
- Marrie, R. A., Reider, N., Cohen, J., Trojano, M., Sorensen, P. S., Cutter, G., . . . Stuve, O. (2014). A systematic review of the incidence and prevalence of sleep disorders and seizure disorders in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, *13*52458514564486.
- Martinez, D., & Lenz, M. o. C. (2010). Circadian rhythm sleep disorders. *Indian J Med Res*, *131*, 141-149.
- Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*, *11*(1), 107-116.
- Mavanji, V., Teske, J. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M. (2013). Partial sleep deprivation by environmental noise increases food intake and body weight in obesity-resistant rats. *Obesity*, *21*(7), 1396-1405.
- Mendozzi, L., Tronci, F., Garegnani, M., & Pugnetti, L. (2010). Sleep disturbance and fatigue in mild relapsing remitting multiple sclerosis patients on chronic immunomodulant therapy: an actigraphic study. *Mult Scler*, *16*(2), 238-247. doi: 1352458509354551 [pii]
10.1177/1352458509354551

- Merkelbach, S., Schulz, H., Kölmel, H. W., Gora, G., Klingelhöfer, J., Dachsel, R., . . . Polzer, U. (2011). Fatigue, sleepiness, and physical activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol*, *258*(1), 74-79. doi: 10.1007/s00415-010-5684-3
- Merlino, G., Fratticci, L., Lenchig, C., Valente, M., Cargnelutti, D., Picello, M., . . . Gigli, G. L. (2009). Prevalence of 'poor sleep' among patients with multiple sclerosis: An independent predictor of mental and physical status. *Sleep Medicine*, *10*(1), 26-34. doi: 10.1016/j.sleep.2007.11.004
- Millet, V., Moiola, C., Pasquini, J., Soto, E., & Pasquini, L. (2009). Partial inhibition of proteasome activity enhances remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Experimental neurology*, *217*(2), 282-296.
- Mills, R. J., & Young, C. A. (2011). The relationship between fatigue and other clinical features of multiple sclerosis. *Mult Scler*, *17*(5), 604-612. doi: 1352458510392262 [pii]
10.1177/1352458510392262
- Murphy, A. C., Lalor, S. J., Lynch, M. A., & Mills, K. H. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, *24*(4), 641-651. doi: S0889-1591(10)00041-3 [pii]
10.1016/j.bbi.2010.01.014
- Neau, J.-P., Paquereau, J., Auché, V., Mathis, S., Godeneche, G., Ciron, J., . . . des Neurologues Poitou-Charentes, G. (2012). Sleep disorders and multiple sclerosis: a clinical and polysomnography study. *European neurology*, *68*(1), 8-15.
- Ohayon, M. M., O'Hara, R., & Vitiello, M. V. (2012). Epidemiology of restless legs syndrome: a synthesis of the literature. *Sleep Med Rev*, *16*(4), 283-295. doi: S1087-0792(11)00057-8 [pii]
10.1016/j.smr.2011.05.002
- Olascoaga, J. (2010). Calidad de vida y esclerosis múltiple. *Rev Neurol*, *51*(5), 279-288.
- Overeem, S., Black, J. L., & Lammers, G. J. (2008). Narcolepsy: immunological aspects. *Sleep Med Rev*, *12*(2), 95-107. doi: S1087-0792(07)00099-8 [pii]
10.1016/j.smr.2007.07.010
- Paparrigopoulos, T. J. (2005). REM sleep behaviour disorder: clinical profiles and pathophysiology. *International Review of Psychiatry*, *17*(4), 293-300.
- Pasquini, L., Calatayud, C., Una, A. B., Millet, V., Pasquini, J., & Soto, E. (2007). The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochemical research*, *32*(2), 279-292.
- Paxinos, G., Watson, C., Carrive, P., Kirkcaldie, M., & Ashwell, K. (2009). Chemoarchitectonic atlas of the rat brain.
- Plazzi, G., Moghadam, K. K., Maggi, L. S., Donadio, V., Vetrugno, R., Liguori, R., . . . Ferri, R. (2011). Autonomic disturbances in narcolepsy. *Sleep Med Rev*, *15*(3), 187-196. doi: S1087-0792(10)00061-4 [pii]
10.1016/j.smr.2010.05.002
- Plazzi, G., & Montagna, P. (2002a). Remitting REM sleep behavior disorder as the initial sign of multiple sclerosis (Vol. 3, pp. 437-439).
- Plazzi, G., & Montagna, P. (2002b). Remitting REM sleep behavior disorder as the initial sign of multiple sclerosis. *Sleep Med*, *3*(5), 437-439. doi: S1389945702000424 [pii]

- Pokryszko-Dragan, A., Bilińska, M., Gruszka, E., Biel, Ł., Kamińska, K., & Konieczna, K. (2013). Sleep disturbances in patients with multiple sclerosis. *Neurological Sciences, 34*(8), 1291-1296.
- Prohaska, J. R. (2013). Neurochemical Roles of Copper. *Metals and Oxidative Damage in Neurological Disorders, 57*.
- Robert, C., Guilpin, C., & Limoge, A. (1999). Automated sleep staging systems in rats. *J Neurosci Methods, 88*(2), 111-122. doi: S0165027099000278 [pii]
- Rodriguez, M. (2007). Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. *Brain Pathology, 17*(2), 219-229.
- Schregel, K., Wuerfel née Tysiak, E., Garteiser, P., Gemeinhardt, I., Prozorovski, T., Aktas, O., . . . Sinkus, R. (2012). Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified in vivo by magnetic resonance elastography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109*(17), 6650-6655. doi: 10.1073/pnas.1200151109
- Slavin, A., Kelly-Modis, L., Labadia, M., Ryan, K., & Brown, M. L. (2010). Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis. *Autoimmunity, 43*(7), 504-513. doi: 10.3109/08916931003674733
- Sospedra, M., & Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol, 23*, 683-747. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707
- Tachibana, N., Howard, R. S., Hirsch, N. P., Miller, D. H., Moseley, I. F., & Fish, D. (1994). Sleep problems in multiple sclerosis. *Eur Neurol, 34*(6), 320-323.
- Thakor, N. V., & Tong, S. (2004). Advances in quantitative electroencephalogram analysis methods. *Annu Rev Biomed Eng, 6*, 453-495. doi: 10.1146/annurev.bioeng.5.040202.121601
- Torkildsen, Ø., Brunborg, L., Myhr, K. M., & Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica, 117*(s188), 72-76.
- Tose, R., Kushikata, T., Yoshida, H., Kudo, M., Furukawa, K., Ueno, S., & Hirota, K. (2009). Interaction between orexinergic neurons and NMDA receptors in the control of locus coeruleus–cerebrocortical noradrenergic activity of the rat. *Brain research, 1250*, 81-87.
- Trojan, D. A., Kaminska, M., Bar-Or, A., Benedetti, A., Lapierre, Y., Da Costa, D., . . . Kimoff, R. J. Polysomnographic measures of disturbed sleep are associated with reduced quality of life in multiple sclerosis (Vol. 316, pp. 158-163).
- Trojan, D. A., Kaminska, M., Bar-Or, A., Benedetti, A., Lapierre, Y., Da Costa, D., . . . Kimoff, R. J. (2012). Polysomnographic measures of disturbed sleep are associated with reduced quality of life in multiple sclerosis. *J Neurol Sci, 316*(1-2), 158-163. doi: S0022-510X(11)00750-7 [pii]
- 10.1016/j.jns.2011.12.013
- Van Den Pol, A. N., Gao, X.-B., Obrietan, K., Kilduff, T. S., & Belousov, A. B. (1998). Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *The Journal of Neuroscience, 18*(19), 7962-7971.
- Vanotti, S. (2008). Evaluación neuropsicológica en pacientes con esclerosis múltiple. *Revista Argentina de Neuropsicología, 12*, 13-21.
- Vávrová, J., Kemlink, D., Sonka, K., Havrdová, E., Horáková, D., Pardini, B., . . . Winkelmann, J. (2012). Restless legs syndrome in Czech patients with multiple sclerosis: an epidemiological and genetic study. *Sleep Med, 13*(7), 848-851. doi: S1389-9457(12)00175-X [pii]
- 10.1016/j.sleep.2012.03.012

- Veauthier, C. (2015). Sleep Disorders in Multiple Sclerosis. Review. *Current neurology and neuroscience reports*, 15(5), 1-10.
- Veauthier, C., Radbruch, H., Gaede, G., Pfueller, C. F., Dörr, J., Bellmann-Strobl, J., . . . Sieb, J. P. (2011). Fatigue in multiple sclerosis is closely related to sleep disorders: a polysomnographic cross-sectional study. *Mult Scler*, 17(5), 613-622. doi: 1352458510393772 [pii]
10.1177/1352458510393772
- Vetrugno, R., Stecchi, S., Plazzi, G., Lodi, R., D'Angelo, R., Alessandria, M., . . . Montagna, P. (2009a). Narcolepsy-like syndrome in multiple sclerosis. *Sleep Med*, 10(3), 389-391. doi: S1389-9457(08)00065-8 [pii]
10.1016/j.sleep.2008.03.009
- Vetrugno, R., Stecchi, S., Plazzi, G., Lodi, R., D'Angelo, R., Alessandria, M., . . . Montagna, P. (2009b). Narcolepsy-like syndrome in multiple sclerosis (Vol. 10, pp. 389-391).
- Weinstock, L. B., Walters, A. S., & Pauksakon, P. (2012). Restless legs syndrome--theoretical roles of inflammatory and immune mechanisms. *Sleep Med Rev*, 16(4), 341-354. doi: S1087-0792(11)00098-0 [pii]
10.1016/j.smrv.2011.09.003
- Wergeland, S., Torkildsen, Ø., Myhr, K. M., Mørk, S. J., & Bø, L. (2012). The cuprizone model: regional heterogeneity of pathology. *APMIS*, 120(8), 648-657. doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02882.x
- Wu, M.-F., Gulyani, S., Yau, E., Mignot, E., Phan, B., & Siegel, J. (1999). Locus coeruleus neurons: cessation of activity during cataplexy. *Neuroscience*, 91(4), 1389-1399.
- Zendedel, A., Beyer, C., & Kipp, M. (2013). Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection. *J Mol Neurosci*, 51(2), 567-572. doi: 10.1007/s12031-013-0026-4
- Zhan, S., Cai, G. Q., Zheng, A., Wang, Y., Jia, J., Fang, H., . . . Ding, Q. (2011). Tumor necrosis factor-alpha regulates the Hypocretin system via mRNA degradation and ubiquitination. *Biochim Biophys Acta*, 1812(4), 565-571. doi: S0925-4439(10)00258-9 [pii]
10.1016/j.bbdis.2010.11.003
- Ziemann, U., Wahl, M., Hattingen, E., & Tumani, H. (2011). Development of biomarkers for multiple sclerosis as a neurodegenerative disorder. *Progress in Neurobiology*, 95(4), 670-685. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.04.007