



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de medicina
Licenciatura en biomedicina
Instituto de fisiología

Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor

**PAPEL SINCRONIZADOR DE LA MELATONINA EN EL CICLO
SUEÑO-VIGILIA EN LA RATA *TAIEP* MACHO**

Tesis para obtener el título de:
LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:
Alejandro Nicolás Luna Pérez

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez

CO-DIRECTOR DE TESIS:
Dr. José Ramón Eguibar Cuenca



Heroica Puebla de Zaragoza, febrero 2025

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo recibido por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla del proyecto VIEP-BUAP 2023 para el cuerpo académico consolidado en Neuroendocrinología, (BUAP-CA-288)

Al apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a ANLP CVU 1348083 como Ayudante de Investigador del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III-José Ramón Eguibar CVU 6507.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser la cuna de mi desarrollo profesional.

A mis mentores:

Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez, por permitirme realizar mi trabajo de tesis bajo su tutela, por guiarme con dedicación y paciencia y por transmitirme sus conocimientos en el ámbito académico y profesional.

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca, por las críticas constructivas que permitieron el desarrollo y enriquecimiento de este trabajo y por darme la oportunidad de ser asistente de investigador SNI III.

A todos los integrantes del laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor por el apoyo brindado en los procesos experimentales de este trabajo, por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

A todos mis profesores:

Por ejercer su trabajo con vocación, por inspirarme y orientarme a lo largo de mi formación académica y humana.

A mis compañeros y amigos de la licenciatura:

Antonio, Marcos, Pedro, Carlos y Pablo, por permitirme aprender y crecer con ustedes, por todas las experiencias gratas que hicieron memorable esta etapa de mi vida y por todo el cariño y apoyo brindado.

A mi familia:

Por apoyarme en cada aspecto de mi vida, por impulsarme a soñar y darme las herramientas para alcanzar mis metas.

ÍNDICE

Resumen	1
1.Introducción	
1.1 Los ritmos circadianos	3
1.2 El ciclo sueño-vigilia	5
1.3 Las etapas del ciclo sueño-vigilia	7
1.4 Estructuras cerebrales implicadas en la regulación de la vigilia	9
1.5 Estructuras cerebrales implicadas en la regulación del sueño de ondas lentas	11
1.6 Estructuras cerebrales implicadas en la regulación del sueño con movimientos oculares rápidos	15
2.Antecedentes generales	
2.1 Trastornos del sueño y alteraciones del ritmo circadiano	18
2.2 Producción pineal de la melatonina y sus receptores	22
2.3 La melatonina exógena y su efecto sobre el ciclo sueño-vigilia	28
3.Antecedentes específicos	
3.1 La melatonina en el tratamiento de los trastornos del sueño	31
3.2 La rata <i>taiep</i> como modelo de la narcolepsia	32
4.Planteamiento del problema	36
5.Objetivos	
5.1 Objetivo General	37
5.2 Objetivos Particulares	37
6.Material y métodos	
6.1 Diseño del experimento	38
6.2 Ubicación espaciotemporal	38
6.3 Estrategia de trabajo	38

6.4 Muestreo	
6.4.1 Definición de la unidad de población	39
6.4.2 Selección de la muestra	39
6.4.3 Diseño y tipo de muestreo	39
6.4.4 Tamaño de la muestra	39
6.5 Definición de las variables y escalas de medición	39
6.6 Métodos de recolección de datos	40
6.7 Técnicas y procedimientos	
6.7.1 Cirugía estereotáxica	40
6.7.2 Cuidados postoperatorios	41
6.7.3 Registro electroencefalográfico	42
6.8 Análisis de datos	42
6.9 Diseño estadístico	
6.9.1 Hipótesis estadístico	42
6.9.2 Pruebas estadísticas	43
7. Logística	
7.1 Recursos humanos	44
7.2 Recursos materiales	
7.2.1 Alojamiento	44
7.2.2 Cirugía estereotáxica	44
7.2.3 Registros electroencefalográficos	44
7.2.4 Análisis estadístico	44
7.3 Recursos financieros	45
7.4 Cronograma de actividades	
7.4.1 Gráfica de Gantt	45
8. Bioética	46
9. Resultados	
9.1 Frecuencia de los episodios de vigilia	47

9.2 Frecuencia de los episodios de sueño de ondas lentas	48
9.3 Frecuencia de los episodios de sueño con movimientos oculares	
Rápidos	50
9.4 Duración total de los episodios de vigilia	51
9.5 Duración total de los episodios de sueño de ondas lentas	53
9.6 Duración total de los episodios de sueño con movimientos oculares	
Rápidos	54
9.7 Duración media de los episodios de vigilia	56
9.8 Duración media de los episodios de sueño de ondas lentas	57
9.9 Duración media de los episodios de sueño con movimientos oculares	
Rápidos	59
9.10 Latencia del sueño con movimientos oculares rápidos	60
9.11 Frecuencia de los episodios de inmovilidad	61
9.12 Duración total de los episodios de inmovilidad	62
9.13 Duración media de los episodios de inmovilidad	64
9.14 Hipnogramas	66
10. Discusión	67
11. Conclusiones	73
12. Referencias bibliográficas	74

RESUMEN.

Los ritmos circadianos son todos aquellos procesos fisiológicos y de comportamiento que mantienen una periodicidad de aproximadamente 24 horas ajustándose a las señales ambientales externas. Dicha sincronización se da a través del núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo que actúa como el reloj maestro central coordinando otras áreas del cerebro y los tejidos periféricos.

Uno de los ritmos circadianos más importante para el mantenimiento de la salud tanto física y como mental es el ciclo sueño-vigilia, el cual se divide en tres etapas: la vigilia, el sueño de ondas lentas (SOL) y el sueño con movimientos oculares rápidos (MOR).

La melatonina es una neurohormona cuya producción pineal está sincronizada con los estímulos de luz/oscuridad medioambientales, permitiéndole actuar como un cronobiótico endógeno, regulando la periodicidad de los ciclos circadianos, entre ellos, el ciclo sueño-vigilia, a través de la interacción con sus receptores tipo I y tipo II denominados MT1 y MT2, respectivamente; los cuales se encuentran distribuidos ampliamente en el cerebro y en los tejidos periféricos.

Se ha demostrado que tanto la melatonina exógena como los agonistas de sus receptores MT1 y MT2 tienen un efecto estimulador del sueño, además de un efecto cronobiótico en los humanos. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales lleva a cabo este papel no se han dilucidado por completo.

La narcolepsia tipo 1 es un trastorno del sueño caracterizado por la tétada clásica que incluye somnolencia diurna excesiva, alucinaciones hipnopómpicas, parálisis del sueño y cataplejía. Esta última se define como la pérdida episódica del tono muscular con conservación de la conciencia.

La rata *taiep* es una mutante de tubulinas que se ha propuesto como un modelo de narcolepsia tipo 1 debido a que presenta episodios de inmovilidad a lo largo del día y la noche que se caracterizan por una actividad electroencefalográfica semejante a lo descrito tanto en la narcolepsia canina, así como en la humana, además de presentar un patrón del ciclo sueño-vigilia desorganizado.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto cronobiótico de la administración de melatonina exógena en dosis crecientes el ciclo sueño-vigilia de la rata *taiep* macho adulta a través de la implantación de electrodos de registro mediante una cirugía estereotáxica.

Con la administración de melatonina en una dosis de 20 mg/Kg se obtuvo una disminución de la duración total y media de los episodios de vigilia junto con un incremento en la duración total de los episodios de sueño de ondas lentas durante el periodo de luz. Por otra parte, se obtuvo un incremento en la duración total, la frecuencia y la duración media de los episodios de inmovilidad durante el pico máximo de producción endógena de melatonina, así como una fragmentación del sueño con movimientos oculares rápidos durante el periodo de oscuridad, con la administración de melatonina con una dosis de 20 mg/Kg.

A partir de estos resultados concluimos que la melatonina exógena actúa como un cronobiótico en las ratas *taiep* macho adulta, sin embargo, interviene negativamente en los episodios de inmovilidad, incrementando su duración total, su duración media y su frecuencia, así como produciendo una fragmentación del sueño con movimientos oculares rápidos.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Los ritmos circadianos.

Los ritmos circadianos (del latín *circa* que significa “aproximadamente” y *dies* que significa “día”) nos referimos todos aquellos procesos fisiológicos, bioquímicos y del comportamiento que mantienen una periodicidad que se aproxima a las 24 horas, lo que permite integrar los cambios medioambientales externos con la fisiología interna, ejemplo de estos son el ciclo sueño-vigilia, la temperatura corporal, la alimentación, la ingesta de agua y algunos ritmos neuroendocrinos (Zisapel, 2018).

La idea de que existe un reloj biológico intrínseco que regula estos ritmos surgió en 1729, cuando Jean-Jacques de Mairan describió que las plantas de mimosa abrían sus hojas durante el día y las cerraban durante la noche, incluso exponiéndolas a una obscuridad constante. Hoy en día sabemos que dicho reloj biológico está compuesto tanto en los mamíferos como en algunas otras especies por el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo que actúa como el marcapasos central que coordina a las demás áreas cerebrales y a los tejidos periféricos a través de señales neuronales y hormonales (Ruan *et al.*, 2021).

En los mamíferos, el reloj circadiano a nivel celular consta de bucles de retroalimentación negativa que se encuentran presentes en prácticamente todas las células y a partir de los cuales se regula la expresión rítmica de una gran parte del transcriptoma (Mohawk *et al.*, 2012). De hecho, en ratones se estima que más de la mitad del genoma codificador de proteínas posee una expresión rítmica en al menos un órgano; además, el 56% de los 100 medicamentos más vendidos en Estados Unidos de América tienen como objetivo directo a los genes reloj o a alguno de sus productos, lo que resalta la enorme influencia del reloj circadiano sobre la fisiología y la importancia de la cronomedicina en el tratamiento de múltiples enfermedades (Zhang *et al.*, 2014).

El mecanismo del reloj circadiano molecular comienza durante el periodo de luz con la activación del factor de transcripción heterodimérico CLOCK/BMAL1 (de sus siglas en inglés circadian locomotor output cycles kaput/brain y muscle ARNT-like

1), el cual activa la transcripción de los genes reloj Criptocromo tipo 1 y tipo 2 (Cry1 y Cry2, de sus siglas en inglés), y de los genes denominados Período (abreviado Per), de los cuales en los mamíferos superiores se conocen tres subtipos denominados Período 1 (Per1), Período 2 (Per2) y Período 3 (Per3). CLOCK/BMAL1 regula la transcripción de Per y Cry mediante su unión a un elemento potenciador de la caja E del genoma (Ruan *et al.*, 2021).

Al final de la tarde, la actividad transcripcional del complejo CLOCK/BMAL1 disminuye, tanto por su degradación mediante los complejos de ligasa E3 específicos, como por la acumulación del complejo PER/CRY que se transloca al núcleo e inhibe su actividad transcripcional, disminuyendo también su propia transcripción. La disminución en los niveles de PER/CRY permite la restauración de los niveles de CLOCK/BMAL1, reanudando nuevamente el ciclo, el cual posee una duración cercana a las 24 horas (Takahashi, 2017).

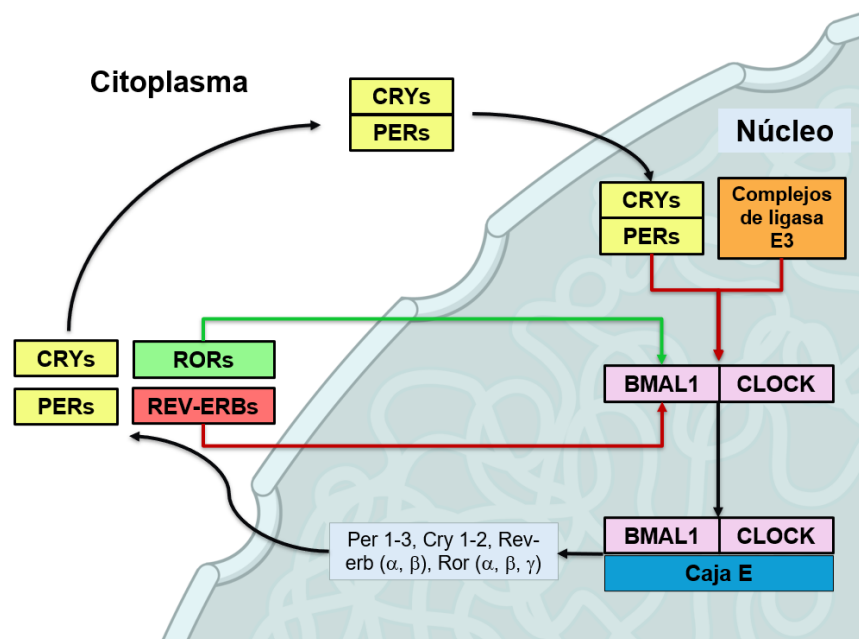


Figura 1. Los bucles de retroalimentación del reloj circadiano a nivel celular. El heterodímero CLOCK/BMAL1 se une a un elemento potenciador de la caja E activando la transcripción de los genes Período 1, 2 y 3, Criptocromo 1 y 2, Rev-erb α y β y Ror α , β y γ . Las proteínas CRIPTOCROMO y PERÍODO forman un complejo que inhibe la actividad de CLOCK/BMAL1, mientras que las RORs y las REV-ERBs compiten por unirse al gen Bmal1, regulando su transcripción de forma positiva o negativa, respectivamente. Los complejos de ligasas E3 específicos degradan a las proteínas CLOCK y BMAL1 regulando su actividad. Las flechas rojas indican una regulación negativa, las flechas verdes indican una regulación positiva. Abreviaturas. CLOCK/BMAL1 = Circadian locomotor output cycles kaput/brain y muscle ARNT-like 1, Cry = Criptocromo, Per = Período, Ror = receptores huérfanos relacionados con el ácido retinoico. Creada con NIAID NIH BIOART.

Posteriormente, se descubrieron otros genes y bucles de retroalimentación adicionales, como lo son los receptores nucleares REV-ERB α y REV-ERB β y los receptores huérfanos relacionados con el ácido retinoico (ROR α , ROR β y ROR γ), cuya transcripción también es activada por el complejo CLOCK/BMAL1 (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004). Los receptores ROR compiten con los receptores REV-ERB para unirse al promotor del gen Bmal1, regulando su transcripción de forma positiva o negativa, respectivamente (véase Figura 1; Cox *et al.*, 2019).

A pesar de la existencia de este reloj biológico interno que regula los ritmos circadianos existen múltiples factores externos que también pueden influir en dicha regulación, los cuales son denominados “zeitgebers” (Heyde y Oster, 2019). Esta palabra alemana que significa “dador de tiempo” hace referencia a todas las señales temporales externas que sincronizan los ritmos biológicos y los ajustan con un ciclo de 24 horas, siendo la luz uno de los estímulos de mayor importancia, no obstante, factores como el horario de la actividad física, de la ingesta de alimentos y la conducta social también han demostrado influir de manera significativa sobre nuestros ritmos circadianos (Ruan *et al.*, 2021).

1.2 El ciclo sueño-vigilia.

El ciclo sueño-vigilia es uno de los ritmos circadianos más importantes, ya que a pesar de que el sueño se define como un estado de relativa desconexión con el entorno que es fácilmente reversible y presenta una disminución de las funciones motoras; es durante este periodo que se llevan a cabo múltiples procesos que permiten mantener el correcto funcionamiento del organismo (Tononi y Cirelli, 2014).

Entre estas funciones debemos destacar la propuesta de la homeostasis sináptica de Tononi y Cirelli (2014), quienes plantean que el conjunto de actividades motoras, sensoriales y cognitivas que realizamos durante la vigilia ocasionan cambios en las conexiones cerebrales que permiten el procesamiento de dicha información, dando como resultado una acumulación de la fuerza sináptica, siendo el sueño el que permite su disminución a niveles que sean energéticamente sostenibles (Tononi y Cirelli, 2014).

Adicionalmente, se ha demostrado que la privación del sueño conduce a un estado de deterioro físico y cognitivo, lo cual aumenta el riesgo de trastornos cardiovasculares, alteraciones metabólicas, desbalance hormonal y el deterioro del sistema inmunológico, entre otras afecciones (Ma *et al.*, 2018).

En cuanto a la regulación del ciclo sueño-vigilia, el modelo de los dos procesos, propuesto por Borbély, en 1982, propone que se da mediante la interacción entre el proceso homeostático, que mantiene el equilibrio entre la necesidad de dormir acumulada durante el tiempo que se permanece en vigilia, y su disipación durante el tiempo de sueño; y el proceso circadiano, que propone que el sueño y la vigilia suceden en fases predeterminadas a lo largo del ciclo diario de 24 horas (Borbély, 2022).

Es importante destacar que el proceso circadiano es regulado principalmente por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo; mientras que el control del proceso homeostático depende de la actividad neuronal de los núcleos promotores de la vigilia y del sueño, lo que permite diferenciar la influencia de cada uno sobre dicho ciclo (Wang *et al.*, 2020).

Debido a esto, se ocupan diferentes parámetros para la cuantificación de ambos procesos, siendo los registros electroencefalográficos el principal factor para la medición del proceso homeostático, en los cuales la actividad delta se considera un marcador del tiempo de sueño de ondas lentas (SOL), mientras que la actividad de alta frecuencia y baja amplitud, es decir, de ondas beta, se asocia con el tiempo de vigilia. Por otro lado, para el proceso circadiano se consideran a diversos biomarcadores, como son la temperatura corporal y la síntesis de melatonina (Sher *et al.*, 2021).

La melatonina es considerada como uno de los biomarcadores del proceso circadiano más relevantes debido a que su síntesis en la glándula pineal se encuentra estrechamente relacionada con la promoción del sueño en especies diurnas, por ejemplo, en el humano la propensión a dormir aumenta después del inicio de la producción endógena de melatonina durante las primeras horas de la noche (Zisapel, 2018).

1.3 Las etapas del ciclo sueño-vigilia.

La estructura del sueño está constituida por dos estados neurofisiológicos que se alternan cíclicamente, uno es el sueño de ondas lentas y el otro es el sueño con movimientos oculares rápidos (MOR; Sarasso *et al.*, 2021).

En los registros electroencefalográficos (EEG), el SOL se define por la presencia de ondas delta de gran amplitud y frecuencias que van desde los 0.1 hasta los 4 Hz generadas por el circuito tálamo-cortical (Sarasso *et al.*, 2021). Además de presentar una actividad parasimpática alta, es decir, existe una disminución de la presión arterial, la frecuencia cardiaca y la temperatura corporal (Gobbi y Comai, 2019).

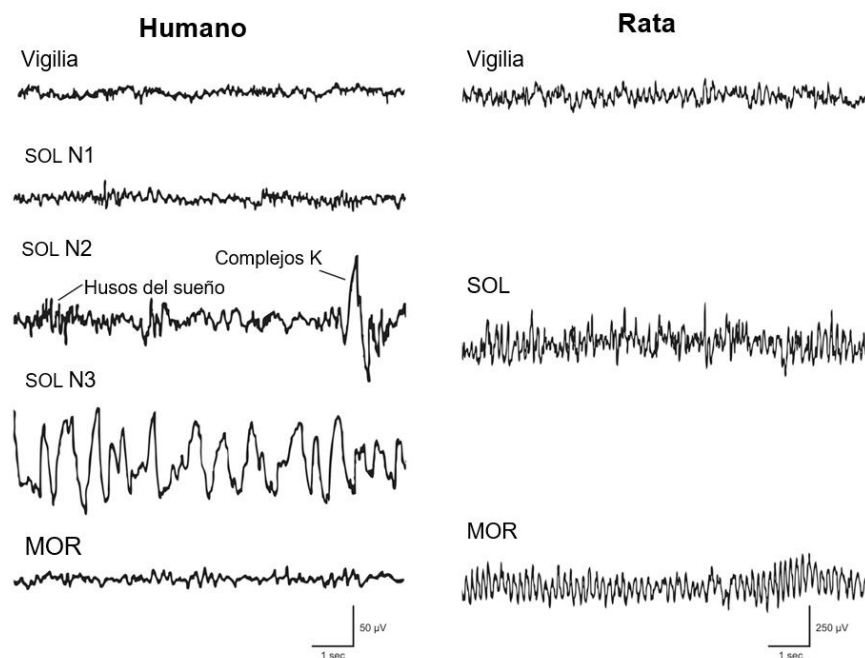


Figura 2. Ondas electroencefalográficas presentes en el ciclo sueño-vigilia. Las etapas del ciclo sueño-vigilia se pueden diferenciar a partir de las ondas electroencefalográficas, presentándose ondas beta durante la vigilia, ondas delta en el sueño SOL y ondas theta en el sueño MOR. En humanos, el sueño SOL se subdivide en 3 etapas progresivas de profundidad, iniciando con N1 que es una etapa de transición entre la vigilia y el sueño, N2 caracterizado por la presencia de los complejos K y los husos del sueño y N3, también llamado sueño profundo. Abreviaturas. SOL = sueño de ondas lentas, MOR = sueño con movimientos oculares rápidos. Modificado de Brown *et al.*, 2012.

A su vez, el SOL se subdivide en tres niveles graduales de profundidad denominados N1 que consiste en un estado de transición entre la vigilia y el SOL; N2, que se caracteriza por la presencia de los complejos K que son ondas agudas bifásicas de alto voltaje y frecuencias que se encuentran entre los 0.1 y los 4 Hz; y

los husos del sueño que son oscilaciones rítmicas espontáneas de ondas crecientes y menguantes con una frecuencia entre los 11 y los 16 Hz; y finalmente la etapa N3, también denominado sueño profundo que presenta ondas delta (Rodríguez-Labrada *et al.*, 2019).

Por otro lado, el sueño MOR se caracteriza por la atonía de los músculos esqueléticos, así como ráfagas de movimientos oculares rápidos y ondas theta de baja amplitud con una frecuencia que va de los 4 a los 8 Hz generadas por el núcleo septal medial (Gobbi y Comai, 2019). A esta etapa del sueño se le ha asociado con un incremento de la actividad simpática, lo que a su vez incrementa la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, la presión arterial y la temperatura corporal (Gobbi y Comai, 2019).

Los humanos, al poseer un sueño monofásico, es decir con un solo episodio de sueño prolongado de alrededor de 8 horas cada 24 horas, pueden presentar hasta 8 ciclos de SOL y sueño MOR por noche, este último sucede cada 90 minutos aproximadamente siendo el último estadio del ciclo, con una duración de entre 5 a 7 minutos en el primer episodio de sueño MOR y posteriormente aumenta progresivamente a lo largo de la noche llegando a alcanzar una duración de entre 20 a 40 minutos (Le Bon, 2020).

Cabe mencionar que el tiempo en cada etapa del sueño cambia a lo largo de la vida del individuo, siendo en recién nacidos los que tiene un mayor el tiempo de sueño MOR; mientras que el tiempo de SOL aumenta progresivamente con la edad, representando en la edad adulta aproximadamente entre un 75 hasta un 80 por ciento del tiempo total de sueño (Gobbi y Comai, 2019).

Con respecto a la vigilia, los ritmos electroencefalográficos que se encuentran en esta etapa se caracterizan por presentar una alta frecuencia y una baja amplitud variando a razón de la conducta que se esté realizando. En humanos, cuando el sujeto se encuentra en vigilia relajada con los ojos cerrados podemos observar ondas alfa de una frecuencia que va de los 8 a los 12 Hz, las cuales desaparecen ante la estimulación visual al abrir los ojos (Brown *et al.*, 2012).

1.4 Estructuras cerebrales implicadas en la regulación de la vigilia.

A partir de los experimentos realizados por los investigadores italianos Moruzzi y Magoun, en 1949, los cuales mostraron que la estimulación eléctrica de la formación reticular del tallo cerebral en gatos anestesiados cambiaba los patrones electroencefalográficos a una actividad rápida similar a la que se presenta en la vigilia, se estableció la existencia de una red neuronal responsable de la estimulación y mantenimiento de la vigilia, a la cual denominaron el sistema de activación reticular ascendente (Moruzzi y Magoun, 1949).

Esta red promotora de la vigilia se origina en la formación reticular del mesencéfalo y la protuberancia, a partir de donde se envían fibras descendentes hacia la médula espinal, regulando el tono del músculo esquelético en contraste con las diversas posturas requeridas por los comportamientos que se llevan a cabo durante la vigilia (Jones *et al.*, 2020); y las proyecciones ascendentes a través de la región paramedial del mesencéfalo que posteriormente se dividen en tres vías: la vía dorsal, la vía ventral y la vía directa que se conecta con la corteza cerebral (Jang *et al.*, 2015).

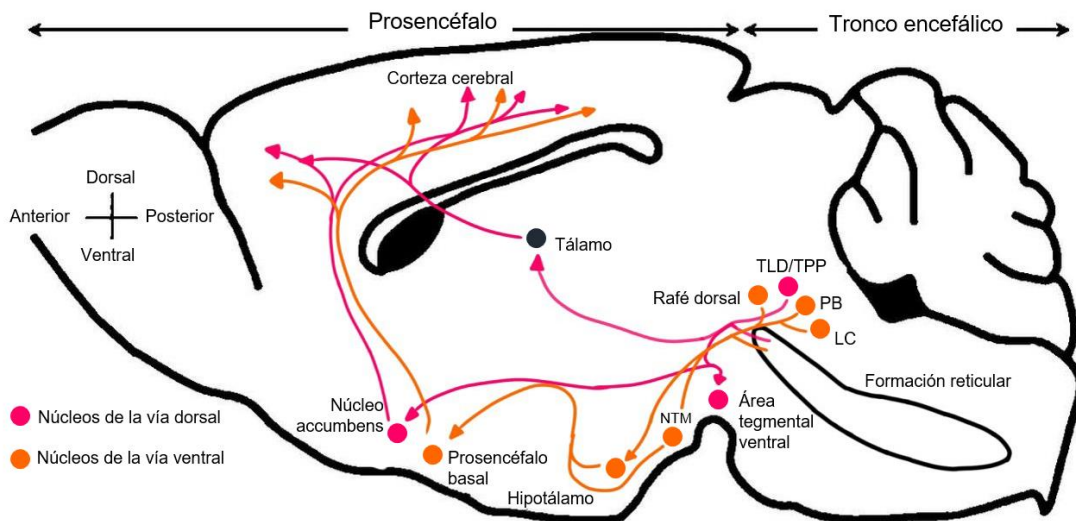


Figura 3. Núcleos promotores de la vigilia y sus proyecciones. Las neuronas de la formación reticular se proyectan hacia la corteza cerebral mediante las vías dorsal (rosa), ventral (naranja) y directa. En la vía dorsal las neuronas de la formación reticular y de los núcleos tegmentales pedúnculoopontino y laterodorsal se proyectan hacia la corteza cerebral y al área tegmental ventral la cual envía proyecciones al núcleo accumbens y finalmente a la corteza prefrontal. En la vía ventral, el núcleo dorsal del rafé, el núcleo parabraquial y locus coeruleus se proyectan hacia el prosencéfalo basal mediante el hipotálamo y el núcleo tuberomamilar, para finalmente proyectarse hacia la corteza cerebral. Abreviaturas. LC = Locus coeruleus, NTM = núcleo tuberomamilar, PB = núcleo parabraquial, TLD/TPP = núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculoopontino. Modificado de Gompf y Anaclet, 2020.

En la vía dorsal la formación reticular glutamatérgica y los núcleos tegmentales pedúnculo pontino y laterodorsal colinérgicos se proyectan hacia las áreas neocorticales. Además de ello, los núcleos pedúnculo pontino y laterodorsal envían proyecciones hacia las neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas del área tegmental ventral del mesencéfalo, la cual está involucrada en los procesos de recompensa, posteriormente se envían proyecciones hacia el núcleo accumbens y finalmente hacia la corteza prefrontal, permitiendo el procesamiento de la información sensorial, la motora y la cognitiva (Brown *et al.*, 2012).

La vía ventral comprende fibras del locus coeruleus noradrenérgico, del núcleo parabraquial glutamatérgico y de los núcleos del rafé dorsal y medial serotoninérgicos que se proyectan hacia el núcleo tuberomamilar histaminérgico y al hipotálamo lateral orexinérgico desde donde se envían proyecciones hacia el prosencéfalo basal de donde ascienden para inervar la corteza cerebral y regular la conducta motora (véase Figura 3; Scammell *et al.*, 2017; Gompf y Anaclet, 2020).

En 1998, dos grupos de investigadores descubrieron de manera independiente dos neuropéptidos derivados del mismo precursor producidos por las neuronas del hipotálamo dorsal y lateral. El Dr. De Lecea *et al.*, los nombró hipocretina 1 e hipocretina 2 debido a que fueron aislados del hipotálamo y poseían similitud con los aminoácidos de la hormona intestinal secretina (De Lecea *et al.*, 1998). Por otro lado, el grupo del Dr. Yanagisawa *et al.*, los denominó orexina A y orexina B a partir de la palabra griega “orexis” que significa apetito, debido a que al administrarlos centralmente en el ventrículo lateral de las ratas se estimulaba el consumo de alimentos (Sakurai *et al.*, 1998).

Dichas neuronas orexinérgicas juegan un rol fundamental en la regulación del ciclo sueño-vigilia, ya que se ha demostrado que su estimulación desencadena la transición desde el sueño hacia la vigilia, mientras que la supresión de su actividad induce un incremento en el sueño de ondas lentas (Li *et al.*, 2022). Además, la pérdida de estas neuronas causa la enfermedad denominada narcolepsia, un trastorno del sueño caracterizado por la tétada clásica que incluye somnolencia

diurna excesiva, alucinaciones hipnopómpicas, parálisis del sueño y cataplejía, que es la pérdida episódica del tono muscular (Thannickal *et al.*, 2000).

1.5 Estructuras cerebrales implicadas en la regulación del sueño de ondas lentas.

La primera estructura que se asoció con la promoción del SOL fue el área preóptica ventrolateral, ubicada en el hipotálamo anterior (Sherin *et al.*, 1996). Esta estructura, compuesta por aproximadamente un 80% de neuronas de naturaleza GABAérgica asociadas al péptido galanina, envía proyecciones al núcleo tuberomamilar, al locus coeruleus y a los núcleos del rafé dorsal y medial inhibiendo el sistema de excitación promotor de la vigilia (Sherin *et al.*, 1998).

A su vez, el área preóptica ventrolateral recibe fibras histaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas, creando una conexión recíproca con los núcleos monoaminérgicos, lo que conforma un sistema “switch” de prendido o apagado, el cual se homologa a un sube y baja o sistema “flip-flop” en los circuitos electrónicos (véase Figura 4; Chou *et al.*, 2002).

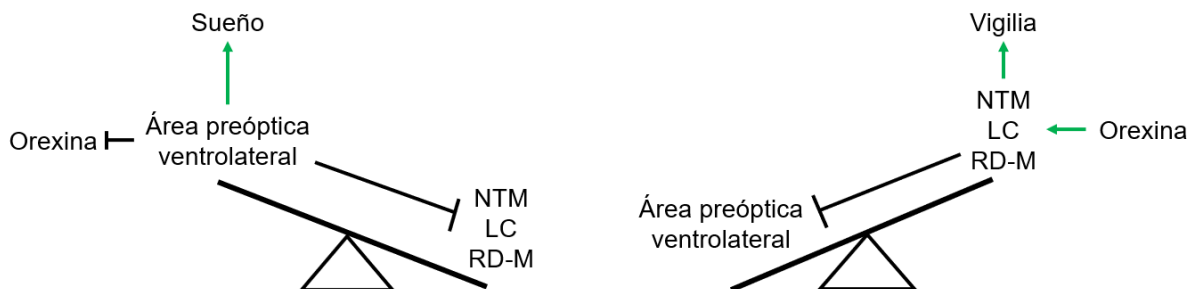


Figura 4. Sistema de switch o “flip-flop” del ciclo sueño-vigilia. Las neuronas del área preóptica ventrolateral envían y reciben proyecciones de los núcleos monoaminérgicos promotores de la vigilia: el núcleo tuberomamilar, el locus coeruleus y los núcleos del rafé dorsal y medial. Esta interacción recíproca conforma un sistema de switch o “flip-flop”, alternando el sueño de ondas lentas y la vigilia. Abreviaturas. LC = Locus coeruleus, NTM = núcleo tuberomamilar, RD-M = Rafé dorsal y medial. Modificado de Fuller *et al.*, 2006.

La fotoestimulación de estas neuronas GABA/galaninérgicas a frecuencias bajas (0.5-4Hz) promueve el sueño de ondas lentas, mientras que su inhibición optogenética lo reduce, además de que la estimulación quimiogénica de esta población neuronal disminuye la temperatura corporal mostrando tener un papel importante en la conexión entre el ciclo sueño-vigilia y la ritmicidad circadiana de la

temperatura corporal como se ha mostrado antes en registros polisomnográficos (Kroeger *et al.*, 2018).

En el hipotálamo también se encuentra otra estructura asociada con la estimulación del sueño de ondas lentas denominada el núcleo preóptico medial (Gong *et al.*, 2000). Sus neuronas GABAérgicas proyectan hacia el hipotálamo lateral perifornical orexinérgico, al núcleo del rafé dorsal serotoninérgico, al locus coeruleus noradrenérgico y a la sustancia gris periacueductal ventrolateral de naturaleza dopaminérgica, inhibiendo así los principales centros promotores de la vigilia (Ushakov *et al.*, 2007). Se ha descrito también una conexión con el área preóptica ventrolateral que, a través de proyecciones GABAérgicas, activa sus redes neuronales por desinhibición provocando las transiciones entre ambos estados cerebro-mentales (Walter *et al.*, 2019).

Asimismo, se ha mostrado que la actividad neuronal del núcleo preóptico medial aumenta al inicio del sueño de ondas lentas para posteriormente disminuir la tasa de descarga a lo largo del episodio de sueño (Alam *et al.*, 2014); además de presentar una mayor actividad después de la privación del sueño lo que sustenta su rol en el sueño de ondas lentas (Gvilia *et al.*, 2006).

Cabe destacar que la tasa de descarga de las neuronas del área preóptica ventrolateral al inicio del rebote en la fase de sueño de recuperación, después de la privación del sueño se encuentra elevada, pero a diferencia del núcleo preóptico medial no se presenta una disminución significativa a lo largo de los episodios de sueño de ondas lentas (Alam *et al.*, 2014).

Esta evidencia sugiere que núcleo preóptico medial juega un rol relevante en la estimulación del inicio del sueño de ondas lentas como una respuesta al aumento de la presión homeostática para dormir durante la fase de vigilia; mientras que las neuronas del área preóptica ventrolateral se asocian principalmente con su mantenimiento (Alam *et al.*, 2014; Gvilia *et al.*, 2006).

Por otra parte, en 2012, Anaclet y sus colaboradores identificaron una población de neuronas ubicadas en la región lateral y dorsal al nervio facial que se encuentran

activas durante el sueño de ondas lentas, pero no durante la vigilia, a las cuales denominaron la zona parafacial. Más del 50% de estas neuronas activas durante el sueño son de naturaleza GABAérgicas/glicinérgicas, por lo que la interrupción de la liberación de estos neurotransmisores produce un aumento del 40% en la cantidad del tiempo de vigilia diaria (Anaclet *et al.*, 2012).

Adicionalmente, estas neuronas envían proyecciones inhibitorias hacia el núcleo parabraquial, lo que disminuye la liberación de glutamato hacia las neuronas del prosencéfalo basal magnocelular las cuales proyectan hacia la corteza cerebral, dando como resultado la aparición de las ondas delta características del sueño de ondas lentas (Anaclet *et al.*, 2014). Si bien las neuronas GABAérgicas de la zona parafacial poseen otras conexiones con múltiples estructuras que se extienden a casi todo el cerebro, sus principales aferencias provienen del tronco del encéfalo, entre las cuales se destaca al núcleo mesencefálico profundo y a la sustancia gris periacueductal ventrolateral por su papel en la regulación del sueño de ondas lentas (Gompf y Anaclet, 2020).

Adicionalmente, la mayoría de los núcleos muestran una conexión recíproca, indicando la posible existencia de asas de retroalimentación que permiten regular sus funciones. Sin embargo, aún se requieren investigaciones adicionales para esclarecer el papel fisiológico de estos circuitos y cómo operan en los distintos estados cerebro-mentales (Su *et al.*, 2018).

Otra estructura involucrada en la regulación del sueño de ondas lentas es el prosencéfalo basal, cuyas neuronas GABAérgicas se dividen en subgrupos activos durante la vigilia, en el sueño MOR o en el sueño de ondas lentas. Estas últimas representan aproximadamente un 28% de la población neuronal GABAérgica del prosencéfalo basal y sus descargas se correlacionan positivamente con la actividad cortical delta (Hassani *et al.*, 2009). Estas neuronas GABAérgicas que son además somatostatina-positivas al ser estimuladas mediante activación optogenética inducen un aumento en la cantidad del sueño de ondas lentas y una disminución en el tiempo de vigilia a través de la inhibición de las neuronas colinérgicas,

glutamatérgicas y GABAérgicas con inmunorreactividad positiva para la parvalbúmina promotoras de la vigilia del prosencéfalo basal (Xu *et al.*, 2015).

Finalmente, se debe destacar el papel de las neuronas corticales en la estimulación del sueño de ondas lentas. Las primeras hipótesis proponían que la actividad de ondas delta se debía a una respuesta pasiva a las señales subcorticales, no obstante, las investigaciones actuales muestran que dichas neuronas podrían participar activamente en la estimulación y el mantenimiento del sueño de ondas lentas (véase Figura 5; Gompf y Anaclet, 2020).

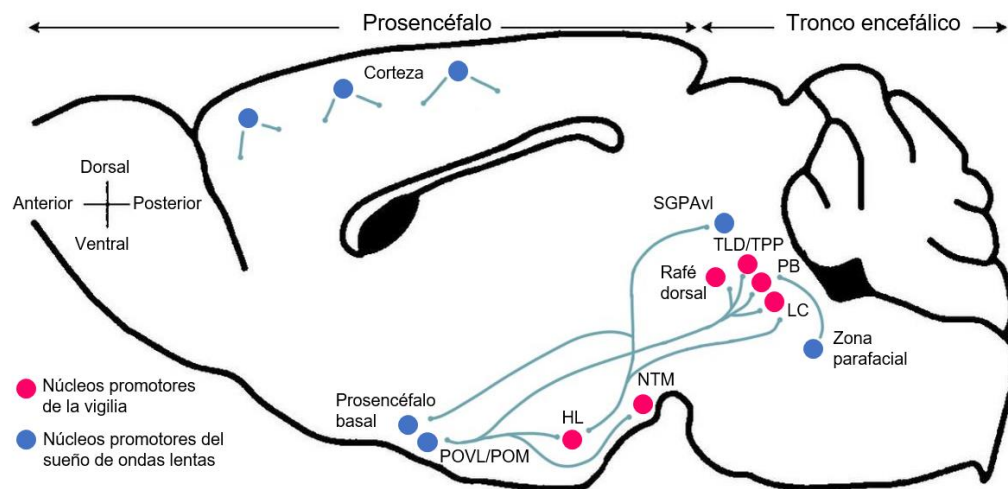


Figura 5. Núcleos promotores del sueño de ondas lentas y sus proyecciones. Las neuronas GABAérgicas del área preóptica ventrolateral y del núcleo preóptico medio envían sus proyecciones hacia el núcleo tuberomamilar, el locus coeruleus, los núcleos del rafé dorsal y medial, el hipotálamo lateral y la sustancia gris periacueductal ventrolateral inhibiendo así los principales núcleos promotores de la vigilia. La zona parafacial inhibe la actividad del núcleo parabraquial interrumpiendo la actividad glutamatérgica del prosencéfalo basal. Por otro lado, las interneuronas inhibitorias de la corteza inducen la actividad cortical delta característica del sueño de ondas lentas. Abreviaturas. HL = Hipotálamo lateral, LC = locus coeruleus, NTM = núcleo tuberomamilar, PB = núcleo parabraquial, POVL/POM = área preóptica ventrolateral y núcleo preóptico medio, SGPAVI = sustancia gris periacueductal ventrolateral, TLD/TPP = núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculo pontino. Modificado de Gompf y Anaclet, 2020.

Entre las poblaciones de neuronas corticales que se han asociado con la regulación del sueño de ondas lentas se encuentran el subconjunto de interneuronas GABAérgicas que expresan óxido nítrico sintasa neuronal tipo 1 (nNOS); y las que expresan el receptor de neurokinina tipo I de la sustancia P debido a que su actividad neuronal se relaciona con la cantidad de sueño de ondas lentas y con los cambios de actividad de ondas delta en la corteza cerebral (Dittrich *et al.*, 2012; Gerashchenko *et al.*, 2008). Además, se ha mostrado que la proporción de

activación de estas neuronas depende de la presión de sueño acumulada durante la vigilia (45).

Adicionalmente, se ha descrito que la estimulación quimiogénica de las interneuronas inhibitorias que expresan somatostatina aumenta la actividad de ondas delta, así como la duración del sueño de ondas lentas, mientras que su inhibición produce el efecto contrario (Funk *et al.*, 2017).

1.6 Estructuras cerebrales implicadas en la regulación del sueño con movimientos oculares rápidos.

La regulación del sueño MOR depende de la actividad de diversos grupos de neuronas encargadas tanto de su estimulación como de su inhibición, lo que conforma un sistema switch de prendido o apagado el cual se extiende desde el tronco encefálico hasta el hipotálamo (véase Figura 6; Gompf y Anaclet, 2020).

Una de las principales estructuras asociadas con la estimulación del sueño MOR es el núcleo sublaterodorsal en la rata o el núcleo subcoeruleus en el humano, el cual está compuesto por neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas, cuya estimulación farmacológica induce un estado similar al sueño MOR, produciendo actividad electroencefalográfica de ondas theta y atonía muscular (Boissard *et al.*, 2002).

Durante la vigilia y el sueño de ondas lentas, estas neuronas se encuentran inhibidas tónicamente por aferencias GABAérgicas provenientes de los núcleos reticulares pontinos mesencefálicos y, en menor proporción, por el núcleo reticular parvocelular. También reciben entradas tónicas glutamatérgicas provenientes de las estructuras ya mencionadas; así como del área motora primaria de la corteza frontal, el núcleo central de la amígdala, el núcleo del lecho de la estría terminal, el hipotálamo lateral, la sustancia gris periacueductal y el núcleo reticular paragigantocelular lateral (Boissard *et al.*, 2003).

A su vez las neuronas glutamatérgicas del núcleo sublaterodorsal proyectan rostralmente hacia los núcleos talámicos intralaminares, el hipotálamo posterior y el prosencéfalo basal regulando la activación cortical y la actividad de ondas theta en

el hipocampo, y caudalmente se dirigen hacia las neuronas glicinérgicas de la formación reticular del bulbo raquídeo, promoviendo la atonía muscular (Boissard *et al.*, 2002).

Por otra parte, se ha descrito que el núcleo tegmental pedúnculo-pontino y el núcleo tegmental laterodorsal ubicados en el tronco encefálico contienen neuronas colinérgicas que se encuentran principalmente activas durante la vigilia y el sueño MOR; mientras que, su estimulación optogenética durante el sueño de ondas lentas aumenta el número de episodios de sueño MOR sin cambiar su duración (Van Dort *et al.*, 2015). Asimismo, las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de dichos núcleos han mostrado patrones de descarga similares a los de las neuronas colinérgicas, lo que muestra que también participan en la regulación del sueño MOR (Boucetta *et al.*, 2014).

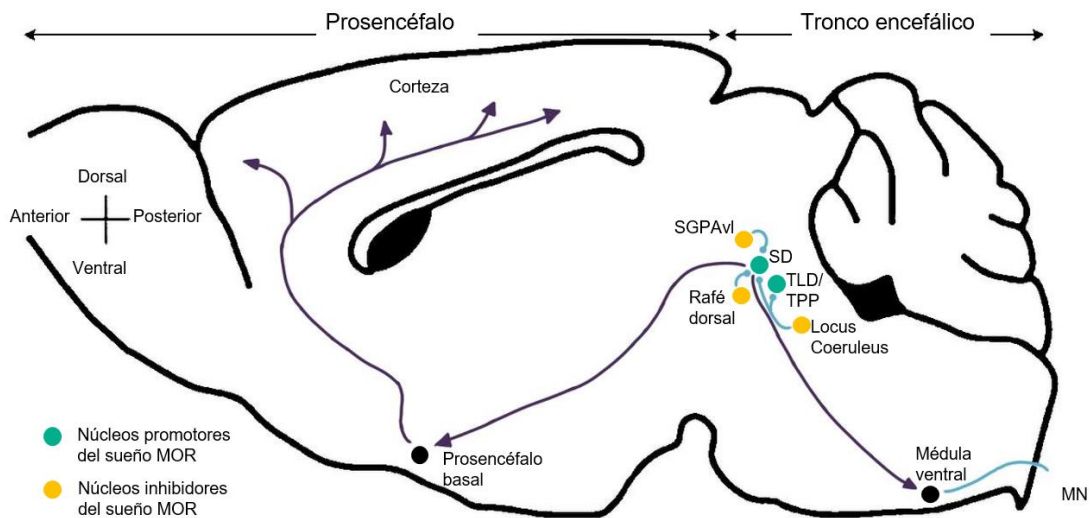


Figura 6. Núcleos promotores del sueño MOR y sus proyecciones. Las neuronas del núcleo sublaterodorsal se proyectan rostralmente hacia el prosencéfalo basal, regulando la actividad cortical, mientras que caudalmente se dirigen hacia la médula, inhibiendo a las motoneuronas y produciendo la atonía muscular característica del sueño MOR. Adicionalmente, los núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculo-pontino estimulan el sueño MOR. El rafe dorsal, el locus coeruleus y la sustancia gris periacueductal ventrolateral envían proyecciones hacia el núcleo sublaterodorsal inhibiendo su actividad durante el estado de vigilia. Abreviaturas. MN = Motoneuronas, SD = núcleo sublaterodorsal, SGPAvl = sustancia gris periacueductal ventrolateral, TLD/TPP = núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculo-pontino. Modificado de Gompf y Anaclet, 2020.

Por otra parte, varios núcleos de la protuberancia regulan negativamente el inicio del sueño MOR, como el núcleo del rafe dorsal serotoninérgico y el locus coeruleus noradrenérgico, que son estructuras promotoras de la vigilia, las cuales envían sus proyecciones al núcleo sublaterodorsal, al núcleo tegmental pedúnculo-pontino y al

núcleo tegmental laterodorsal causando la inhibición de su actividad lo que suprime al sueño MOR (Scammell *et al.*, 2017).

Se ha mostrado también que la sustancia gris periacueductal ventrolateral y la región dorsal del núcleo reticular mesencefálico poseen neuronas GABAérgicas que impiden el inicio del sueño MOR a través de la inhibición de las neuronas promotoras del sueño MOR del núcleo sublaterodorsal (Sapin *et al.*, 2009).

Adicionalmente, existe un grupo de neuronas hipotalámicas GABAérgicas/galaninérgicas adyacentes al área preóptica ventrolateral las cuales se denominan el área preóptica ventrolateral extendida. Estas neuronas GABAérgicas/galaninérgicas se encuentran activas durante el sueño MOR; mientras que la lesión de esta área mediante microinyecciones de ácido iboténico lo disminuye (Lu *et al.*, 2000). Asimismo, dichas neuronas envían sus proyecciones hacia las neuronas del rafé dorsal serotoninérgico y del locus coeruleus noradrenérgico, evitando la inhibición de los núcleos promotores del sueño MOR (Lu *et al.*, 2002).

Existen otras neuronas GABAérgicas/galaninérgicas ubicadas en el hipotálamo dorsomedial que están implicadas tanto en la estimulación como en la inhibición del sueño MOR, las cuales están divididas en dos subpoblaciones, las neuronas que se proyectan hacia el área preóptica inhiben al sueño MOR y promueven el sueño de ondas lentas; y el segundo grupo que proyecta hacia el núcleo del rafé pálido estimulando el inicio del sueño MOR y suprimiendo al sueño de ondas lentas regulando de manera antagónica el sueño de ondas lentas y el sueño MOR (Chen *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES GENERALES.

2.1 Trastornos del sueño y alteraciones del ritmo circadiano.

Los trastornos del sueño son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una alteración en los patrones regulares del ciclo sueño-vigilia, pudiendo manifestarse como una cantidad insuficiente de sueño, somnolencia excesiva o movimientos anormales durante el sueño (K Pavlova y Latreille, 2019).

La tercera edición de la Clasificación Internacional de Trastornos del Sueño, o ICSD-3 por sus siglas en inglés, las divide en las categorías de insomnio, trastornos respiratorios relacionados con el sueño, trastornos centrales de hipersomnolencia, trastornos del ritmo circadiano sueño-vigilia, parasomnias, trastornos del movimiento relacionados con el sueño y otros trastornos del sueño (Sateia, 2014).

El insomnio se define como la dificultad para iniciar o mantener el sueño a pesar de presentarse las condiciones óptimas para dormir, lo que afecta el rendimiento diurno del paciente (Bollu y Kaur, 2019). El insomnio es el trastorno del sueño más frecuente con una prevalencia internacional que varía entre el 10% y el 60% de la población, siendo más común en adultos mayores, mujeres y pacientes con afecciones médicas y/o psiquiátricas (Bhaskar *et al.*, 2016).

Actualmente, la ICSD-3 clasifica el insomnio en función del tiempo que el paciente ha presentado los síntomas, tomando en cuenta un periodo menor a los tres meses para el insomnio de corto plazo, y para el insomnio crónico una frecuencia de tres o más veces a la semana por más de tres meses (Sateia, 2014).

Además de esta clasificación, se debe considerar si existen comorbilidades y si el problema se presenta para iniciar o para mantener el sueño, y así determinar el tipo de tratamiento que puede darse a través de terapia farmacológica, como es el uso de las benzodiazepinas y otros hipnóticos, la melatonina y sus agonistas, los antagonistas de la orexina, los antidepresivos y los antihistamínicos; pero también mediante terapia no farmacológica como el mejoramiento de la higiene del sueño y

la terapia cognitiva-conductual o una combinación de ambos (K Pavlova y Latreille, 2019).

Por otra parte, los trastornos centrales de hipersomnolencia son aquellos en los que el paciente presenta una somnolencia diurna excesiva que no se deriva de otro trastorno del sueño o de alguna alteración en su ciclo circadiano, entre ellos se encuentra la narcolepsia tipo 1, la narcolepsia tipo 2, la hipersomnolia idiopática, el síndrome de Kleine-Levin, la hipersomnolia debido a un trastorno médico, la hipersomnolia debido a un medicamento o sustancia, la hipersomnolia asociada a un trastorno psiquiátrico y el síndrome de sueño insuficiente (Sateia, 2014).

La narcolepsia tipo 1 es un trastorno crónico de la regulación del sueño MOR ocasionada por la pérdida selectiva de las neuronas productoras de orexina, cuyos síntomas característicos son la somnolencia diurna excesiva, la parálisis del sueño, las alucinaciones hipnopómpicas y la cataplejía, es decir, la pérdida del tono muscular repentina con conservación de la conciencia desencadenada especialmente por emociones positivas, como la risa o la actividad sexual (K Pavlova y Latreille, 2019).

Su prevalencia estimada va de 1.05 a 79.4 por cada 100,000 personas y su incidencia varía entre 0.06 a 6.56 por cada 100,000 personas por año, siendo diagnosticado principalmente durante la infancia y la adolescencia (Wang *et al.*, 2022).

Su diagnóstico se realiza a partir de la medición de los niveles de orexina A en el líquido cefalorraquídeo cuando estos valores se encuentran por debajo de los 110 pg/mL; o bien a través de la prueba de latencias múltiples del sueño cuando se presenta una latencia media menor o igual a los 8 minutos, al menos dos inicios de sueño con periodos de sueño MOR y más de un episodio de cataplejía en cuatro registros de sueño al permanecer el paciente en un cuarto poco iluminado y sin ruido u otros estímulos a lo largo del día (Sateia, 2014).

En cuanto a su tratamiento, está enfocado en aminorar la sintomatología, ya que la pérdida de las neuronas que contienen orexina es irreversible, por lo tanto, para

disminuir la somnolencia diurna excesiva se utilizan principalmente fármacos psicoestimulantes como son el modafinilo, el metilfenidato y el pitolisant; mientras que para el tratamiento de los síntomas derivados de la desregulación del sueño MOR como la cataplejía, las alucinaciones hipnagógicas y la parálisis del sueño se emplean el oxibato de sodio y los antidepresivos tricíclicos (Barateau *et al.*, 2019).

La narcolepsia tipo 2 comparte la sintomatología y el tratamiento de la narcolepsia tipo 1 a excepción de la cataplejía, además de presentarse niveles normales de orexina A en el líquido cefalorraquídeo, por lo que su diagnóstico se debe realizar únicamente a través de la prueba de latencias múltiples del sueño, tomando en cuenta una latencia media menor o igual a los 8 minutos y al menos dos inicios de sueño con periodos de sueño MOR, sin presentarse episodios de cataplejía y sin que la sintomatología se pueda explicar a partir de la presencia de otro trastorno del sueño (Sateia, 2014).

La falta de biomarcadores específicos adicionales a la orexina para su diagnóstico y el hecho de que la restricción crónica del sueño y el trabajo con cambios de turnos pueden mostrar resultados similares en la prueba de latencias múltiples del sueño han representado un obstáculo para determinar la prevalencia de la narcolepsia tipo 2. Sin embargo, se ha estimado que la frecuencia de la narcolepsia tipo 2 es mucho menor en comparación con la narcolepsia tipo 1 (Baumann-Vogel *et al.*, 2021).

La siguiente categoría de los trastornos del sueño son los relacionados con el ritmo circadiano del ciclo sueño-vigilia en la cual se incluyen el trastorno de la fase retrasada de sueño-vigilia, el trastorno de la fase avanzada de sueño-vigilia, el trastorno del ritmo irregular sueño-vigilia, el trastorno del ritmo sueño-vigilia distinto de las 24 h, el trastorno de sueño debido a cambio del turno de trabajo, el trastorno de desfase de horario y el trastorno circadiano del sueño-vigilia no especificado (Sateia, 2014).

Su diagnóstico se realiza mediante el uso de polisomnografía, cuestionarios para identificar el cronotipo y la medición de los niveles de melatonina en saliva u orina; además de que la alteración del ritmo circadiano debe presentarse durante al menos tres meses, a excepción del trastorno de desfase de horario el cual no requiere una

duración mínima para su diagnóstico (Sateia, 2014). A pesar de dichos criterios, los trastornos del ritmo circadiano sueño-vigilia suelen ser erróneamente diagnosticados como insomnio o hipersomnias, por ejemplo, un estudio realizado en pacientes con insomnio mostró que del 10% al 22% de los casos presentaban una etiología circadiana (Flynn-Evans *et al.*, 2017).

El primer trastorno del ritmo circadiano sueño-vigilia incluido en el ICSD-3 es el trastorno de la fase retrasada de sueño-vigilia, el cual se caracteriza porque el paciente posee un ritmo endógeno de 24 horas desfasado del entorno, dando como resultado la incapacidad de conciliar el sueño en el horario deseado y la dificultad de despertar a la hora requerida para desempeñar sus actividades diurnas, sin afectar la calidad subjetiva del sueño (Zisapel, 2018), su prevalencia varía dependiendo de la población estudiada, presentándose con frecuencias que van desde un 0.17% hasta un 8.9% (Sun *et al.*, 2022).

En cuanto al tratamiento, los métodos más comunes son la cronoterapia, el tratamiento fótico, la administración de melatonina, la terapia cognitivo-conductual y la higiene del sueño (Sun *et al.*, 2022). La administración del antipsicótico aripiprazol en dosis bajas ha mostrado reducir el tiempo total de sueño nocturno y produce un adelanto de la fase de sueño en pacientes con trastorno de la fase retrasada de sueño-vigilia, por lo que se considera su posible uso para el tratamiento de dicho trastorno (Omori *et al.*, 2018).

Por otra parte, el trastorno del ritmo sueño-vigilia distinto de las 24 horas se define como la presencia de un ritmo endógeno que no está sincronizado con el ciclo de 24 horas medio ambiental (Malkani *et al.*, 2018). A pesar de que las personas invidentes son la principal población afectada, con una prevalencia de aproximadamente de un 50% (Sun *et al.*, 2022); también se ha reportado, aunque en menor medida, en personas videntes donde los mecanismos patogénicos que desencadenan su desarrollo aún permanecen desconocidos (Hayakawa *et al.*, 2005).

El tratamiento para los pacientes que no perciben los estímulos lumínicos se realiza mediante higiene del sueño, ajustes en el tiempo de sueño y con la administración

de melatonina, mientras que, para los pacientes videntes, además de los métodos ya mencionados, también se recomienda el tratamiento fótico (Sun *et al.*, 2022).

2.2 Producción pineal de la melatonina y sus receptores.

La melatonina, o 5-metoxi-N-acetilriptamina, es una de las moléculas biológicamente activas más antiguas de la naturaleza y se encuentra presente en casi todos los seres vivos (Tosches *et al.*, 2014). Esta fue aislada por primera vez en 1958, por Aaron Lerner y sus colaboradores, a partir de glándulas pineales bovinas (Lerner *et al.*, 1958).

En vertebrados, esta indolamina es producida localmente por múltiples tejidos como la piel, el tracto gastrointestinal, la retina y la médula ósea, entre otros (Cipolla-Neto *et al.*, 2018). Sin embargo, su producción central se da en la glándula pineal, la cual es una glándula neuroendocrina no pareada, localizada en el techo del tercer ventrículo y está compuesta principalmente por las células productoras de melatonina denominadas pinealocitos (Amaral y Cipolla-Neto, 2018).

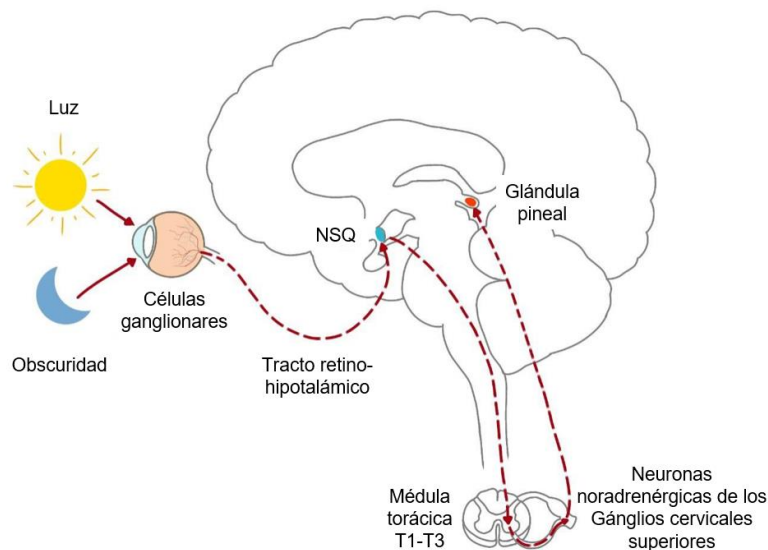


Figura 7. Regulación de la producción pineal de melatonina. Las células ganglionares de la retina perciben los cambios lumínicos medioambientales y envían una señal al núcleo supraquiasmático a través del tracto retino-hipotalámico, el cual se proyecta hacia las neuronas simpáticas preganglionares de los primeros segmentos torácicos que a través de su interacción con las neuronas noradrenérgicas de los ganglios cervicales superiores regula la producción de melatonina en la glándula pineal, inhibiéndola en presencia de luz y estimulándola en el periodo de oscuridad. Abreviaturas. NSQ = Núcleo supraquiasmático. Modificado de Gaspar y Cipolla-Neto, 2018.

Es importante destacar que su producción está sincronizada con los cambios de luz/obscuridad medioambientales percibidos por un grupo específico de células ganglionares de la retina que contienen un fotopigmento llamado melanopsina (Berson *et al.*, 2002). Estas células envían proyecciones a través de la vía retino-hipotalámica hacia el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, el cual a su vez proyecta directa e indirectamente hacia las neuronas simpáticas preganglionares de los primeros segmentos torácicos de la médula espinal, a partir de los cuales se envían proyecciones hacia las neuronas simpáticas postganglionares de los ganglios cervicales superiores cuyas fibras nerviosas forman los nervios coronarios que llegan a la glándula pineal (véase Figura 7; Amaral y Cipolla-Neto, 2018).

Cuando el núcleo supraquiasmático es activado por un estímulo lumínico envía una señal inhibitoria a las neuronas noradrenérgicas para evitar la síntesis de melatonina. Por el contrario, durante el periodo de obscuridad estas neuronas simpáticas son activadas, liberando noradrenalina la cual interactúa con los receptores noradrenérgicos $\alpha1b$ y $\beta1$ localizados en la membrana de los pinealocitos desencadenando la síntesis de melatonina (Cipolla-Neto *et al.*, 2018).

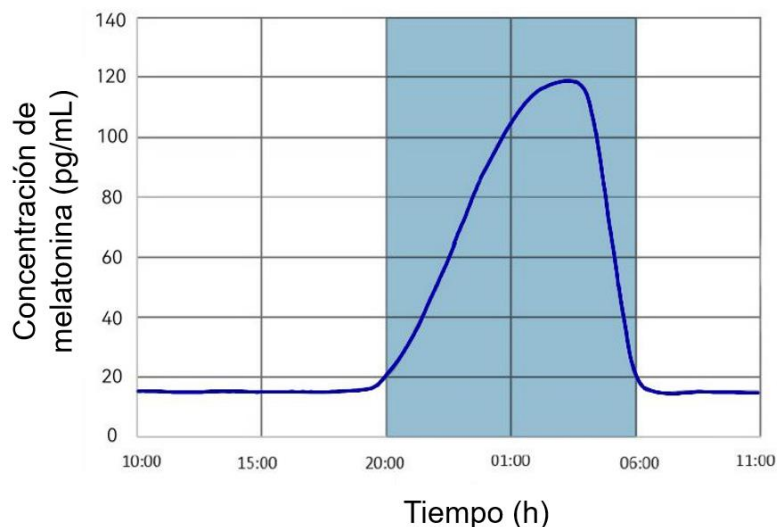


Figura 8. Concentración plasmática de melatonina en humanos a lo largo del día. Durante la fase de luz, marcada con blanco, la concentración de melatonina se encuentra en niveles que oscilan entre los 10 y los 20 pg/mL. Al inicio de la fase de oscuridad, marcada con azul, comienza la secreción de melatonina, alcanzando su pico máximo entre las 2 y las 4 horas, disminuyendo gradualmente hasta alcanzar nuevamente los niveles de la fase de luz al despertar. Modificado de Tordjman *et al.*, 2017.

Una vez sintetizada la melatonina no puede ser almacenada debido a su naturaleza anfifílica, por lo que se libera inmediatamente a través del tercer ventrículo hacia el líquido cefalorraquídeo y hacia la circulación general, permitiendo obtener a partir de su concentración sérica un reflejo exacto de su producción a nivel de la glándula pineal (Amaral y Cipolla-Neto, 2018).

Estos niveles de concentración sérica van cambiando a lo largo del día, en relación con el ciclo luz/obscuridad medioambiental, mostrando en humanos durante el día niveles que oscilan entre los 10 y 20 pg/mL; mientras que durante la noche varían entre 80 y 120 pg/mL. Esto se debe a que la producción de melatonina comienza poco después de la puesta del sol, alcanzando el pico máximo entre las 0200 y las 0400 horas, para posteriormente disminuir gradualmente durante la segunda mitad de la noche, manteniendo los niveles bajos durante el día (véase Figura 8; Tordjman *et al.*, 2017).

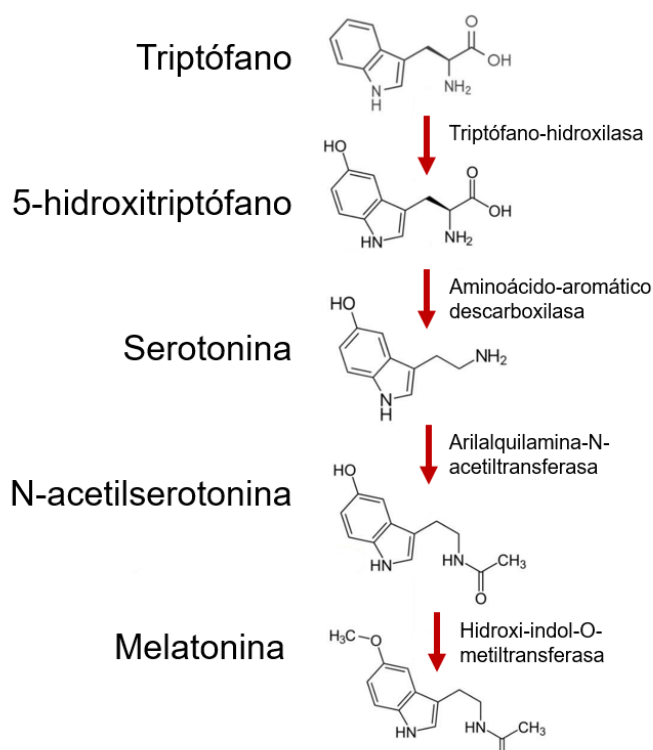


Figura 9. Síntesis molecular de la melatonina. La melatonina se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano a través de un proceso de cuatro reacciones enzimáticas. Del lado derecho se encuentran las enzimas implicadas en el proceso y del lado izquierdo las moléculas resultantes. Modificado de Gaspar y Cipolla-Neto, 2018.

A nivel molecular, la síntesis de la melatonina comienza a partir del triptófano, el cual es convertido a 5-hidroxitriptófano por la acción de la triptófano-hidroxilasa y posteriormente, por la acción de la aminoácido-aromático-descarboxilasa que la convierte en serotonina. La señal adrenérgica activa al adenilato ciclasa generando un aumento en los niveles de adenosín monofosfato cíclico lo que fosforila a la arilalquilamina-N-acetiltransferasa que convierte la serotonina en N-acetilserotonina, a partir de la cual la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa produce melatonina (véase Figura 9; Lee *et al.*, 2021).

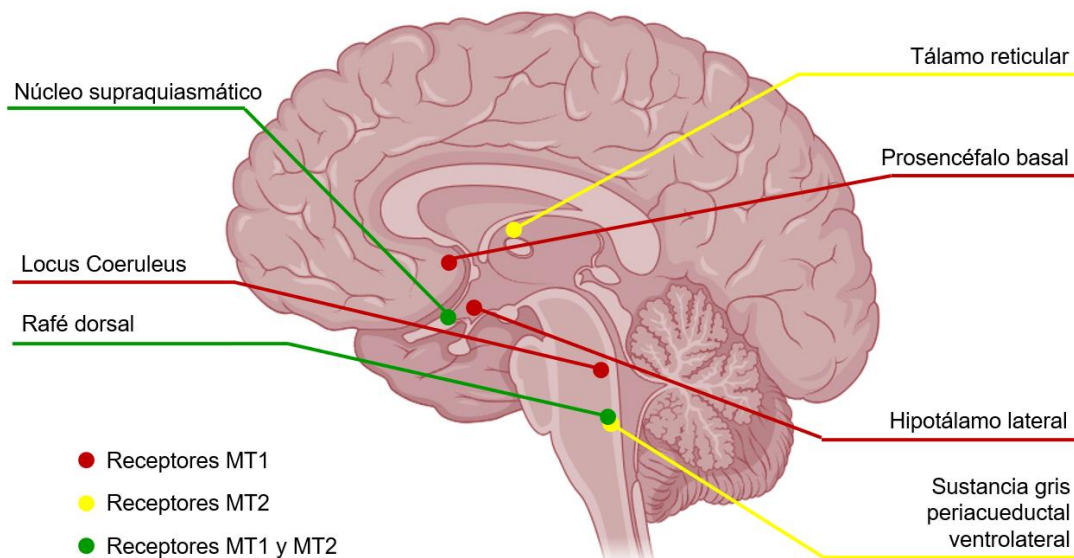


Figura 10. Expresión de los receptores de melatonina MT1 y MT2 en los núcleos encargados de la regulación del ciclo sueño-vigilia. Los receptores de melatonina MT1 y MT2 se expresan en diversas estructuras encargadas de la regulación del ciclo sueño-vigilia. Las estructuras donde se expresa el receptor MT1 se encuentran marcadas con rojo, las que expresan el receptor MT2 están marcadas con amarillo y las que expresan tanto el receptor MT1 como MT2 se señalan con verde. Modificado de Gobbi y Comai, 2019.

Como se mencionó anteriormente, la melatonina es una molécula anfifílica, por lo que altamente permeable a través de las membranas celulares, por lo que se le puede encontrar en prácticamente cualquier compartimento del organismo, permitiéndole interactuar directamente con las moléculas y de esta forma actuar como antioxidante (Tosches *et al.*, 2014). Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de sus funciones fisiológicas son realizadas a través de su interacción con sus receptores de membrana de alta afinidad, denominados melatonina 1 (MT1) y

melatonina 2 (MT2), expresados ampliamente en el sistema nervioso central, así como en casi todos los tejidos periféricos (Amaral y Cipolla-Neto, 2018).

A pesar de esto, la coexpresión celular de dichos receptores es muy escasa, por lo que se pueden señalar una mayor expresión del receptor MT1 en la pars tuberalis de la adenohipófisis y del núcleo supraquiasmático; en cambio, el receptor MT2 es más abundante en el bulbo olfatorio, el prosencéfalo, el hipocampo, la amígdala, y el colículo superior (Klosen *et al.*, 2019).

Esta diferencia en la expresión de los receptores de melatonina también se encuentra en los núcleos encargados de la regulación del ciclo sueño-vigilia, ya que la expresión de los receptores MT1 es mayor en el hipotálamo lateral, el locus coeruleus y prosencéfalo basal; mientras que la expresión de los receptores MT2 en la sustancia gris periacueductal ventrolateral y en el tálamo reticular; y en el núcleo del rafé dorsal y el núcleo supraquiasmático expresan ambos tipos de receptores (véase Figura 10; Gobbi y Comai, 2019).

En los humanos, las proteínas MT1 y MT2 son codificadas por los genes MTNR1A ubicado en el cromosoma 4q35; y el MTNR1B que se localiza en el cromosoma 11q21-22, con una masa de 39,374 y 40,188 Da, respectivamente, sin tener en cuenta sus modificaciones postraduccionales; estos péptidos tienen un 70% de homología (Nikolaev *et al.*, 2021).

Estos receptores tienen siete segmentos transmembranales, los cuales se acoplan típicamente a proteínas $G_{ai/o}$, sin embargo, la evidencia apunta a que también poseen la capacidad de acoplarse a otros subtipos de proteínas G, por ejemplo, en las células madre mesenquimales los receptores MT2 se acoplan a las proteínas $G_{\alpha q/11}$, desencadenando la estimulación de la motilidad celular (Lee *et al.*, 2014). Por otra parte, en las células pancreáticas el aumento de la secreción de glucagón mediado por los receptores de melatonina involucra la unión a las proteínas $G_{\alpha q/11}$ (Bähr *et al.*, 2012). Mientras que, en las células epiteliales prostáticas, la melatonina suprime la proliferación celular mediante la activación simultánea de las proteínas $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha q}$ (Shiu *et al.*, 2010).

A nivel transcripcional, la activación de los receptores de melatonina acoplados a las proteínas *Gai/o* da como resultado la inhibición de la producción de monofosfato de adenosina cíclico y la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares tipo 1 y tipo 2 a través de la cascada de señalización $G\beta\gamma/PI3K/PKC\zeta/c\text{-Raf}$ (Chen *et al.*, 2020), así como la activación de los canales iónicos de calcio dependientes de voltaje y los canales de potasio dependientes de calcio (Nikolaev *et al.*, 2021).

Existen algunas diferencias entre las vías de señalización de ambos receptores, pero la más relevante hasta el momento es su capacidad de inhibir la producción de guanosín monofosfato cíclico únicamente por parte del receptor MT2 (Dortch-Carnes *et al.*, 2013).

Es necesario señalar que al igual que otros receptores acoplados a proteínas G éstos pueden formar oligómeros, predominantemente dímeros, manteniendo funcionales sus dos sitios de unión con su respectiva selectividad por sus ligandos (Ayoub *et al.*, 2002).

No obstante, la probabilidad de formar heterodímeros MT1/MT2 es igual o mayor que la de formar homodímeros, ya que se mostró en un estudio *in vitro* que los receptores MT1 poseen una afinidad relativa similar tanto por otros receptores MT1 como por los receptores MT2, siendo los niveles de expresión de ambos receptores el factor determinante para su unión, mientras que los receptores MT2 poseen mayor tendencia a formar heterodímeros (Ayoub *et al.*, 2004).

Si bien las diferencias entre las señales desencadenadas por la activación de los receptores de melatonina homodiméricos y heterodiméricos aún no se han esclarecido del todo; se plantea que estos últimos activan preferentemente las proteínas *Gq* debido a que se ha descrito que los inhibidores de proteínas *Gi* no afectan la respuesta de los receptores heterodiméricos de los fotorreceptores de la retina; mientras que, la inhibición de los receptores de trifosfato de inositol abolieron su efecto, además de observarse un aumento en la producción de monofosfato de adenosina cíclico en células HEK293T transfectadas con ambos receptores (Baba *et al.*, 2013).

Los receptores de melatonina también tienen la capacidad de formar heterodímeros con otros receptores acoplados a proteínas G, por ejemplo, se ha demostrado la existencia de heterodímeros funcionales del receptor MT2 con receptores de serotonina del subtipo 5-HT_{2C} *in vitro*, los cuales amplificaron la activación de la vía Gq mediada por serotonina (Kamal *et al.*, 2015).

Finalmente, se debe mencionar la existencia de un tercer sitio de unión de la melatonina denominado MT3, el cual fue descrito inicialmente en las meninges de hámster y después en múltiples órganos periféricos de este roedor como son el intestino, el hígado, el riñón, el pulmón, el músculo esquelético y el corazón (Paul *et al.*, 1999). Posteriormente el receptor MT3 se identificó como la enzima quinona reductasa tipo 2 presente tanto en humanos como en otros mamíferos, la cual a diferencia de los receptores MT1 y MT2, posee una menor afinidad por la melatonina y una cinética de asociación/disociación de ligando muy rápida (Nosjean *et al.*, 2000; Nosjean *et al.*, 2001).

2.3 La melatonina exógena y su efecto sobre el ciclo sueño-vigilia.

La melatonina está asociada a diversos procesos neuroquímicos y metabólicos, siendo su función básica su papel como protector celular contra los radicales libres y los procesos oxidativos (Chitimus *et al.*, 2020). Sin embargo, actualmente se sabe que también está implicada en la modulación de la plasticidad neuronal, la neurogénesis, el sistema inmunológico y los ritmos circadianos, lo que ha permitido proponer el uso de melatonina exógena como tratamiento para diversas enfermedades, especialmente en los trastornos del ciclo sueño-vigilia (Biggio *et al.*, 2021).

La melatonina exógena administrada tanto por vía oral como por intravenosa es absorbida con una cinética de primer orden. Sin embargo, otros aspectos de su farmacocinética varían dependiendo de la vía de administración utilizada. Una de las más utilizadas es la vía oral, cuyas dosis oscilan de 0.5 a 6 mg/Kg las cuales tienen una vida media que va desde los 46 hasta los 65 minutos, y una biodisponibilidad que varía entre un 3% hasta un 33%. Por otro lado, la melatonina

vía intravenosa en dosis de 0.005 a 2 mg/Kg tiene una vida media entre 28 hasta 60 minutos (Andersen *et al.*, 2016).

Otras vías de administración son la intravesical, la rectal, la transdérmica y la vaginal, de las cuales cabe destacar que la administración rectal y vaginal han mostrado una biodisponibilidad de entre un 36% hasta un 97.8%, siendo mayores que la vía oral estándar, sin embargo, la información sobre estas vías de administración en humanos aún es escasa (Zetner *et al.*, 2021).

En cuanto al metabolismo de la melatonina, este se lleva a cabo principalmente en el hígado y en segunda instancia en el riñón a partir de la acción de la enzima CYP1A2 del citocromo P450, que la hidroxila hacia 6-hidroximelatonina para posteriormente ser conjugada con ácido sulfúrico o ácido glucurónico y finalmente excretada por la orina (véase Figura 11; Moroni y Garcia-Bennett, 2021).

El metabolito principal de la melatonina es la 6-sulfatoxi-melatonina, que es una molécula biológicamente inactiva y sus niveles en la orina muestran una relación directa con las concentraciones plasmáticas de melatonina por lo que es un biomarcador adecuado (Di *et al.*, 1997).

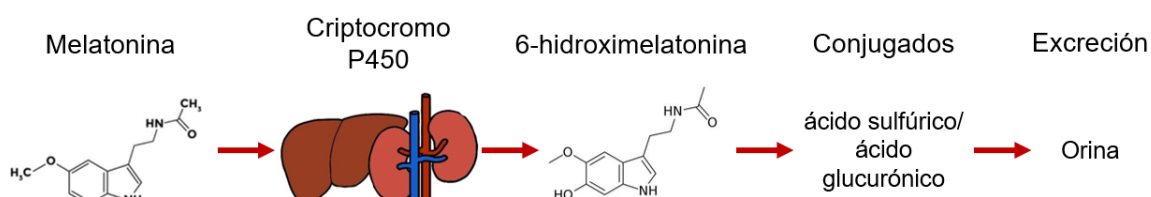


Figura 11. Metabolismo de la melatonina. La melatonina se metaboliza en el hígado y los riñones por la acción del criptocromo P450 formando 6-hidroximelatonina, esta molécula es conjugada con ácido sulfúrico o ácido glucurónico para posteriormente ser excretada por la orina.

Existe otra vía no enzimática por la cual la melatonina es catabolizada, la cual consiste en una cascada de reacciones consecutivas con radicales libres, siendo ésta una ruta catabólica menor (Moroni y Garcia-Bennett, 2021). Algunos de los metabolitos resultantes de esta vía son la 4-hidroximelatonina y la 3-hidroximelatonina cíclica (Hardeland, 2017).

Se sabe que la acción cronobiótica de la melatonina se da con dosis bajas y su efecto depende del horario en el que es administrada, ya que si se administra antes del inicio de la secreción endógena de melatonina en condiciones de poca luz se induce un avance de la fase de sueño con un efecto máximo cuando se toma cuatro horas antes. Por el contrario, si se administra después del inicio de su secreción endógena se induce un retraso de la fase de sueño con un efecto mayor de adelanto si se toma 11 horas después (Quera-Salva *et al.*, 2021).

Adicionalmente, la melatonina también posee un efecto soporífero el cual depende de la dosis administrada, por lo que se recomienda iniciar el tratamiento con dosis de 0.5 mg, que puede incrementarse hasta 5 mg, de 4 a 6 horas antes de dormir para un efecto cronobiótico, y una dosis de 1 a 5 mg media hora antes de acostarse para un efecto soporífero. Así mismo, es necesario señalar la importancia de asociar este tratamiento con terapia cognitivo-conductual e higiene del sueño para un tratamiento integral del paciente (Quera-Salva *et al.*, 2021).

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

3.1 La melatonina en el tratamiento de los trastornos del sueño.

Debido a sus efectos soporíferos y cronobióticos, la melatonina exógena ha sido considerada como una opción efectiva para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos del sueño, entre los cuales se destacan los trastornos del ritmo circadiano sueño-vigilia y el insomnio (Quera-Salva *et al.*, 2021).

Los pacientes con trastorno de la fase retrasada del sueño-vigilia muestran un ritmo de producción pineal de melatonina desfasado, por lo que se ha propuesto la administración de melatonina exógena como un tratamiento efectivo para reajustar su ciclo circadiano (Rodenbeck *et al.*, 1998). En un estudio clínico aleatorizado doble ciego en pacientes con este trastorno, se mostró que la administración de melatonina en dosis de 0.5 mg una hora antes del tiempo de inicio del sueño en combinación con una programación conductual del sueño-vigilia logró disminuir significativamente la latencia del inicio del sueño (Sletten *et al.*, 2018).

Asimismo, el uso de ramelteon, un agonista de alta afinidad para los receptores de melatonina MT1/MT2, es una posible alternativa para este tratamiento debido a que recientemente se ha reportado que la administración en dosis desde 4 hasta 8 mg tiene un efecto positivo, revirtiendo la sintomatología de los pacientes y además restaurando su ciclo circadiano (Izuhara *et al.*, 2021; Takeshima *et al.*, 2020).

El tratamiento del trastorno del ritmo sueño-vigilia distinto de las 24 horas también incluye el uso tanto de la melatonina exógena como de los agonistas de sus receptores, tanto en pacientes invidentes como en pacientes videntes (Malkani *et al.*, 2018).

Existe en la literatura científica el reporte de un caso de trastorno del ritmo sueño-vigilia distinto de las 24 horas asociado al aislamiento social en una mujer con trastorno del espectro autista, el cual mostró que la administración conjunta de ramelteon, un agonista de los receptores MT1 y MT2, con una dosis de 8 mg alrededor de las 23 horas en conjunto con la administración de suvorexant, que es

un antagonista de los receptores para orexinas a una dosis de 15 mg permitió restablecer su ritmo circadiano (Iwata y Kaneko, 2020).

Finalmente, es importante destacar el uso de la melatonina exógena en el tratamiento del insomnio. Se ha empleado la melatonina de liberación prolongada, ya que diversos estudios han mostrado que su administración en dosis de 2 mg durante 6 a 12 meses en adultos desde 18 hasta 80 años que padecen insomnio primario mejora la calidad subjetiva del sueño, sin presentar tolerancia al tratamiento ni efecto de rebote posterior a su interrupción (Lemoine *et al.*, 2011; Wade *et al.*, 2011).

En un estudio más reciente se evaluó el uso de melatonina de liberación rápida con una dosis de 3 mg una hora antes de acostarse durante cuatro semanas en paciente de entre 45 a 60 años disminuyó el tiempo de despertares tempranos y aumentó el tiempo total de sueño (Xu *et al.*, 2020).

Además, en estudios realizados en diferentes biomodelos se ha mostrado que el ramelteon, que es un agonista de los receptores de melatonina MT1 y MT2, reduce la latencia del inicio de sueño y aumenta la duración del tiempo total de sueño reduciendo del tiempo total de vigilia (Miyamoto *et al.*, 2004, Yukuhiro *et al.*, 2004). En base a estos estudios posteriormente se evaluó su uso en humanos como tratamiento para el insomnio primario, mostrando una disminución de forma eficaz de la latencia de inicio del sueño (Mini *et al.*, 2007, Zammit *et al.*, 2007).

3.2 La rata *taiep* como modelo de la narcolepsia.

En 1989, el Dr. Holmgren y sus colaboradores describieron una mutación autosómica recesiva espontánea en un grupo de ratas Sprague-Dawley que mostraban temblor, ataxia, episodios de inmovilidad tónica, epilepsia y parálisis de las extremidades posteriores, las cuales fueron denominadas *taiep* por el acrónimo de sus signos (Holmgren *et al.*, 1989).

Dicha mutación se presentó en la cuarta generación a partir de cruas endogámicas selectivas para la obtención de la sublínea con una alta frecuencia de bostezo espontáneo (Holmgren *et al.*, 1989). A los 30-40 días postnatales se presenta un

temblor fino de la cola y de las extremidades posteriores, a los 2 a 3 meses de edad comienza la ataxia locomotora, entre los 5 y 6 meses se manifiestan los episodios de inmovilidad tónica, ya sean espontáneos, con un pico de frecuencia entre los 8 a los 9 meses de edad, o inducidos mediante sujeción de la cola o del tórax, la epilepsia inicia entre los 2 y 6 meses de edad incrementando con la edad hasta un pico máximo a los 9 meses y finalmente, la parálisis de las patas traseras se desarrolla progresivamente a partir de los 7 meses de edad (Holmgren *et al.*, 1989).

Las ratas *taiep* se caracterizan por presentar una hipomielinización central inicial que posteriormente da paso a una desmielinización progresiva a partir de los 2 meses de edad; sin verse afectada la mielina periférica, debido a que los oligodendrocitos muestran una acumulación de microtúbulos unidos a la membrana del retículo endoplásmico en el citoplasma (Duncan *et al.*, 1992).

Adicionalmente, la dineína y la kinesina, proteínas motoras de transporte asociadas a los microtúbulos, presentan una actividad alterada, lo que también dificulta el tránsito intracelular de las proteínas recién sintetizadas y del ácido ribonucleico mensajero para la formación de la mielina (Song *et al.*, 2003).

A través de estudios de imagen de resonancia magnética y de microscopía en ratas *taiep* macho se describió que las principales áreas cerebrales afectadas por la desmielinización progresiva son el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido, el cuerpo calloso, el hipocampo y el cerebelo (Garduno-Robles *et al.*, 2020; Alata *et al.*, 2022). Este patrón muestra similitudes con lo reportado en humanos con tubulinopatías, principalmente con aquellos que padecen de hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y el cerebelo, o H-ABC por sus siglas en inglés (Alata *et al.*, 2022; Curiel *et al.*, 2017).

Asimismo, se han asociado las mutaciones en la región subtelomérica del cromosoma 9 como el origen de las características de la rata *taiep*, donde se han identificado más de 30 mutaciones en el gen *Tubb4a* que se relacionan con anomalías en los oligodendrocitos y la hipomielinización (Alata *et al.*, 2022).

En humanos, las mutaciones en los genes para la tubulina TUBB4A son la causa del desarrollo de la hipomielinización de los ganglios basales y del cerebelo, por lo que la rata *taiep* se ha propuesto como un modelo para las tubulinopatías, específicamente para la H-ABC (Garduno-Robles *et al.*, 2020; Alata *et al.*, 2022).

La rata *taiep* presenta episodios de inmovilidad que son descritos como la pérdida repentina de los reflejos antigravitatorios con contractura de la musculatura facial y de las orejas aplanadas detrás del cráneo lo que produce una facies característica, pudiendo o no presentarse la cola de Straub (Cortés *et al.*, 2005). Su duración promedio es de 53.1 ± 1.9 segundos, sin embargo, pueden durar desde 4 segundos hasta unos pocos minutos, con una recuperación espontánea inmediata (Cortés *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, los episodios de inmovilidad comienzan a presentarse entre los 5 y los 6 meses de edad, sin embargo, su máxima susceptibilidad se da entre los 8 a los 10 meses, siendo los machos más susceptibles que las hembras (Cortés *et al.*, 2005). Durante el periodo de luz, los episodios de inmovilidad espontáneos son más frecuentes durante las fases de vigilia y de SOL, mientras que durante del periodo de oscuridad, se presentan con mayor frecuencia durante el sueño MOR (Cortés. *et al.*, 2011). La actividad electroencefalográfica durante estos episodios muestra una desincronización cortical y un ritmo theta en el hipocampo similar a la presentada durante los episodios de narcolepsia-cataplejía en los humanos, por lo cual, en 1991, Prieto y sus colaboradores propusieron a la rata *taiep* como un modelo de narcolepsia-cataplejía (Prieto *et al.*, 1991), un trastorno del sueño causado por la pérdida de las neuronas orexinérgicas (Lin *et al.*, 1999) caracterizado por la tétrada clásica que incluye somnolencia diurna excesiva, alucinaciones hipnopómpicas, parálisis del sueño y cataplejía, que es la pérdida del tono muscular (Thannickal *et al.*, 2000).

El ciclo sueño-vigilia de la rata *taiep* presenta diversas alteraciones al compararla con la cepa original Sprague-Dawley, entre las cuales podemos mencionar una disminución de la duración total de SOL y un sueño MOR fragmentado (Prieto *et al.*, 1991); además de presentarse una disminución en la frecuencia de los episodios de

vigilia, de SOL y de sueño MOR con una diferencia significativa considerando el tiempo total de 24 h y el periodo de luz, pero no así en el periodo de oscuridad (Cortés. *et al.*, 2011). Asimismo, los episodios de vigilia, de SOL y de sueño MOR de la rata *taiep* muestran un aumento en la duración media al compararlos con la rata Sprague-Dawley. Sin embargo, los episodios de vigilia y de SOL presentan una diferencia significativa en el tiempo total de 24 h, en el periodo de luz y en el periodo de oscuridad, mientras que en los episodios de sueño MOR solo se presenta una diferencia significativa en el tiempo total de 24 h y en el periodo de luz, pero no en el periodo de oscuridad (Cortés. *et al.*, 2011).

El ciclo sueño-vigilia desorganizado y los episodios de inmovilidad de la rata *taiep* no se asocian con alteración en el sistema orexinérgico, ya que no se presentan diferencias significativas en el número de neuronas de orexina, así como en su morfología y su distribución cerebral entre ratas *taiep* y ratas Sprague-Dawley, a los 3, 6, 9 y 12 meses de edad (Espinoza Pérez, 2019). Sin embargo, aún no se han realizado análisis similares en todos los sistemas que participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Como se mencionó anteriormente, la melatonina es una neurohormona que participa en la regulación circadiana del ciclo sueño-vigilia, no obstante, se desconoce si la rata *taiep* presenta alteraciones en el eje de producción de melatonina y sus niveles plasmáticos, así como cambios en la expresión o funcionalidad de sus receptores MT1 y MT2.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La narcolepsia tipo 1 es un trastorno del sueño de hipersomnolencia incapacitante caracterizado por la presencia de somnolencia diurna excesiva, episodios de cataplejía, alucinaciones hipnopómpicas y parálisis del sueño causado por la pérdida irreversible de neuronas orexinérgicas en el hipotálamo lateral, por lo tanto, su tratamiento se enfoca en disminuir la sintomatología mediante fármacos psicoestimulantes, como son el oxibato de sodio y los antidepresivos tricíclicos (Barateau *et al.*, 2019).

En el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor del Instituto de Fisiología se cuenta con la rata *taiep*, una mutante de tubulina que se ha propuesto como un modelo de narcolepsia tipo 1 debido a que durante los episodios de inmovilidad la actividad electroencefalográfica se asemeja a lo descrito tanto en la narcolepsia canina, así como en la humana, además de presentar un patrón del ciclo sueño-vigilia desorganizado (Cortés. *et al.*, 2011).

La melatonina es una neurohormona cuya producción central se da en la glándula pineal, la cual depende de los estímulos del ciclo luz-obscuridad medioambientales, por lo que una de sus principales funciones es la regulación de los ciclos circadianos, entre ellos, el ciclo sueño-vigilia (Amaral y Cipolla-Neto, 2018).

Actualmente, la melatonina exógena es utilizada para el tratamiento de múltiples trastornos del sueño debido a que no desarrolla tolerancia o síntomas de rebote (Wade *et al.*, 2011). Sin embargo, su uso como cronobiótico en trastornos de hipersomnía aún permanece inexplorado, por ello nos proponemos evaluar los efectos de la melatonina exógena sobre el ciclo sueño-vigilia y los episodios de inmovilidad en la rata *taiep* macho adulta.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto cronobiótico de la melatonina exógena en el ciclo sueño-vigilia de la rata *taiep* macho adulta.

5.2 Objetivos particulares.

- Analizar el efecto de la melatonina exógena sobre los episodios de inmovilidad de la rata *taiep*.
- Determinar las modificaciones de la frecuencia, duración y latencia en las fases del sueño de la rata *taiep* producidas por la administración exógena de melatonina.
- Comparar las etapas del ciclo sueño-vigilia con el ciclo de luz/obscuridad ante la administración intraperitoneal de melatonina exógena a diferentes dosis.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Diseño del estudio.

Estudio experimental, de corte transversal.

6.2 Ubicación espaciotemporal.

Todos los procedimientos descritos en este protocolo fueron realizados en el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor del Instituto de Fisiología, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, durante el periodo de tiempo que comprende los meses entre junio 2023 y noviembre 2024.

6.3 Estrategia de trabajo.

Se utilizaron 6 ratas *taiep* macho, las cuales debían tener 6 meses de edad en el momento en que se realizaron los registros electroencefalográficos.

Las ratas fueron colocadas en cajas de acrílico transparente de 6 mm de grosor, con medidas de 30 cm de ancho, 45 cm de largo y 20 cm de alto, que contenían viruta de madera tipo chip estéril en el piso, siendo distribuidas en grupos de 2 ratas por caja hasta el día de la cirugía, posteriormente se colocaron en cajas individuales de acrílico transparente de 6 mm de grosor con medidas de 24 cm de ancho, 34 cm de largo y 15 cm de alto. Se mantuvieron con acceso libre a agua potable Ciel® (Coca Cola Co., México) y alimento balanceado para roedores (Purina Mills, 5018, Estados Unidos de América).

Las ratas fueron alojadas en un cuarto con un ciclo de luz/oscuridad 12:12 con el encendido de luces a las 0700 h y manteniendo una temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ y humedad relativa entre 30 y 45%.

Se les realizaron cirugías estereotáxicas para el implante de electrodos para registro electroencefalográfico a los 165 días postnatales. Después de los cuidados postoperatorios y de 3 días de habituación a las condiciones de registro, a cada sujeto se le realizaron 4 registros de 24 h, dejando un lapso de 72 h entre ellos. En el primer registro se administró por vía intraperitoneal (i.p.) etanol al 10% como

vehículo, mientras que del segundo al cuarto registro se administraron dosis crecientes de melatonina 5, 10 y 20 mg/Kg por vía i.p. al inicio del periodo de oscuridad (1900 h).

6.4 Muestreo.

6.4.1 Definición de la unidad de población.

Se utilizaron ratas *taiep* macho de 180 días postnatales.

6.4.2 Selección de la muestra.

Los sujetos fueron seleccionados de acuerdo con las características del fenotipo *taiep*.

6.4.3 Diseño y tipo de muestreo.

Estudio experimental transversal no probabilístico.

6.4.4 Tamaño de la muestra.

Se utilizaron 6 ratas *taiep* macho (n=6).

6.5 Definición de las variables y escalas de medición.

Dosis de melatonina: Es la cantidad de melatonina administrada a la rata por vía intraperitoneal, cuantificada en mg/Kg.

Periodo de luz: Es el tiempo que la rata estará expuesta a un ambiente con luz, el cual tendrá una duración de 12 horas, iniciando a las 0700 h y terminando a las 1900 h. Cuantificado en horas.

Periodo de oscuridad: Es el tiempo que la rata estará expuesta a un ambiente con ausencia de estímulos luminosos, con una duración de 12 horas, iniciando a las 1900 h y terminando a las 0700 h, Cuantificado en horas.

Duración media: Es el tiempo promedio que dura una etapa, ya sea de vigilia, sueño de ondas lentas, sueño con movimientos oculares rápido o episodio de inmovilidad, cuantificado en minutos.

Frecuencia: Es el número de episodios de vigilia, sueño de ondas lentas, sueño con movimientos oculares rápidos o episodios de inmovilidad que ocurren en determinado periodo.

Latencia del sueño con movimientos oculares rápidos: Es el tiempo transcurrido desde el inicio del registro hasta el inicio del primer episodio de sueño con movimientos oculares rápidos, cuantificado en minutos.

6.6 Métodos de recolección de datos.

Las señales de los registros electroencefalográficos fueron amplificadas y filtradas mediante el programa GRAEL LT System (Compumedics, Reino Unido).

6.7 Técnicas y procedimientos.

6.7.1 Cirugía estereotáxica.

A las ratas se les realizó una cirugía estereotáxica para el implante de los electrodos para registro electroencefalográfico. Para la anestesia se utilizó oxígeno a un volumen de 1 L/min e isoflurano para uso veterinario Fluriso® (VetOne, México) con una concentración del 5% para la inducción y posteriormente se mantuvo con una concentración de 2-3%, confirmando la anestesia profunda mediante la nula respuesta del reflejo de la cola.

Se tricotomizó la parte dorsal de la cabeza de la rata con una rasuradora (Oster, Estados Unidos de América), y se le administró por vía subcutánea el analgésico no esterooidal meloxicam (Flaxol MX, México) a una dosis de 1 mg/Kg para la analgesia y lidocaína tópica (Pharmalife, México) en solución al 10% en los oídos antes de ser montada en el equipo estereotáxico tipo Kopf (Modelo 900LS, Stoelting Co., Estados Unidos de América).

Posteriormente se procedió a la desinfección de la zona con yodopovidona al 10% (Isodine, México), después se realizó una incisión a lo largo de la cabeza con escalpelo No. 4 y una hoja de bisturí No. 20, se retiró el periostio empleando una legra dejando despejado los huesos del cráneo. Mediante el uso de un taladro de mano (Modelo 8782, Santul, México) se realizaron tres trépanos en las zonas

frontal, parietal y occipital para el anclaje de un electrodo de tornillo de acero inoxidable en cada uno.

Asimismo, se realizó un cuarto trepano para la colocación de un electrodo bipolar trenzado de profundidad en el hipocampo derecho en la zona CA1 de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson (2007), siendo estos -4 mm anteroposterior, -2.5 mediolateral y -2.5 mm dorsoventral, tomando como referencia la sutura de bregma, para registrar la actividad electroencefalográfica del hipocampo.

Adicionalmente, se colocaron dos electrodos de nicromio en los músculos de la nuca para el registro electromiográfico; y uno en la zona posterolateral de la órbita ocular izquierda para el registro electrooculográfico. Todos los electrodos, a excepción del electrodo de hipocampo, se unieron mediante un conector de 6 polos. El anclaje de los electrodos al cráneo se realizó empleando acrílico dental (Nic Tone, México).

6.7.2 Cuidados postoperatorios.

Inmediatamente después de que concluyó la cirugía se les administró por vía subcutánea 5 mL de solución salina al 0.9% y 5 mL de solución glucosada al 5% para su rehidratación. Se desmontaron del aparato estereotáxico y se colocaron en cajas individuales de acrílico transparentes sobre una almohadilla de calor eléctrica hasta que se recuperaron completamente de la anestesia. Una vez que la rata se pudo incorporar sobre sus cuatro patas se les dio acceso libre al alimento y al agua manteniendo las condiciones de alojamiento mencionadas previamente.

El tiempo de recuperación fue de cinco días, administrándoles por vía subcutánea el analgésico meloxicam (Flaxol MX, México) a una dosis de 1 mg/Kg y el antibiótico enrofloxacin (Enroxil, México) a una dosis de 32 mg/Kg durante los primeros tres días. Terminado este periodo se realizaron tres sesiones de habituación cada una con una duración de tres horas simulando las condiciones del registro electroencefalográfico, conectando a la rata a un sistema rotatorio tipo "swivel" para permitir su libre movimiento.

6.7.3 Registro electroencefalográfico.

A cada rata se le realizaron cuatro registros electroencefalográficos con una duración de 24 h cada uno, iniciando a las 1900 h y dejando un periodo de 72 h entre ellos. Para el registro control se administró etanol al 10% por vía intraperitoneal en una dosis de 1 mg/Kg. Los siguientes registros correspondieron a la administración de melatonina (Sigma-Aldrich, México) por vía intraperitoneal a las dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg, la cual fue disuelta en 10% del volumen final de etanol absoluto y posteriormente se le agregó el 90% restante de solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.9%. Tanto el vehículo como las diferentes dosis de melatonina se administraron justo antes de iniciar el registro.

Las señales fueron amplificadas y filtradas mediante el programa GRAEL LT System (Compumedics, Reino Unido) las cuales comprenden el electroencefalograma, el electromiograma y el electrooculograma. También se realizó la grabación en video de la actividad conductual.

El posterior análisis de los registros se realizó mediante el programa Profusion Sleep (Compumedics, Reino Unido), dividiéndolos en épocas de 10 segundos y señalando cuatro diferentes etapas: vigilia, sueño de ondas lentas, sueño con movimientos oculares rápidos y los episodios de inmovilidad.

6.8 Análisis de datos.

Se procedió a cuantificar la frecuencia de episodios y la duración media de las etapas de vigilia, SOL, sueño MOR y episodios de inmovilidad de los diferentes grupos experimentales, considerando el tiempo total (24 h) y los periodos de luz/oscuridad (12 h/12 h). Adicionalmente, se cuantificó la latencia para el primer episodio de sueño MOR a partir del inicio del registro (1900).

6.9 Diseño estadístico.

6.9.1 Hipótesis.

H1: La melatonina exógena aumenta la duración total del sueño de ondas lentas y disminuye la fragmentación del sueño con movimientos oculares rápidos.

6.9.2 Pruebas estadísticas.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa SigmaPlot versión 14.0 (Systat Software Inc, Estados Unidos de América) mediante un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas y una prueba *post-hoc* de Dunnet. Se consideró como diferencia significativa cuando la probabilidad fue ≤ 0.05 .

7. LOGÍSTICA

7.1 Recursos humanos

Alumno tesista: Alejandro Nicolás Luna Pérez.

Responsable del trabajo: Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez (directora).

Corresponsable del trabajo: Dr. José Ramón Eguibar Cuenca (co-director).

7.2 Recursos materiales

7.2.1 Alojamiento

Cajas de acrílico transparente de 6 mm de grosor con medidas de 30 cm de ancho, 45 cm de largo y 20 cm de alto, cajas individuales de acrílico transparente de 6 mm de grosor con medidas de 24 cm de ancho, 34 cm de largo y 15 cm de alto, viruta de madera tipo chip estéril, agua potable Ciel® (Coca Cola Co., México), alimento balanceado para roedores (Purina Mills, 5018, Estados Unidos de América).

7.2.2 Cirugía estereotáxica

Isoflurano para uso veterinario Fluriso® (VetOne, México), rasuradora (Oster, Estados Unidos de América), meloxicam (Flaxol MX, México), lidocaína tópica (Pharmalife, México), equipo estereotáxico tipo Kopf (Modelo 900LS, Stoelting Co., Estados Unidos de América), yodopovidona al 10% (Isodine, México), escalpelo No. 4, hoja de bisturí No. 20, legra, taladro de mano (Modelo 8782, Santul®, México), electrodos de tornillo de acero inoxidable, electrodo bipolar trenzado de profundidad de acero inoxidable, electrodos de nicromio, acrílico dental (Nic Tone, México), solución salina al 0.9%, solución glucosada al 5%, almohadilla de calor eléctrica, enrofloxacin (Enroxil, México).

7.2.3 Registros electroencefalográficos

Sistema rotatorio tipo "swivel", etanol absoluto, melatonina (Sigma-Aldrich™, México), programa GRAEL LT System (Compumedics, Reino Unido), programa Profusion Sleep (Compumedics, Reino Unido).

7.2.4 Análisis estadístico

Programa Sigma Plot versión 14.0 (Systat Software Inc, Estados Unidos de América).

7.3 Recursos financieros

Financiado por la VIEP-BUAP 2023-2024 al cuerpo académico en Neuroendocrinología (BUAP-CA-288), por los proyectos de investigación con número COSM-SAL-17-I de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a favor de la Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez y los proyectos CONACyT de Ciencia Básica con números 243,247 y 243,333 a favor del Dr. José Ramón Eguibar Cuenca y la Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez, respectivamente y por los Programas Nacionales Estratégicos del CONACyT (PRONACES-CONACyT) con número 194171.

7.4 Cronograma de actividades

7.4.1 Gráfica de Gantt

Actividades	2023							2024	
	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb
Habitación preoperatoria	■		■		■		■		
Cirugía estereotáxica		■		■		■		■	
Cuidados postoperatorios		■		■		■		■	
Habitación		■		■		■		■	
Registros EEG		■		■		■		■	
Calificar registros EEG			■	■		■		■	
Análisis estadístico									■

8. BIOÉTICA

Todos los procedimientos descritos en este trabajo fueron realizados de acuerdo con las pautas establecidas en la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062-200-1999) para el cuidado y uso de animales de laboratorio, y además siguiendo los lineamientos de la guía de cuidado y uso de animales del laboratorio del Instituto nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH, por sus siglas en inglés). El protocolo fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (No. 000255).

9. RESULTADOS.

9.1 Frecuencia de los episodios de vigilia.

Durante el periodo de oscuridad no se presentaron diferencias significativas en la frecuencia de los episodios de vigilia con la administración de las diferentes dosis de melatonina probadas respecto al grupo control (véase Figura 12A).

La administración de las tres dosis de melatonina durante el periodo de luz no modificó significativamente la frecuencia de los episodios de vigilia (véase Figura 12B).

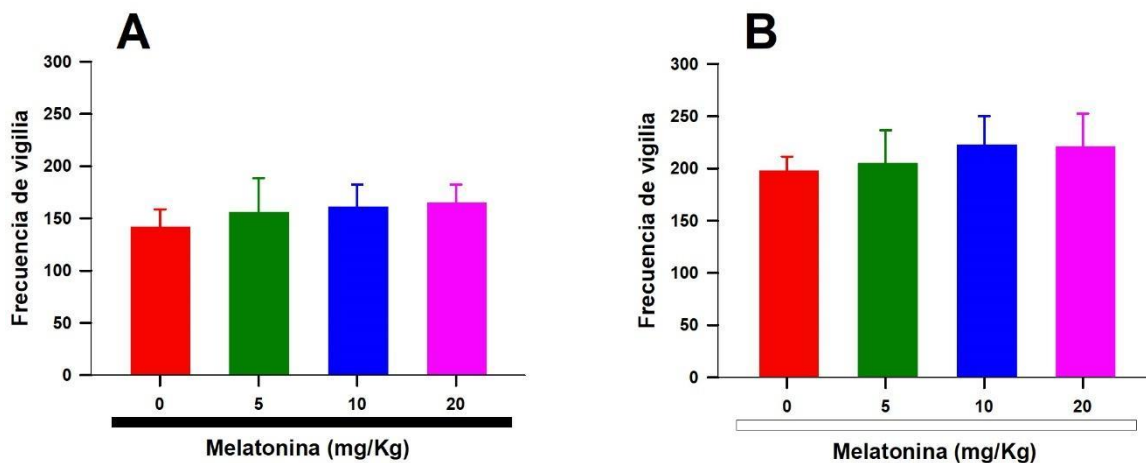


Figura 12. Frecuencia de los episodios de vigilia dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) Durante el periodo de oscuridad no se obtuvo un cambio significativo en la frecuencia de los episodios de vigilia con las diferentes dosis de melatonina respecto al grupo control ($P0.05$). **B)** La frecuencia de los episodios de vigilia no se modificó significativamente con la administración de melatonina en diferentes dosis respecto al grupo control durante el periodo de luz ($P0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz.

Al analizar la distribución de la frecuencia de los episodios de vigilia a lo largo de las 24h de registro obtuvimos un incremento significativo durante el periodo que comprende entre las 0900 h y las 1100 h con la dosis de 10 mg/Kg respecto del grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 3.86$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 2.93$, $P < 0.05$; véase Figura 13).

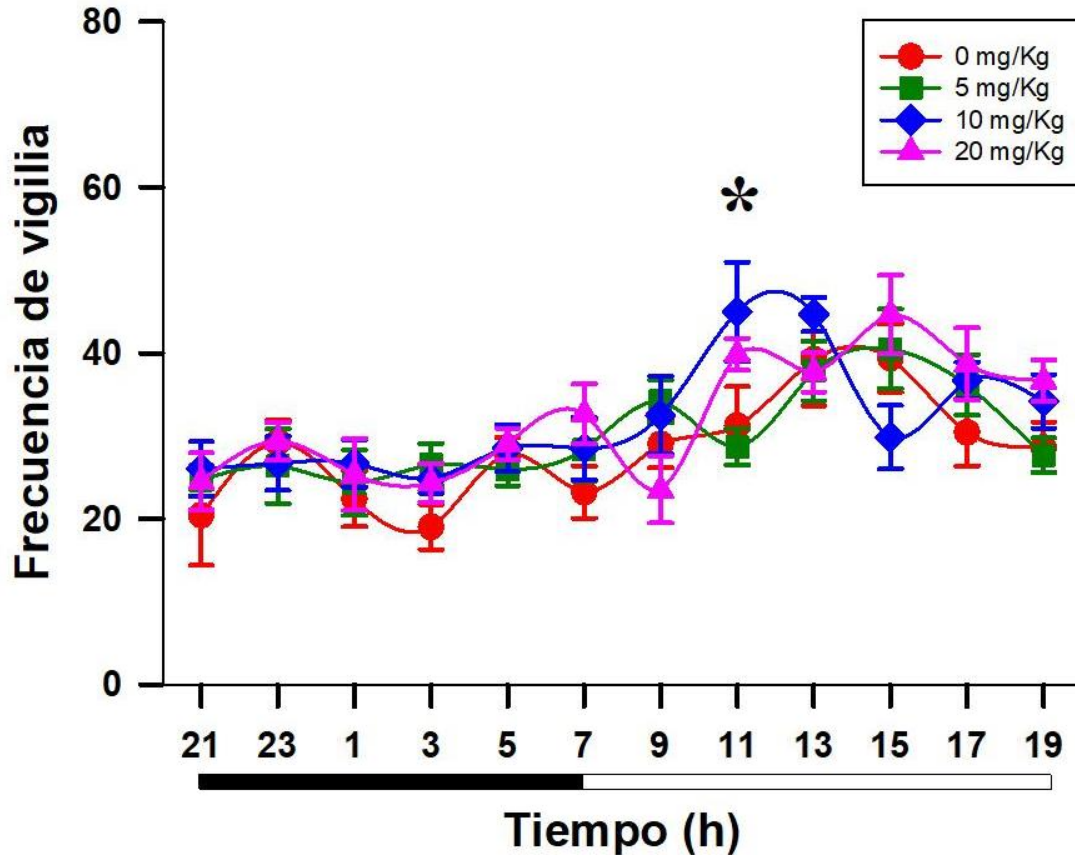


Figura 13. Distribución de la frecuencia de los episodios de vigilia en el ciclo circadiano. Se observa un incremento en la frecuencia de los episodios de vigilia con la dosis de 10 mg/Kg respecto al grupo control entre las 0900 h y las 1100 h (* $P < 0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz.

9.2 Frecuencia de los episodios de sueño de ondas lentas.

Durante el periodo de oscuridad, no se obtuvieron cambios significativos en la frecuencia de los episodios de sueño de ondas lentas con la administración de las tres diferentes dosis de melatonina respecto al grupo control (véase Figura 14A).

Del mismo modo, al analizar la frecuencia durante el periodo de luz no se obtuvo una diferencia significativa con las diferentes dosis de melatonina respecto al control (véase Figura 14B).

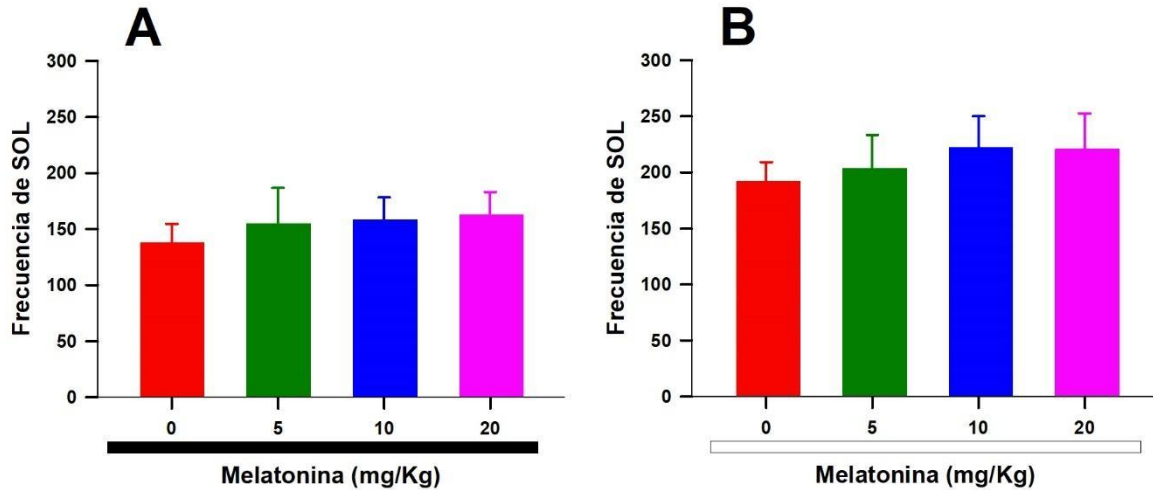


Figura 14. Frecuencia de los episodios de sueño de ondas lentas dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) Durante el periodo de oscuridad no se obtuvo una diferencia significativa en la frecuencia con las diferentes dosis de melatonina respecto al grupo control ($P < 0.05$). **B)** Durante el periodo de luz la frecuencia de los episodios de sueño de ondas lentas no se modificó con la administración de las tres dosis de melatonina respecto al grupo control ($P < 0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. SOL = sueño de ondas lentas.

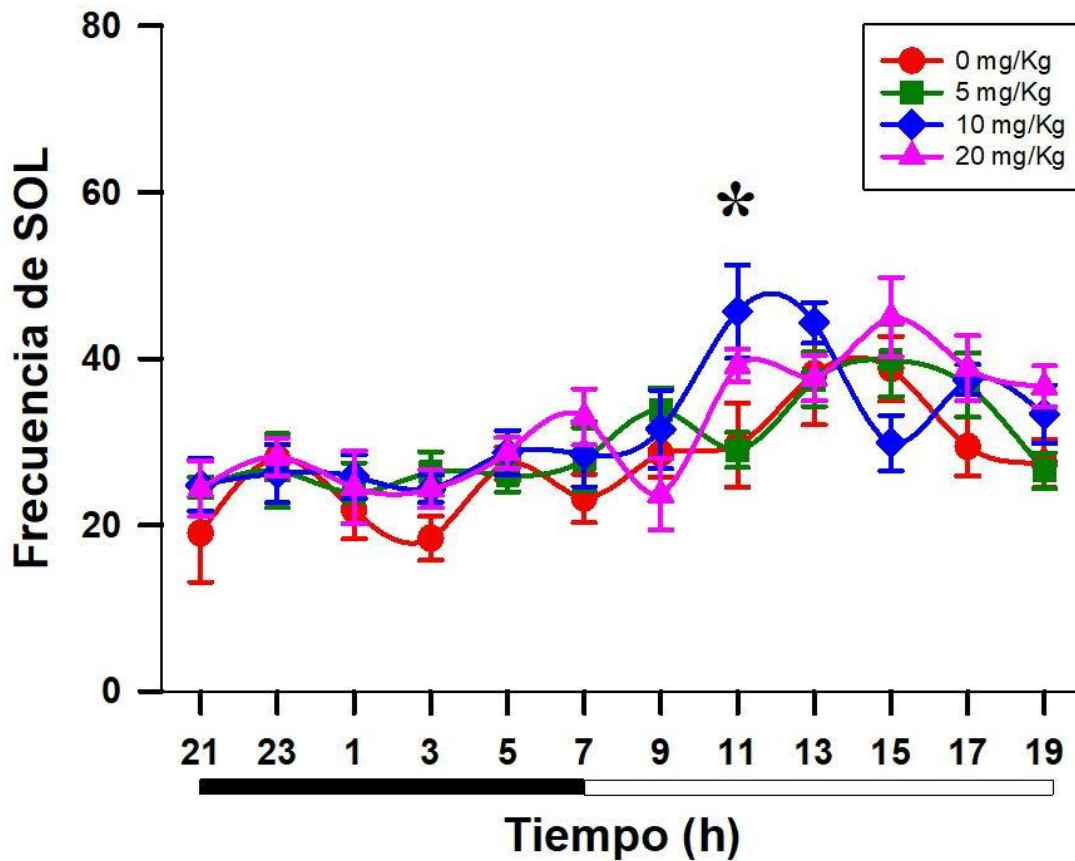


Figura 15. Distribución de la frecuencia de los episodios de sueño de ondas lentas a lo largo de 24 h. Se presentó un aumento significativo en la frecuencia de los episodios con la dosis de 10 mg/Kg respecto al grupo control entre las 0900 h y las 1100 h ($*P < 0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. SOL = sueño de ondas lentas.

En la distribución de la frecuencia de los episodios de SOL a lo largo de las 24h de registro se obtuvo un incremento estadísticamente significativo con la dosis de 10 mg/Kg respecto al grupo control en el lapso de las 0900 h hasta las 1100 h (ANOVA de medidas repetidas $F = 6.11$, $gl = 5, 22$, $P < 0.01$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 3.31$, $P < 0.05$; véase Figura 15).

9.3 Frecuencia de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos.

La frecuencia de los episodios de sueño MOR no se modificó con la administración de melatonina en diferentes dosis respecto al grupo control, tanto durante el periodo de oscuridad (véase Figura 16A), como durante el periodo de luz (véase Figura 16B).

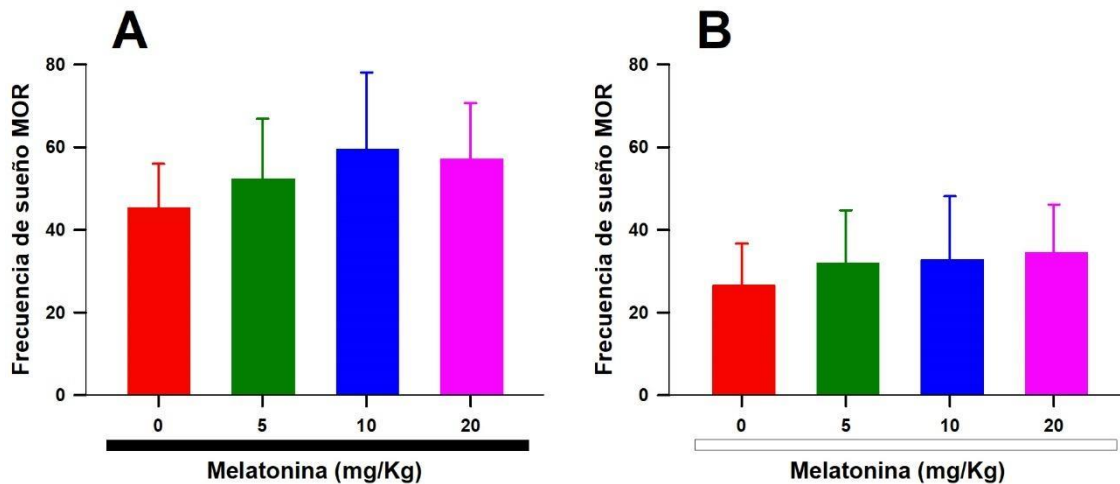


Figura 16. Frecuencia de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) No se observaron cambios estadísticamente significativos durante el periodo de oscuridad ($P > 0.05$). **B)** Durante el periodo de luz no se presentaron cambios estadísticamente significativos con la administración de melatonina ($P > 0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. MOR = movimientos oculares rápidos.

Asimismo, al analizar la distribución de la frecuencia de los episodios de sueño MOR a lo largo de las 24 h de registro en lapsos de 120 minutos podemos observar que no se presentaron diferencias significativas con ninguna de las tres dosis de melatonina exógena administradas al compararlas con el grupo control (véase Figura 17).

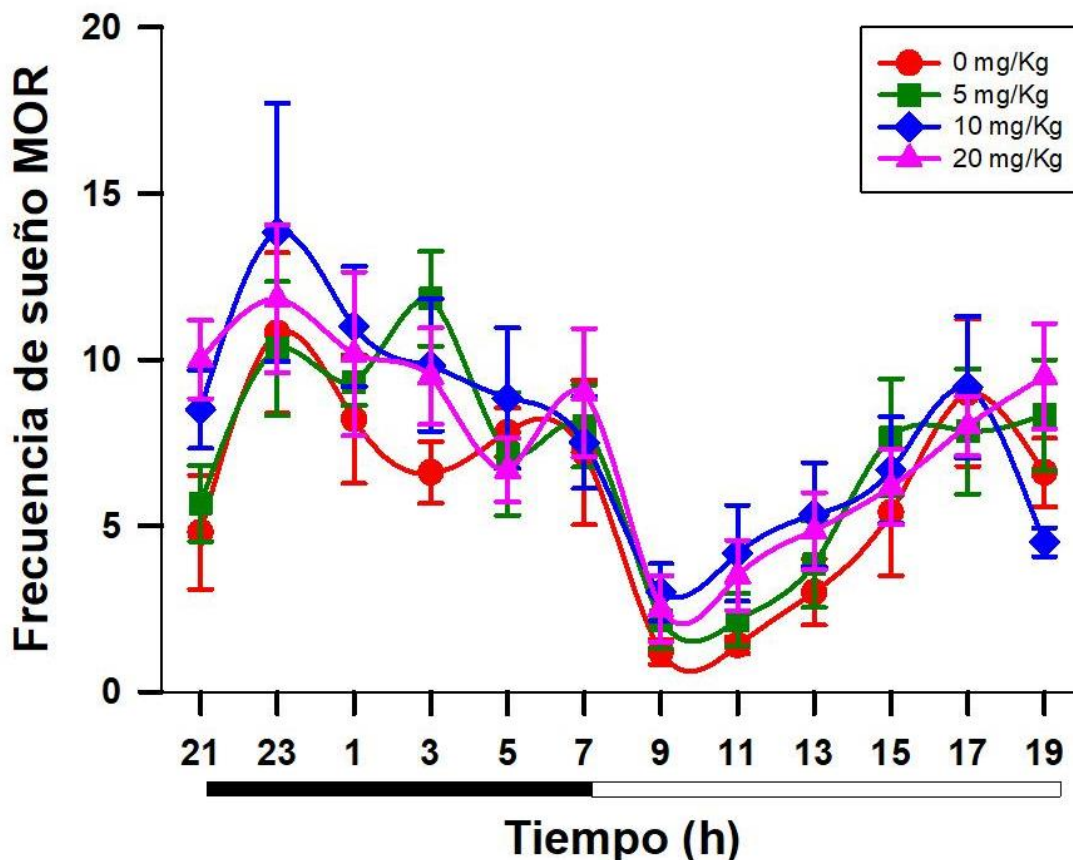


Figura 17. Distribución de la frecuencia de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos a lo largo de 24 h. No se observaron cambios significativos en la frecuencia de los episodios entre los grupos ($P > 0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. MOR = movimientos oculares rápidos.

9.4 Duración total de los episodios de vigilia.

La duración total de los episodios de vigilia durante el periodo de oscuridad no se modificó con la administración de las diferentes dosis de melatonina tanto durante el periodo de oscuridad (véase Figura 18A), como durante el periodo de luz (véase Figura 18B).

Al analizar la distribución de la duración total de vigilia a lo largo de las 24 h dividiendo el tiempo en intervalos de 120 min se obtuvo una diferencia significativa en el periodo de las 0300 h a las 0500 h entre el grupo control y la dosis de 5mg/Kg (ANOVA de medidas repetidas $F = 3.96$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 3.23$, $P < 0.05$; véase Figura 19).

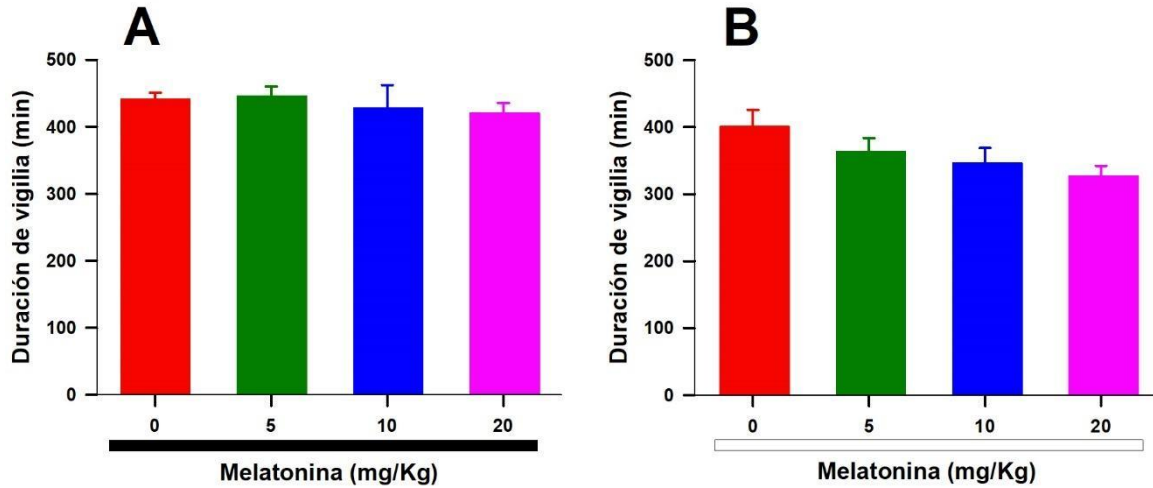


Figura 18. Duración total de los episodios de vigilia dependiendo de los periodos luz/oscuridad. **A)** La melatonina no modificó la duración total de los episodios de vigilia durante el periodo de oscuridad ($P0.05$). **B)** No se obtuvieron cambios estadísticamente significativos con la administración de las diferentes dosis de melatonina en el periodo de luz, ($P0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz

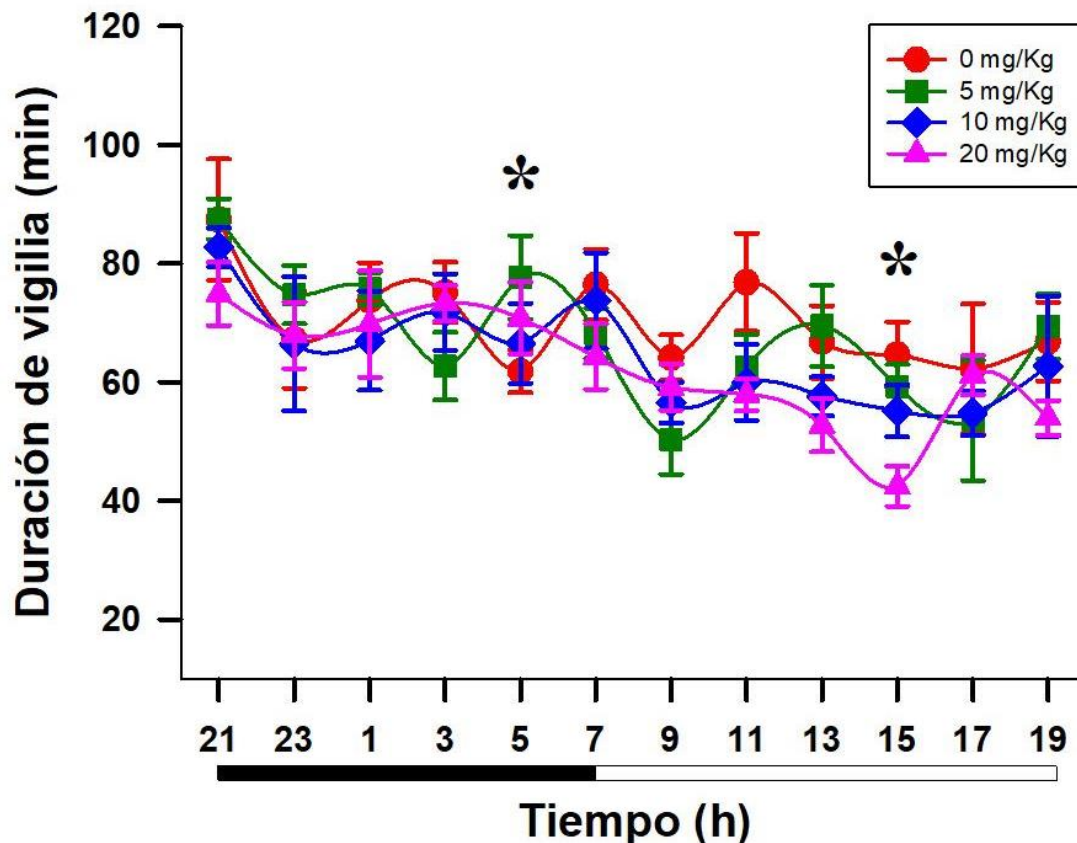


Figura 19. Distribución de la duración total de los episodios de vigilia en el ciclo circadiano. Se observa un aumento significativo en la duración total de los episodios de vigilia entre las 0300 h y las 0500 h con la dosis de 5 mg/Kg respecto al grupo control ($*P0.05$), además de una disminución significativa entre las 1300 h y las 1500h con la dosis de 20 mg/Kg en comparación con el grupo control ($*P0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz.

Adicionalmente, se obtuvo una disminución significativa de la duración total de los episodios de vigilia entre las 1300 h a las 1500 h con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 4.38$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 3.21$, $P < 0.05$; véase Figura 19).

9.5 Duración total de los episodios de sueño de ondas lentas.

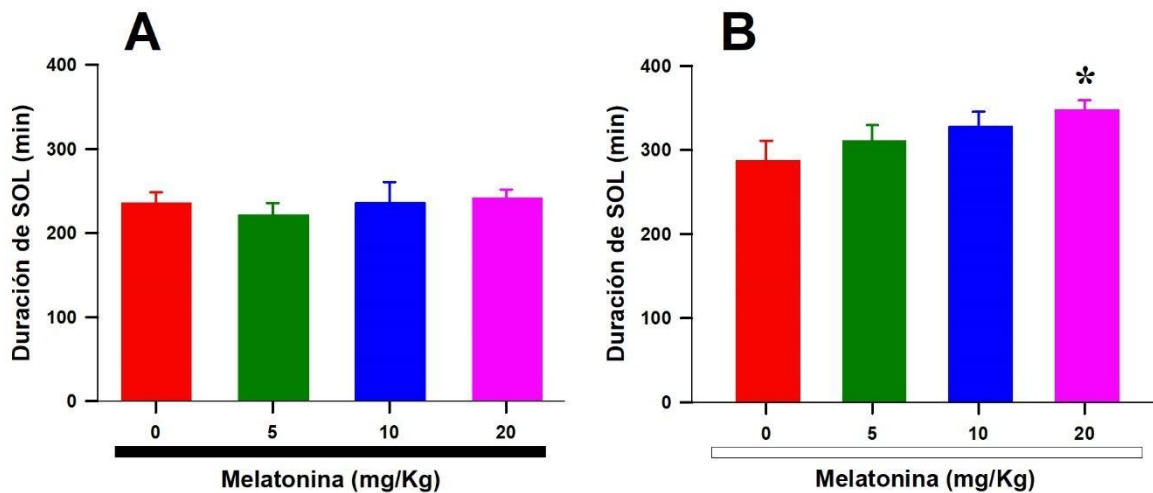


Figura 20. Duración total de los episodios de sueño de ondas lentas dependiendo de los periodos luz/oscuridad. **A)** La melatonina no modificó la duración total de los episodios de SOL durante el periodo de oscuridad ($P0.05$). **B)** Durante el periodo de luz la neurohormona produce un incremento en la duración total de los episodios de SOL, siendo significativo con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control ($*P0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. SOL = sueño de ondas lentas.

Durante el periodo de oscuridad no se obtuvieron modificaciones en la duración total de los episodios de SOL con las diferentes dosis de melatonina (véase Figura 20A). Mientras que, durante el periodo de luz se obtuvo un aumento en la duración total de dichos episodios, la cual es dependiente de la dosis de melatonina con una diferencia significativa entre el grupo con dosis de 20 mg/Kg y el grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 3.43$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 2.87$, $P < 0.05$; véase Figura 20B).

En la distribución del tiempo total de SOL a lo largo de las 24 h se obtuvo, en el periodo de las 1300 h a las 1500 h, un aumento significativo con la dosis de 20

mg/Kg respecto al grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 5.11$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 3.31$, $P < 0.05$; véase Figura 21).

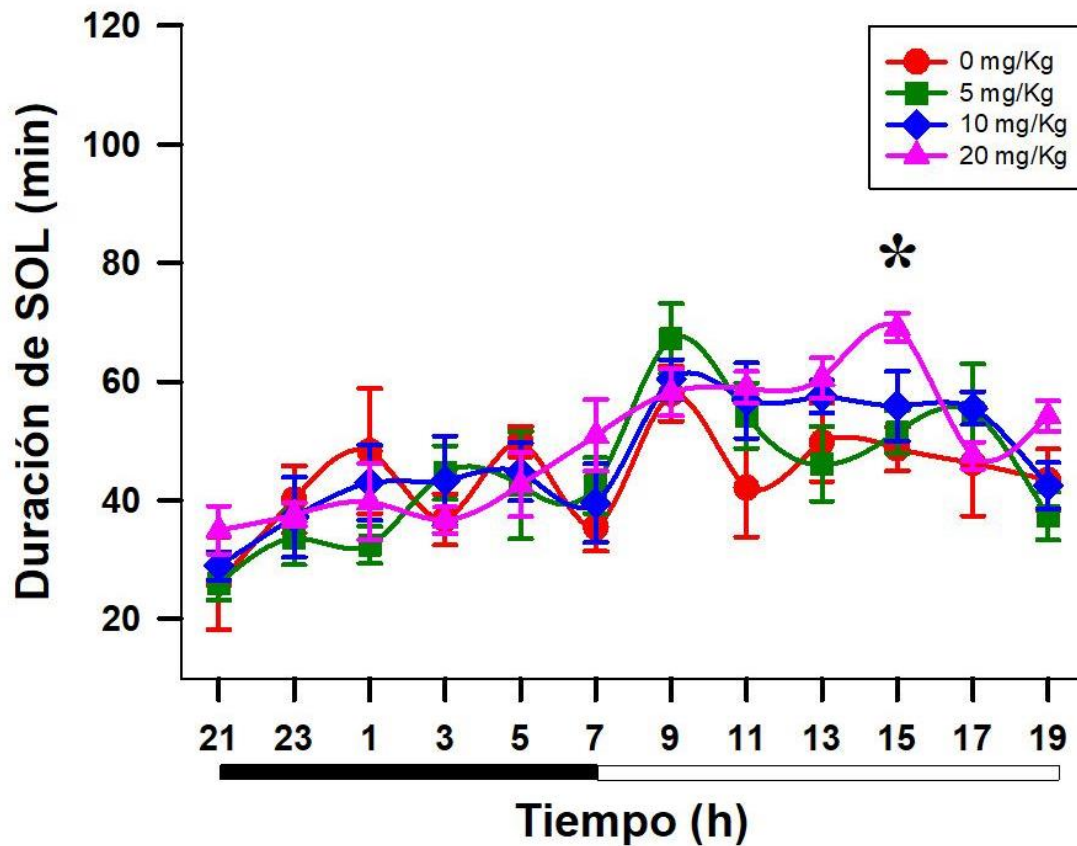


Figura 21. Distribución de la duración total de los episodios de sueño de ondas lentas en el ciclo circadiano. Se observa un aumento significativo en la duración total de los episodios de SOL entre las 1300 h y las 1500 h con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control (* $P < 0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. SOL = sueño de ondas lentas.

9.6 Duración total de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos.

En la duración total de los episodios de sueño MOR no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos durante el periodo de oscuridad (véase Figura 22A), así como durante el periodo de luz (véase Figura 22B).

De igual forma, al analizar la distribución de la duración total de los episodios de sueño MOR a lo largo del periodo de 24 h dividiéndolo en intervalos de 120 minutos obtuvimos que todos los grupos presentan un patrón muy similar, sin obtenerse cambios significativos tras la administración de las diferentes dosis de melatonina respecto del grupo control (véase figura 23).

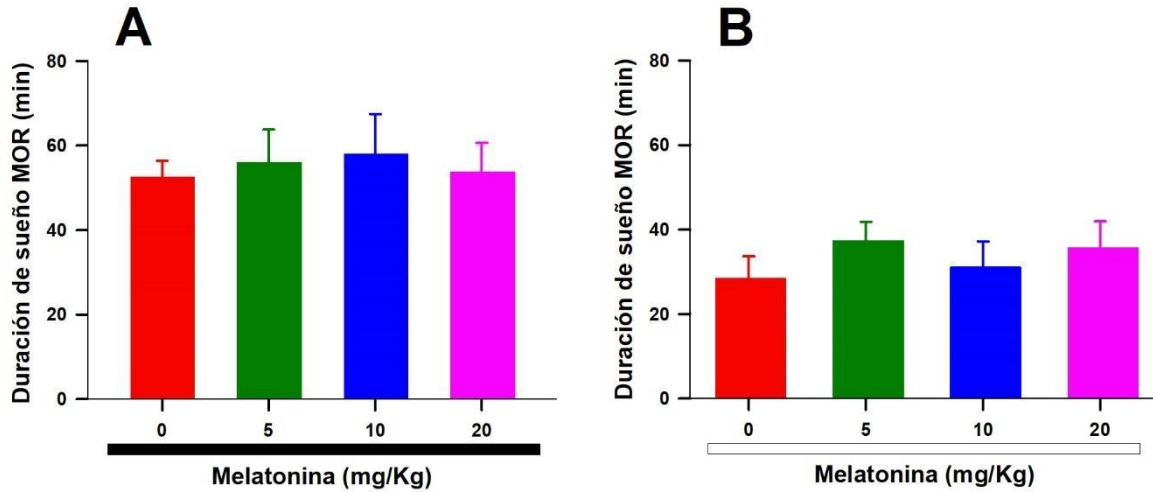


Figura 22. Duración total de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos dependiendo de los periodos luz/oscuridad. **A)** La administración de melatonina no modificó la duración total de los episodios de sueño MOR durante la fase de oscuridad ($P0.05$). **B)** No se tuvieron cambios significativos entre las diferentes dosis de melatonina respecto al control durante la fase de luz ($P0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. MOR = movimientos oculares rápidos.

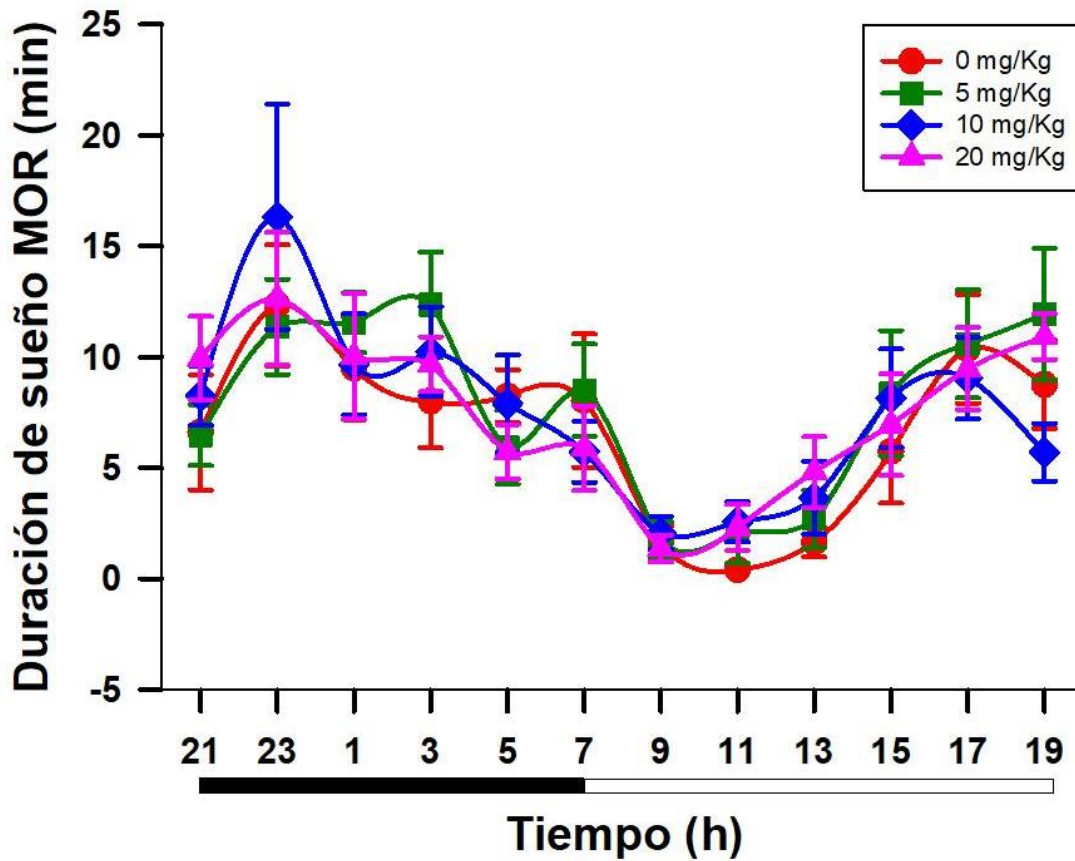


Figura 23. Distribución de la duración total de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos en el ciclo circadiano. No se observaron cambios significativos con ninguna de las dosis de melatonina administradas. ($P0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. MOR = movimientos oculares rápidos.

9.7 Duración media de los episodios de vigilia.

Durante el periodo de oscuridad no se obtuvieron cambios en la duración media de los episodios de vigilia con las diferentes dosis de melatonina administradas respecto al grupo control (véase Figura 24A).

Por otro lado, durante el periodo de luz, se obtuvo un cambio en la duración media de estos episodios que se relaciona con el aumento de las dosis administradas de melatonina administrada, disminuyendo significativamente con la administración de la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 3.37$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 2.73$, $P < 0.05$; véase Figura 24B).

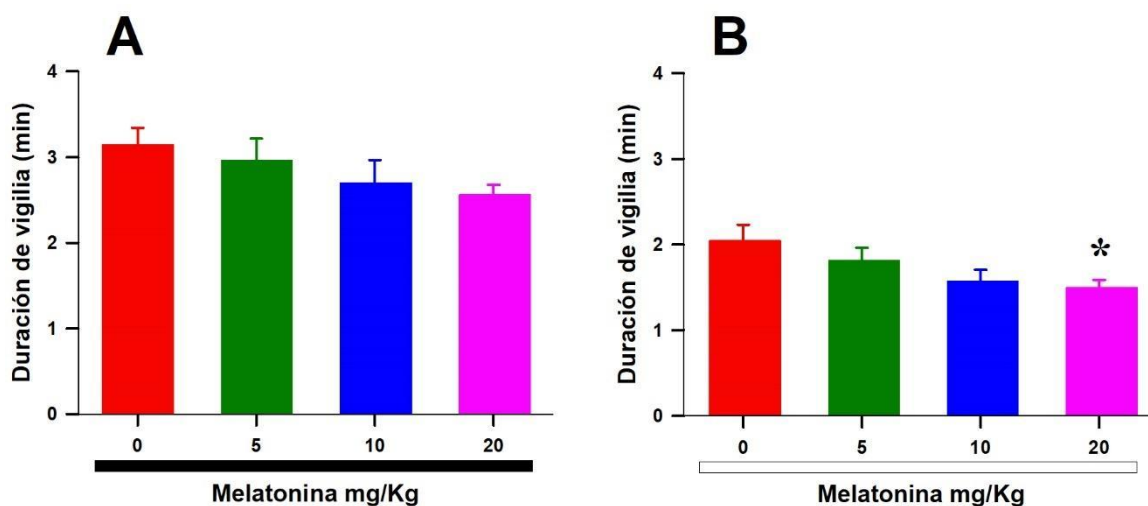


Figura 24. Duración media de los episodios de vigilia dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) Durante el periodo de oscuridad no se obtuvieron cambios significativos con las dosis de melatonina administrada ($P > 0.05$). **B)** En el periodo de luz se presentó una disminución en la duración media de los episodios de vigilia, con una diferencia significativa con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control ($*P < 0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz.

En su distribución a lo largo de las 24 h de registro, se obtuvo que la duración media de los episodios de vigilia disminuyó significativamente entre las 0900 h y las 1100 h con la dosis de 10 mg/Kg (ANOVA de medidas repetidas $F = 4.31$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett $q = 9.91$, $P < 0.05$) y de 20 mg/Kg (ANOVA de medidas repetidas $F = 4.31$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 2.83$, $P < 0.05$; véase Figura 25).

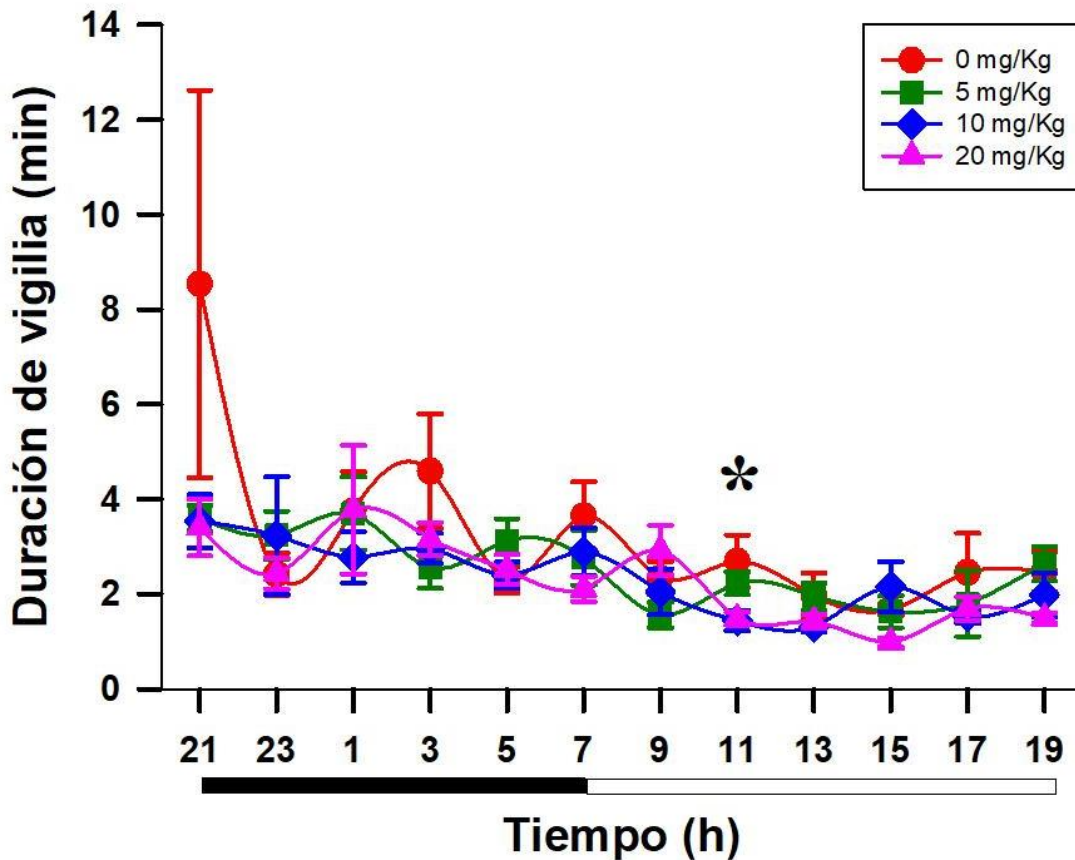


Figura 25. Distribución de la duración media de los episodios de vigilia en el ciclo circadiano. Se observa una disminución significativa en la duración media de los episodios de vigilia con las dosis de 10mg/Kg y 20 mg/Kg respecto al grupo control ($*P<0.05$) entre las 0900 h y las 1100 h. Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz.

9.8 Duración media de los episodios de sueño de ondas lentas.

La duración media de los episodios de SOL durante el periodo de oscuridad no se modificó con ninguna de las tres dosis de melatonina (véase Figura 26A). Así mismo, durante el periodo de luz no se obtuvieron cambios con la administración de melatonina en diferentes dosis respecto al grupo control (véase figura 26B).

Al analizar la distribución de la duración media de los episodios de SOL a lo largo de las 24 h de registro no se obtuvieron cambios significativos entre los grupos con melatonina respecto al grupo control en ningún periodo del día (véase Figura 27).

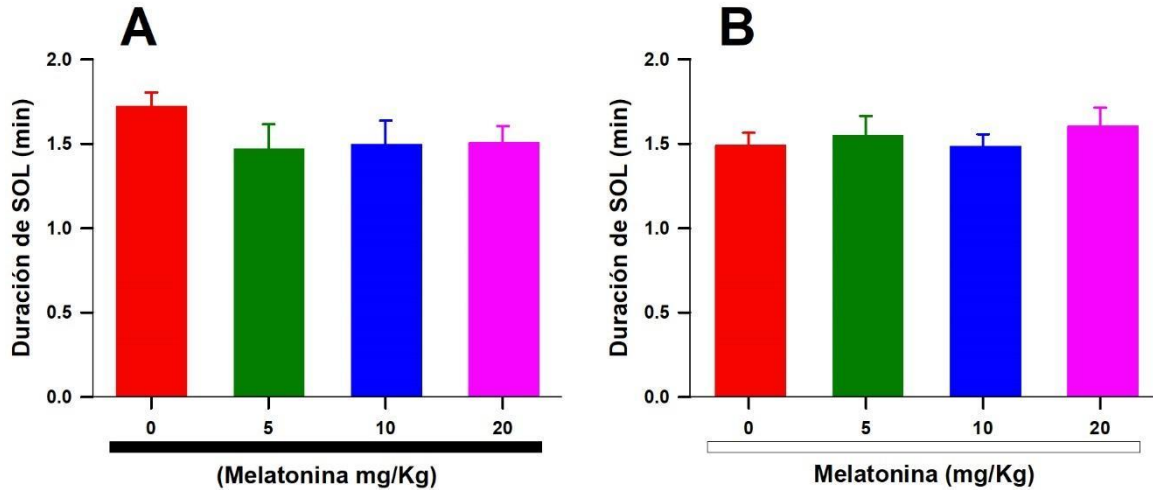


Figura 26. Duración media de los episodios de sueño de ondas lentas dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) La duración media de los episodios de SOL no se modificó con la administración de melatonina durante el periodo de oscuridad ($P0.05$). B) Durante el periodo de luz no se observaron cambios significativos entre los grupos ($P0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. SOL = sueño de ondas lentas.

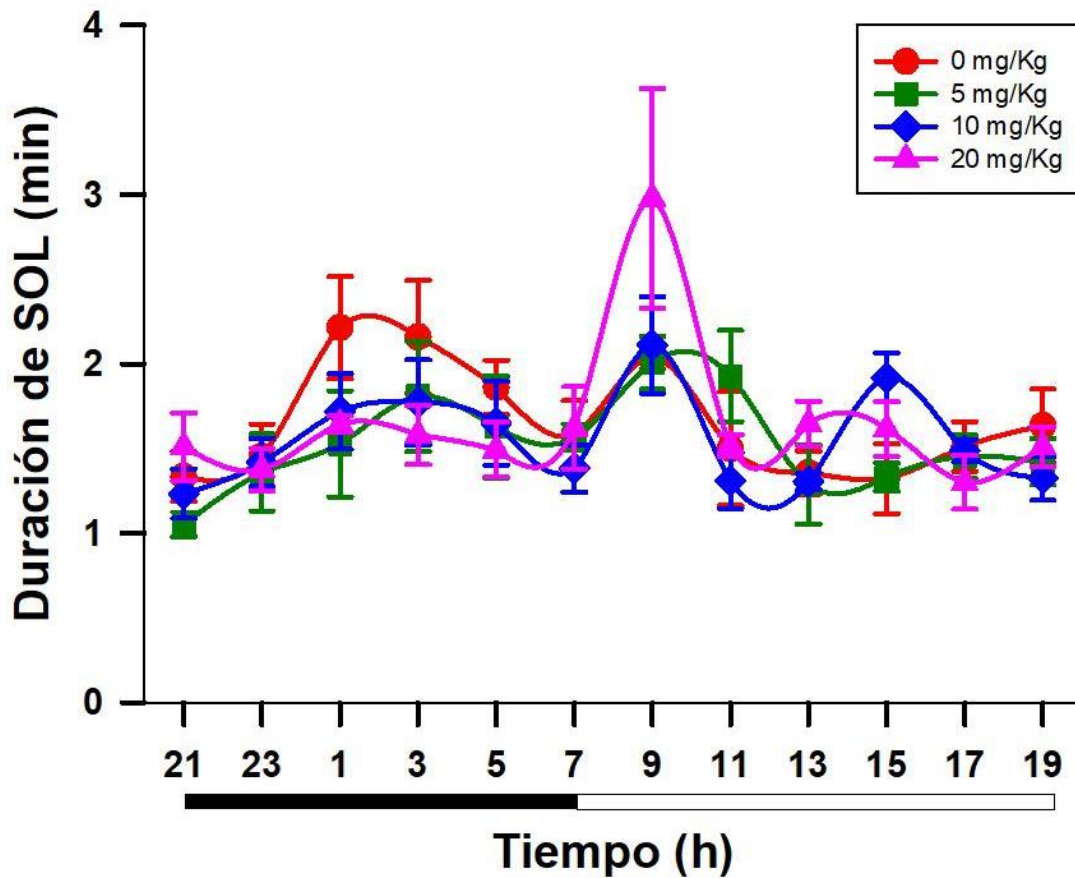


Figura 27. Distribución de la duración media de los episodios de sueño de ondas lentas en el ciclo circadiano. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos ($P0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. SOL = sueño de ondas lentas.

9.9 Duración media de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos.

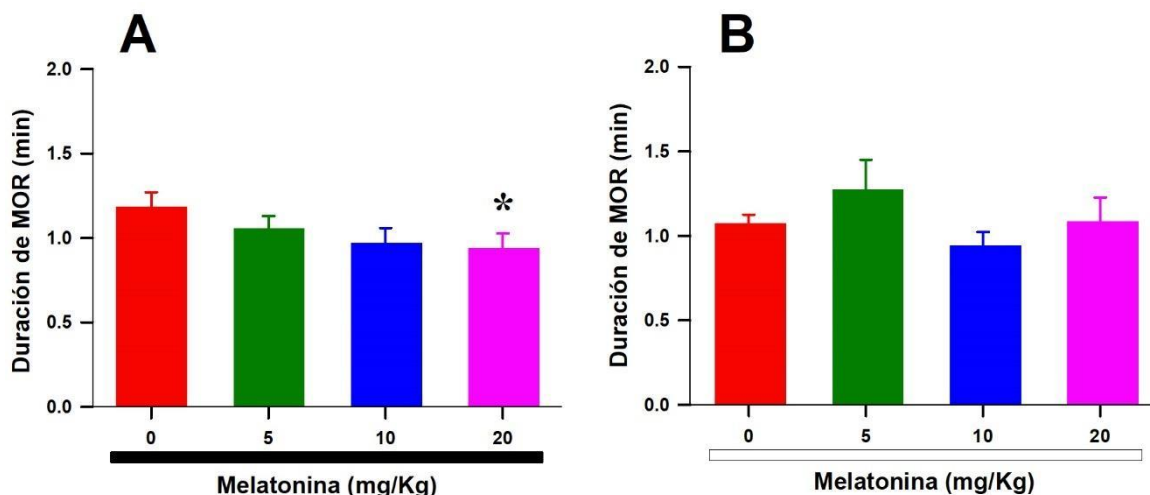


Figura 28. Duración media de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos dependiendo de los periodos luz/oscuridad. **A)** En el periodo de oscuridad se obtuvo una disminución de la duración media de los episodios dependiendo de la dosis la cual fue significativa con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control ($*P<0.05$). **B)** Durante el periodo de luz no se obtuvieron cambios significativos entre los grupos ($P>0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. MOR = movimientos oculares rápidos.

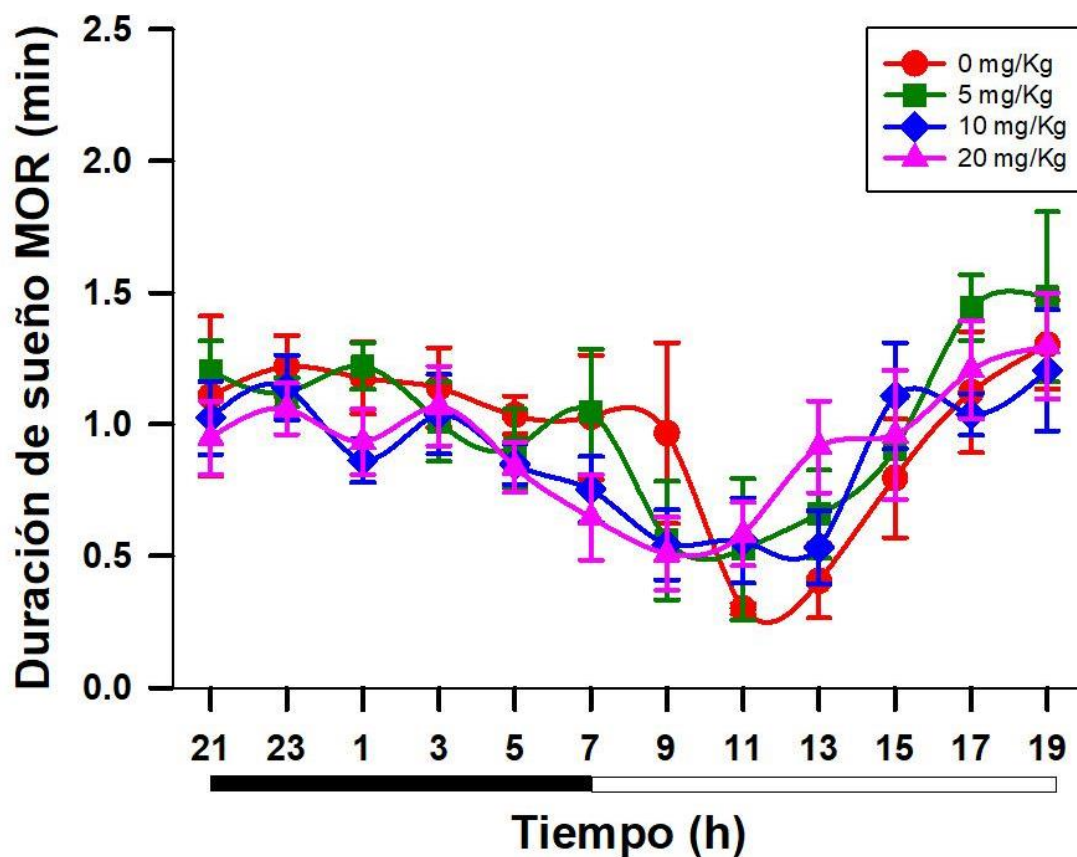


Figura 29. Distribución de la duración media de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos en el ciclo circadiano. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P>0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. MOR = movimientos oculares rápidos.

Durante el periodo de oscuridad se obtuvo una disminución significativa en la duración media de los episodios de sueño MOR con la administración de la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 3.35$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 2.77$, $P < 0.05$; véase Figura 28A). En cuanto al periodo de luz, no se observaron cambios significativos con ninguna de las dosis de melatonina administradas (véase Figura 28B).

Al analizar la distribución de la duración media de los episodios de sueño MOR a lo largo del ciclo circadiano no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos con melatonina en diferentes dosis respecto al grupo control (véase Figura 29).

9.10 Latencia del sueño con movimientos oculares rápidos.

La latencia al primer episodio de sueño MOR no se modificó con las diferentes dosis de melatonina evaluadas respecto al grupo control (véase Figura 30).

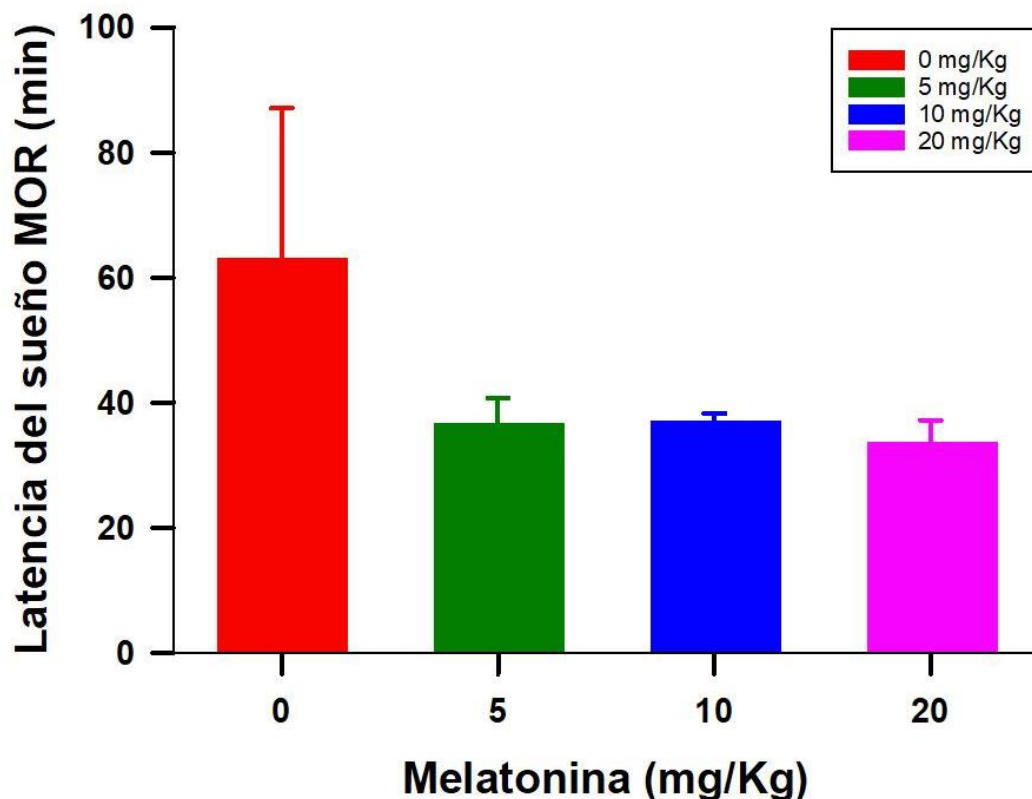


Figura 30. Latencia del sueño con movimientos oculares rápidos. No se obtuvieron cambios estadísticamente significativos entre los grupos tratados con melatonina y el grupo control ($P < 0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. Abreviaturas. MOR = movimientos oculares rápidos.

9.11 Frecuencia de los episodios de inmovilidad.

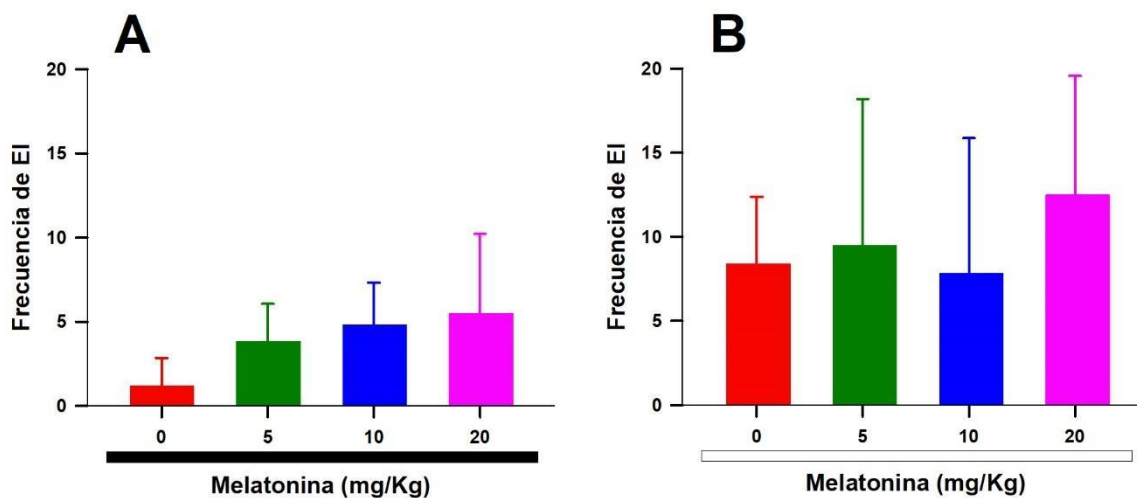


Figura 31. Frecuencia de los episodios de inmovilidad dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) No se obtuvo un cambio en la frecuencia de los episodios de inmovilidad durante el periodo de oscuridad ($P0.05$). B) No se modificó la frecuencia de los episodios de inmovilidad durante el periodo de luz con la administración de melatonina en diferentes dosis ($P0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. EI = episodios de inmovilidad.

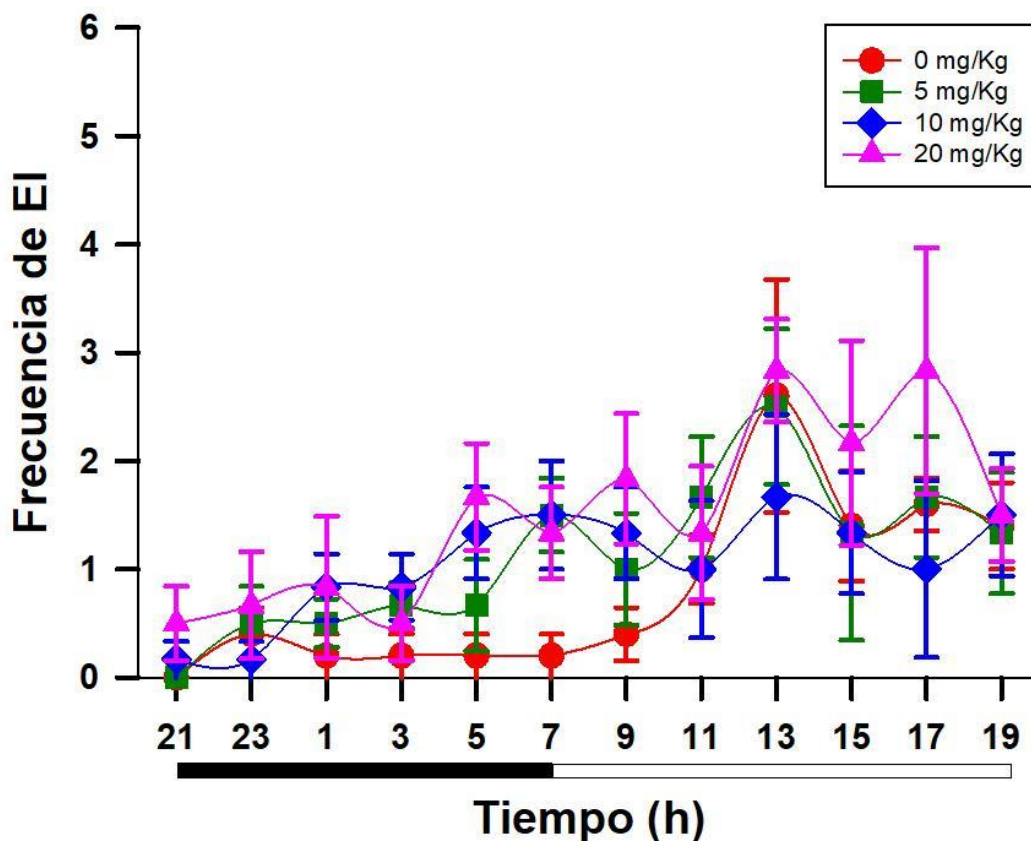


Figura 32. Distribución de la frecuencia de los episodios de inmovilidad en el ciclo circadiano. No se obtuvo un cambio significativo en la frecuencia de los episodios de inmovilidad con la administración de melatonina exógena ($P0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. EI = episodios de inmovilidad.

Durante el periodo de oscuridad no se modificó la frecuencia de los episodios de inmovilidad con las diferentes dosis de melatonina exógena administradas (véase Figura 31A). Del mismo modo, durante el periodo de luz no se observó un cambio estadísticamente significativo con la administración de melatonina en diferentes dosis con respecto al grupo control (véase Figura 31B).

Así mismo, en la distribución de la frecuencia de los episodios de inmovilidad a lo largo de las 24h de registro no se obtuvo un cambio significativo con las diferentes dosis de melatonina administradas respecto al grupo control (véase Figura 32).

9.12 Duración total de los episodios de inmovilidad.

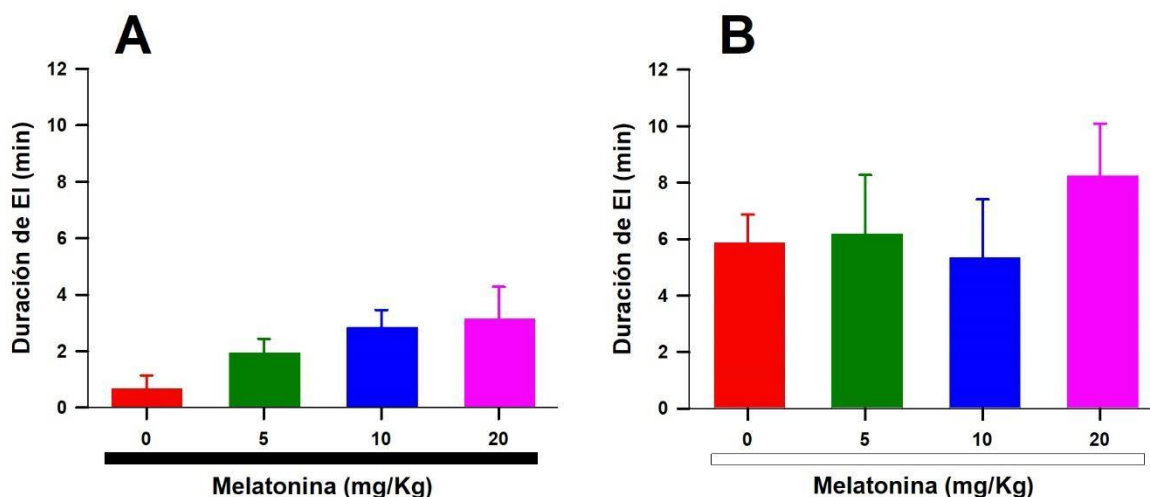


Figura 33. Duración total de los episodios de inmovilidad dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) No se obtuvieron cambios significativos entre las diferentes dosis de melatonina y el grupo control durante el periodo de oscuridad ($P < 0.05$). **B)** Durante el periodo de luz no se obtuvo un efecto significativo con la administración de melatonina respecto al grupo control ($P < 0.05$). Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. EI = episodios de inmovilidad.

Durante el periodo de oscuridad los cambios obtenidos mediante la administración de dosis crecientes de melatonina no fueron estadísticamente significativos (véase Figura 33A). Asimismo, durante el periodo de luz no se obtuvo un cambio significativo entre las diferentes dosis de melatonina administradas respecto al grupo control (véase Figura 33B).

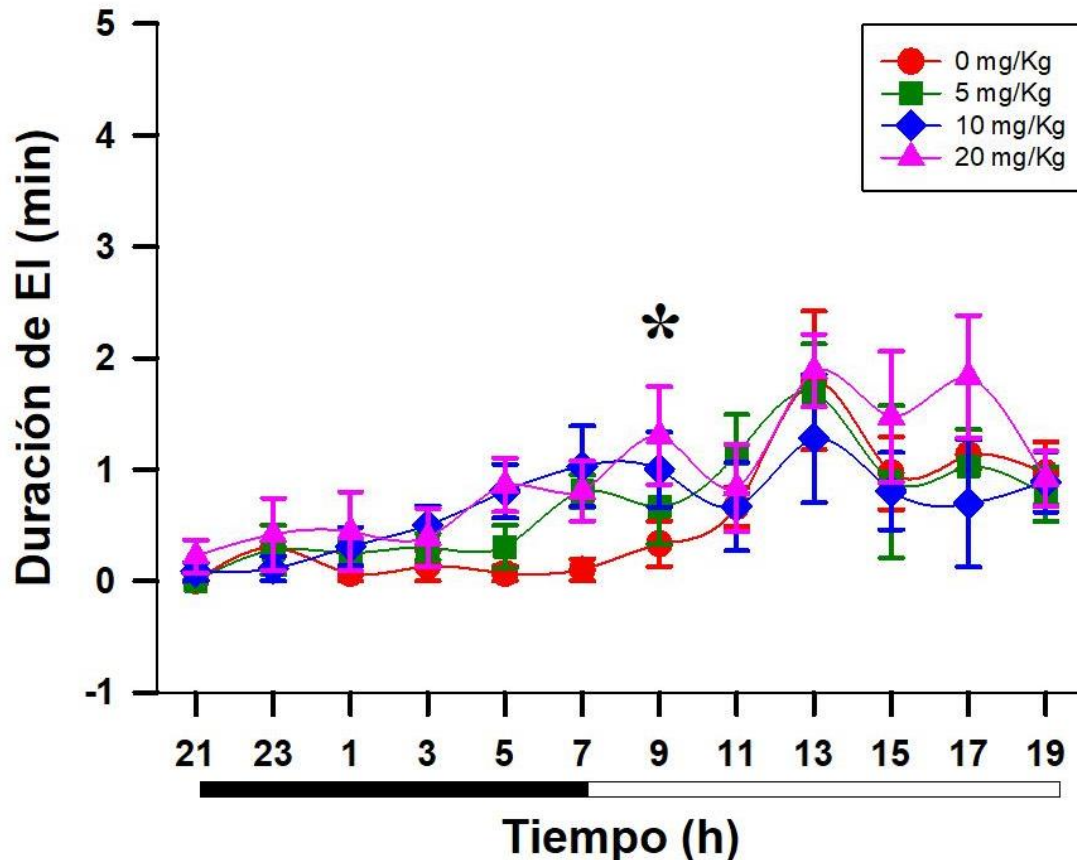


Figura 34. Distribución de la duración total de los episodios de inmovilidad en el ciclo circadiano. Se observa un aumento en la duración total con las dosis de 10 mg/Kg y 20 mg/Kg a partir de las 0300 h, llegando a un pico máximo entre las 0700 h y las 0900 h, con una diferencia significativa con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control (* $P < 0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. EI = episodios de inmovilidad.

Al analizar la distribución de la duración total de los episodios de inmovilidad a lo largo de las 24 h de registro en intervalos de 120 min se obtuvo un incremento con las dosis de 10 mg/Kg y de 20 mg/Kg respecto al grupo control, el cual comienza entre las 0300 h y las 0500 h llegando a un pico máximo entre las 0700 h y las 0900 (véase Figura 34).

Durante las primeras dos horas de luz, se obtuvo un pico máximo de aumento significativo con la administración de melatonina con dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 3.86$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 2.93$, $P < 0.05$; véase Figura 34).

9.13 Duración media de los episodios de inmovilidad.

Durante el periodo de oscuridad en los episodios de inmovilidad se obtuvo un aumento significativo en la duración media con la administración de melatonina con la dosis de 10 mg/Kg respecto al grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 3.81$, $gl = 5, 22$, $P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 3.04$, $P < 0.05$; véase Figura 35A).

En el periodo de luz no se modificó la duración media de los episodios de inmovilidad con ninguna de las dosis de melatonina administradas respecto al grupo control (véase Figura 35B).

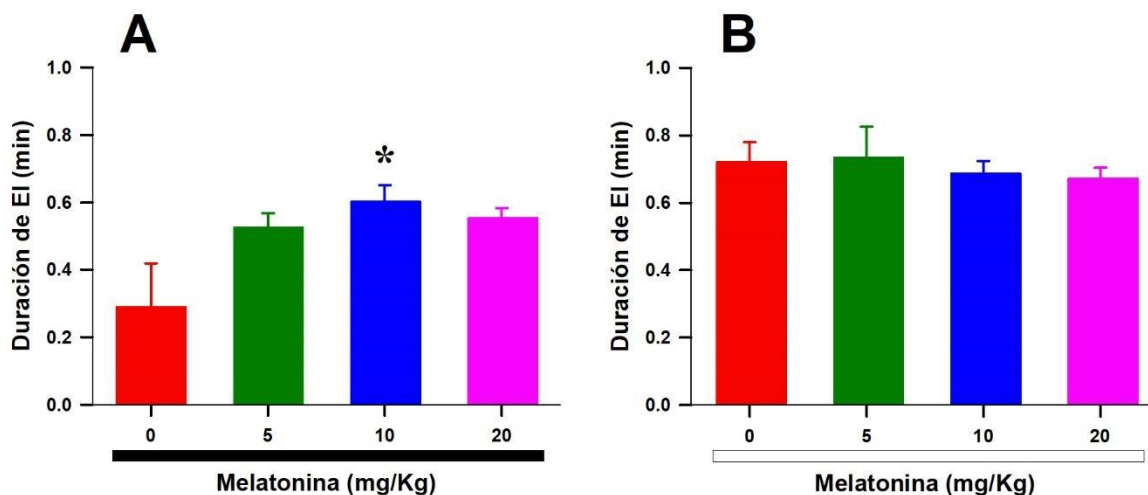


Figura 35. Duración media de los episodios de inmovilidad dependiendo de los periodos luz/oscuridad. A) Durante el periodo de oscuridad se presentó un incremento significativo en la duración media de los episodios de inmovilidad con la dosis de 10 mg/Kg respecto al grupo control ($*P0.05$). **B)** No se observaron cambios significativos entre los grupos ($P0.05$) durante el periodo de luz. Las barras representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. EI = episodios de inmovilidad.

Al analizar la duración media de los episodios de inmovilidad a lo largo de las 24 h de registro se obtuvo un incremento significativo con la administración de melatonina entre las 0300 h y las 0500 h al administrar las dosis de 10 mg/Kg (ANOVA de medidas repetidas $F = 6.16$, $gl = 5, 22$, $P < 0.01$, seguido de la prueba de Dunnett $q = 3.13$, $P < 0.05$) y de 20 mg/Kg (ANOVA de medidas repetidas $F =$

6.16, $gl = 5, 22, P < 0.01$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 3.16, P < 0.05$; véase Figura 36).

Por otro lado, entre las 1500 h y las 1700 h se obtuvo una disminución significativa en la duración media de los episodios con la dosis de 10 mg/Kg respecto al grupo control (ANOVA de medidas repetidas $F = 4.50, gl = 5, 22, P < 0.05$, seguido de la prueba de Dunnett, $q = 2.88, P < 0.05$; véase Figura 36).

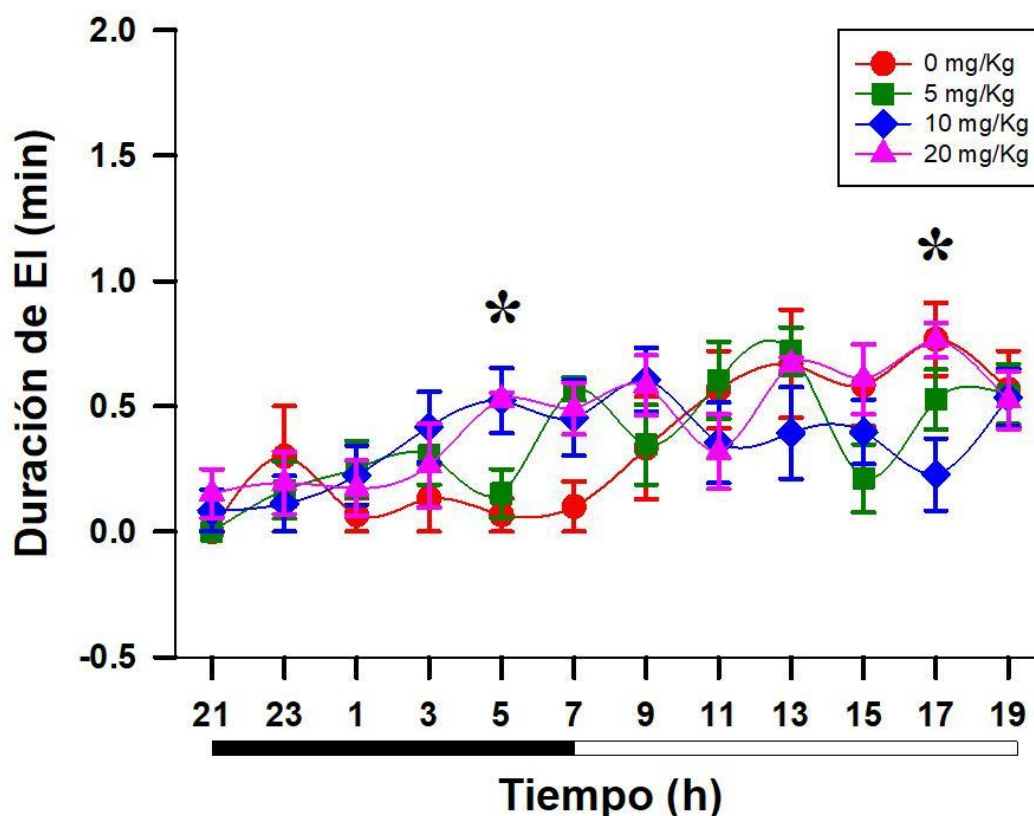


Figura 36. Distribución de la duración media de los episodios de inmovilidad en el ciclo circadiano. Se obtuvo un aumento significativo en la duración media de los EI durante el periodo entre las 0300 h y las 0500 h con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control ($*P < 0.05$); así mismo, se obtuvo una disminución significativa en el lapso entre las 1500 h y las 1700 h con la dosis de 10 mg/Kg respecto al grupo control ($*P < 0.05$). Los puntos representan la media \pm E.E.M. de 6 sujetos por grupo. La barra negra representa el periodo de oscuridad y la barra blanca el periodo de luz. Abreviaturas. EI = episodios de inmovilidad.

9.14 Hipnogramas

En los hipnogramas de una rata *taiep* podemos observar que la duración media de los episodios de sueño MOR es menor durante el periodo de oscuridad en el grupo con la administración de melatonina en dosis de 20 mg/Kg (véase Figura 37D) respecto al grupo control (véase Figura 37A).

Así mismo, se observa un incremento en la frecuencia de los episodios de inmovilidad con la administración de melatonina (véanse Figuras 37B, 37C y 37D) respecto al grupo control (véase Figura 37A).

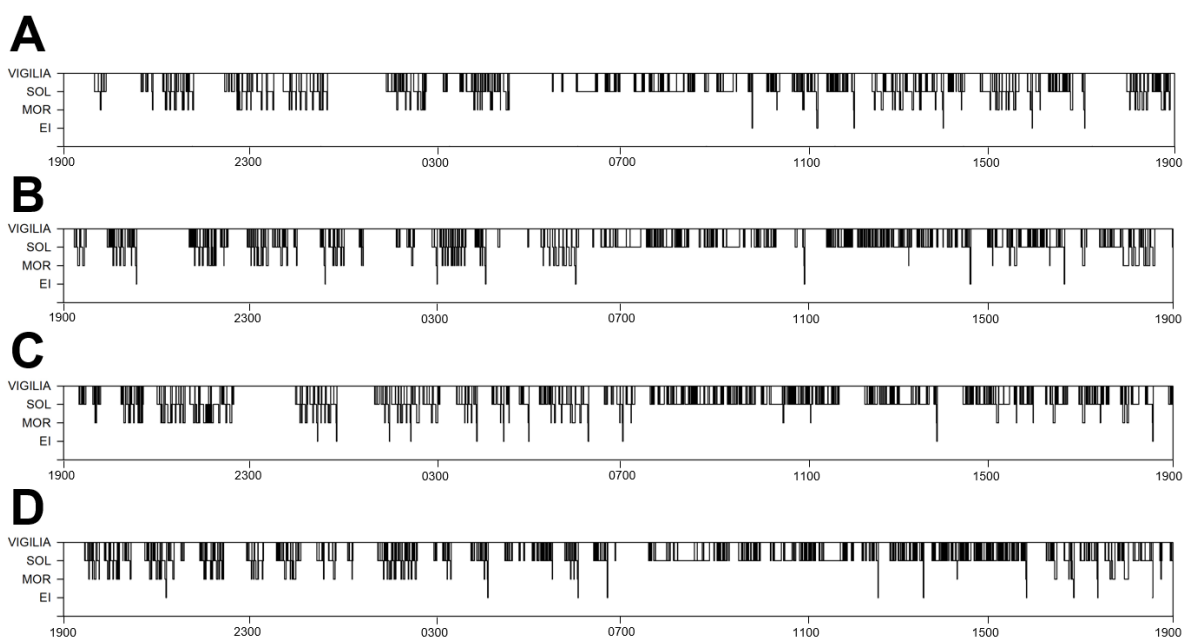


Figura 37. Hipnogramas de 24 h de una rata *taiep* con la administración de diferentes dosis de melatonina. A) Grupo control. **B)** Administración de 5 mg/Kg de melatonina. **C)** Administración de 10 mg/Kg de melatonina. **D)** Administración de 20 mg/Kg de melatonina. Los estados del ciclo sueño-vigilia se indican en el lado izquierdo de cada hipnograma. Abreviaturas. MOR = sueño con movimientos oculares rápidos, SOL = sueño de ondas lentas, EI = episodios de inmovilidad.

10. DISCUSIÓN

Uno de los principales cambios que obtuvimos fue una disminución en la duración total de la vigilia con la administración de melatonina durante el periodo de luz, con una diferencia significativa entre las 1300 h y las 1500 h con la dosis de 20 mg/Kg respecto al grupo control (véase Figura 19), lo cual está asociado con un incremento de la duración total del SOL, tanto durante el periodo de luz (véase Figura 20), como durante el periodo de las 1300 h a las 1500 h (véase Figura 21), siendo significativo en ambos casos con la dosis de 20 mg/Kg. Sin que se obtuvieran cambios significativos en la duración total de los episodios de sueño MOR ni en los episodios de inmovilidad.

Por otro lado, se obtuvo un ligero incremento en la frecuencia de los episodios de vigilia y de SOL durante el periodo de oscuridad y en el periodo de luz (véanse Figuras 12 y 14) siendo estadísticamente significativo entre las 0900 h y las 1100 con la administración de melatonina a la dosis de 10 mg/Kg (véanse Figuras 13 y 15). Del mismo modo, se obtuvo una disminución significativa en la duración media de los episodios de vigilia durante el periodo de luz con la dosis de 20 mg/Kg, así como durante el periodo de las 0900 h hasta las 1100 h con las dosis de 10 y 20 mg/Kg, sin que se obtuviesen cambios significativos en la duración media de los episodios de los episodios de SOL con ninguna de las dosis de melatonina probadas.

Una de las funciones principales de la melatonina es su actividad cronobiótica a través de su interacción con los receptores MT1 y MT2 localizados en múltiples áreas del cerebro, entre las cuales destacan los núcleos involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia (Gobbi y Comai, 2019). En humanos, la melatonina ha demostrado tener la capacidad de reducir la latencia del sueño, así como incrementar la duración total del sueño (Dollins *et al.*, 1994). Sin embargo, en ratas se ha mostrado el efecto contrario, disminuyendo el tiempo de SOL, así como un incremento del tiempo de vigilia (Descamps *et al.*, 2009; Mendelson *et al.*, 1980), lo que concuerda con los cambios observados en el presente estudio en este mutante de tubulina.

Estos resultados destacan el efecto cronobiótico de la melatonina, ya que su administración en animales nocturnos, como son las ratas, resulta en un efecto contrario al observado en animales diurnos como en los humanos, por lo que se ha propuesto que la melatonina no actúa como promotor del sueño, sino que estimula la activación de los procesos fisiológicos correspondientes a la etapa de oscuridad en cada especie, dando lugar a un efecto soporífero en los humanos.

Sin embargo, las vías por las cuales la melatonina regula el ciclo sueño-vigilia en los animales nocturnos aún no se han esclarecido. En años recientes, Yang y sus colaboradores (2021) propusieron que la producción de óxido nítrico en las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe juega un papel relevante en el efecto promotor de la vigilia de la melatonina en ratas, ya que al administrar melatonina a estas neuronas en un estudio *in vitro* se presentó una disminución de la expresión de la óxido nítrico sintasa neuronal, la cual a través de la vía WNK-SPAK/OSR-NKCC1 podría atenuar la actividad inhibitoria GABAérgica sobre el núcleo dorsal del rafe, induciendo la vigilia durante el periodo de oscuridad (Yang *et al.*, 2021).

En la rata *taiep* se han reportado niveles elevados de óxido nítrico, así como de la óxido nítrico sintasa en sus tres isoformas en el cerebelo (Leon-Chavez *et al.*, 2006), siendo posible que este incremento se encuentre también en otras áreas del sistema nervioso central, incluyendo los núcleos reguladores del ciclo sueño-vigilia, lo que contribuiría a la desorganización de este ritmo circadiano.

Del mismo modo, el efecto cronobiótico de la melatonina observado en el presente estudio apoya la importancia del óxido nítrico en la regulación del ciclo sueño-vigilia, sin embargo, muchas áreas de esta vía aún permanecen inexploradas, por lo que se propondría realizar más estudios integrando el papel antioxidante de la melatonina, además de su efecto cronobiótico para lo cual sería deseable la administración crónica

Por otra parte, algunos estudios señalan un efecto promotor del sueño en ratas y ratones, ambos animales nocturnos, al administrar la melatonina tanto por vía intraperitoneal (Holmes *et al.*, 1982), como de manera local en determinadas áreas

del cerebro que están implicadas en la regulación del ciclo sueño-vigilia, como lo son el hipotálamo lateral orexinérgico (Sharma *et al.*, 2018) y el área preóptica medio lateral (Mendelson, 2002). Sin embargo, cabe mencionar que estos estudios registraron la actividad electroencefalográfica por 4, 6 y 2 h, respectivamente, lo cual no es suficiente para determinar el efecto de la melatonina a lo largo de un ciclo de 24 h, dejando en incógnita si el efecto se da por medio de vías homeostáticas o por una regulación circadiana.

Dada esta discrepancia entre los diversos estudios, y ya que aún se desconocen muchas de las vías que activa la melatonina al interactuar con sus receptores en las diversas áreas del cerebro involucradas con la regulación del ciclo sueño-vigilia. Por lo que es necesario seguir investigando su mecanismo de acción tanto en modelos animales, como a nivel celular y molecular, con la finalidad de tener una mejor comprensión de su uso y beneficio en el tratamiento de las diversas patologías del sueño.

Otro cambio que debemos destacar con la administración de melatonina es el incremento en la duración total de los episodios de vigilia desde las 0300 h hasta las 0500 h que fue estadísticamente significativo con la administración de melatonina a la dosis de 5 mg/Kg (véase figura 19), lo que es coincidente con el pico de producción endógena de melatonina (Tordjman *et al.*, 2017). Con las dosis de 10 y 20 mg/Kg se obtuvo un ligero incremento respecto al grupo control, lo cual nos lleva a considerar que pueda existir un proceso de desensibilización e internalización de los receptores de melatonina MT1 y MT2 debido a la posible saturación de estos con las dosis más altas empleadas en esta tesis.

Se ha establecido que la exposición prolongada de los receptores MT1 y MT2 a melatonina conlleva a la abolición de la cascada de señalización inducida por estos receptores, evitando la inhibición de la producción de monofosfato de adenosina cíclico (MacKenzie *et al.*, 2002), esto a través del reclutamiento de la β -arrestina y su posterior endocitosis de los receptores (Bondi *et al.*, 2008; Gerdin *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Gerdin y colaboradores (2004) se obtuvo que la recuperación de los receptores MT2 disponibles para su interacción con un agonista

después de su internalización requería al menos 8 horas (Sherin *et al.*, 1998), lo que podría explicar por qué el efecto obtenido con la dosis de 20 mg/Kg sobre la duración total de los episodios de vigilia y de SOL se presentó hasta 10 horas después del aumento en la duración total de la vigilia inducido con la dosis de 5 mg/Kg.

Por otra parte, en este mismo estudio se señala que la cantidad de receptores recuperados posterior a su internalización era mayor con la administración de 0.3 nM de melatonina que, con la administración de 10 nM, lo que sugiere que dosis altas de melatonina señalizan los endosomas para su degradación. Mientras que, dosis más bajas permiten la recuperación de los receptores (Sherin *et al.*, 1998), pudiendo ser esta la razón de que se presentara un aumento significativo en la frecuencia de los episodios de vigilia y de SOL con la administración de 10 mg/Kg de melatonina, pero no con la administración de 20 mg/Kg.

Cabe mencionar que se desconoce si existe un proceso similar con los receptores MT1, y considerando que la distribución de ambos receptores varía entre los diferentes núcleos cerebrales que regulan el ciclo sueño-vigilia. De hecho, se ha asociado a los receptores MT1 con el sueño MOR y a los receptores MT2 con el SOL (Gobbi y Comai, 2019). Es importante destacar la necesidad de profundizar sobre los efectos de la melatonina a diferentes dosis, así como el proceso de saturación, internalización y recuperación de sus receptores MT1 y MT2, lo que nos permitiría tener una mejor comprensión del uso farmacológico de la melatonina, así como de los agonistas selectivos para cada receptor.

En la latencia del sueño MOR no se obtuvieron cambios significativos con ninguna de las dosis de melatonina administradas; así como en la duración total de los episodios del sueño MOR tanto durante el periodo de oscuridad y en el periodo de luz (véase Figura 22), como al analizar su distribución a lo largo de las 24 h de registro (véase Figura 23). Sin embargo, se obtuvo una tendencia a incrementar la frecuencia durante el periodo de oscuridad y de luz (véase Figura 16), así como una disminución significativa en la duración media de los episodios de sueño MOR con la administración de 20 mg/Kg de melatonina durante el periodo de oscuridad (véase Figura 28), lo que nos indica la alteración del circuito que regula el sueño MOR, sin

que se vea afectado el tiempo total de este, así como la latencia al primer episodio de sueño MOR.

Por otro lado, obtuvimos una tendencia a incrementar la duración total, la frecuencia y la duración media de los episodios de inmovilidad que comienza con el pico de producción endógena de melatonina a las 0300 h con las dosis de 10mg/Kg y 20 mg/Kg, con una diferencia significativa en la duración total durante las dos primeras horas de luz (véase Figura 34) y en la duración media durante el periodo de oscuridad (véase Figura 35) y entre las 0300 h y las 0500 h (véase Figura 36).

Es importante mencionar que la narcolepsia presenta múltiples alteraciones asociadas al sueño MOR, como lo son la parálisis del sueño, las alucinaciones hipnopómpicas y la cataplejía, considerando esta última como eventos repentinos de sueño MOR que interrumpen la vigilia, debido a la similitud que existe entre ambos eventos tanto en sus características conductuales como en la actividad electroencefalográfica presentada (Thorpy *et al.*, 2024).

De hecho, la suma del tiempo total de sueño MOR y el tiempo total de episodios de inmovilidad presentados en la rata *taiep* da una duración similar al tiempo total de sueño MOR presentado en ratas Sprague-Dawley (Cortés. *et al.*, 2011), por lo que se propone que la administración de melatonina está actuando mediante las mismas vías neuronales para inducir el aumento en la fragmentación del sueño MOR y el incremento en la duración total, la duración media y frecuencia de los episodios de inmovilidad, principalmente a través de su interacción con los núcleos que regulan el sueño MOR.

Uno de los principales núcleos que participa en la regulación del sueño MOR es el locus coeruleus, cuyas neuronas noradrenérgicas expresan receptores MT1 (Gobbi y Comai, 2019), por lo cual se ha producido un creciente interés sobre el efecto de la melatonina y de los agonistas selectivos de los receptores MT1 y MT2 sobre dichas neuronas, sin embargo, esta interacción aún no se ha esclarecido en su totalidad.

En un estudio realizado en ratas Sprague-Dawley se mostró que la administración de un agonista selectivo de los receptores MT1 por vía subdérmica producía la inhibición de la actividad de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, induciendo un incremento en la duración total del sueño MOR (López-Canul *et al.*, 2024).

Así mismo, en perros narcolépticos se ha descrito que la ausencia de la actividad de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus durante los episodios de cataplejía (Wu *et al.*, 1999); además de un incremento en la expresión de los receptores α_2 -adrenérgicos en el núcleo ya mencionado que induce una autoinhibición de las neuronas noradrenérgicas (Fruhstorfer *et al.*, 1989).

En ratas *taiep*, la administración los agonistas de los receptores α_2 -adrenérgicos clonidina y xilacina produce un incremento en la frecuencia de los episodios de inmovilidad, mientras que la administración de yohimbina o idazoxan, antagonistas de dichos receptores, disminuye su frecuencia (Eguibar *et al.*, 2006). Dicho esto, es necesario señalar que, aunque aún se requieren mayores estudios sobre los efectos de la melatonina con sus receptores MT1 en el locus coeruleus, los resultados de este estudio indican que esta interacción produce una inhibición de las neuronas noradrenérgicas que altera la regulación del sueño MOR y aumenta la frecuencia y duración de los episodios de inmovilidad.

Por otra parte, es necesario señalar la importancia del sistema dopaminérgico en la regulación de los eventos de cataplejía, ya que, tanto en la rata *taiep* como en los perros narcolépticos se presentó un incremento en los episodios de inmovilidad o cataplejía, respectivamente, con la administración de quinpirol, un agonista selectivo de los receptores D2 y D3, mientras que la administración de antagonistas de estos receptores produce el efecto contrario (Eguibar *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 1996).

Se ha señalado que el área tegmental ventral participa en la promoción del sueño MOR, ya que la activación de las neuronas dopaminérgicas de este núcleo inhibe a la amígdala basolateral a través de su interacción con los receptores D2, lo cual induce episodios similares a la cataplejía en ratones no narcolépticos durante la

vigilia (Zhang *et al.*, 2022). Aunado a esto, en un estudio realizado en ratas *Sprague-Dawley* se mostró que la administración sistémica de agomelatina, un agonista de los receptores MT1 y MT2, producía un incremento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (Chenu *et al.*, 2013).

Dicho esto, proponemos que la melatonina, a través de su interacción con los receptores MT1 y MT2 expresados en el área tegmental ventral incrementa la actividad neuronal dopaminérgica de dicho núcleo inhibiendo a la amígdala basolateral, produciendo un incremento en los episodios de inmovilidad y una fragmentación del sueño MOR.

Cabe señalar que se requieren más estudios para establecer la conexión entre la melatonina y los sistemas monoaminérgicos en la regulación del sueño MOR y los episodios de cataplexia. Sin embargo, dados los resultados del presente trabajo se propone enfocar futuros proyectos en el papel del área tegmental ventral dopaminérgico y del locus coeruleus noradrenérgico sobre el efecto de la melatonina y la regulación de los trastornos del sueño MOR, como lo está la narcolepsia con cataplejía.

11. CONCLUSIONES

1. En las ratas *taiep* macho adultas la melatonina en dosis de 5 mg/Kg incrementa la duración total de la vigilia entre las 0300 y las 0500; mientras que, la dosis de 20 mg/Kg disminuye la duración total de la vigilia e incrementa el sueño de ondas lentas entre las 1300 y las 1500.
2. La administración de melatonina en dosis de 20 mg/Kg en ratas *taiep* macho adultas incrementa la duración total entre las 0700 y las 0900, así como la duración media entre las 0300 y las 0500 de los episodios de inmovilidad.
3. La administración de melatonina exógena en dosis de 20 mg/Kg disminuyó la duración media de los episodios de sueño con movimientos oculares rápidos durante el periodo de oscuridad.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M. A., Kumar, S., McGinty, D., Alam, M. N., & Szymusiak, R. (2014). Neuronal activity in the preoptic hypothalamus during sleep deprivation and recovery sleep. *Journal of Neurophysiology*, *111*(2), 287–299.
- Alata, M., Piazza, V., Jaramillo-Restrepo, C., Eguibar, J. R., Cortes, C., & Hernandez, V. H. (2022). H-ABC tubulinopathy revealed by label-free second harmonic generation microscopy. *Scientific Reports*, *12*(1), 14417.
- Amaral, F. G. do, & Cipolla-Neto, J. (2018). A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, *62*(4), 472–479.
- Anaclet, C., Ferrari, L., Arrigoni, E., Bass, C. E., Saper, C. B., Lu, J., & Fuller, P. M. (2014). The GABAergic parafacial zone is a medullary slow wave sleep-promoting center. *Nature Neuroscience*, *17*(9), 1217–1224.
- Anaclet, C., Lin, J.-S., Vetrivelan, R., Krenzer, M., Vong, L., Fuller, P. M., & Lu, J. (2012). Identification and characterization of a sleep-active cell group in the rostral medullary brainstem. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(50), 17970–17976.
- Andersen, L. P. H., Werner, M. U., Rosenkilde, M. M., Harpsøe, N. G., Fuglsang, H., Rosenberg, J., & Gögenur, I. (2016). Pharmacokinetics of oral and intravenous melatonin in healthy volunteers. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *17*(1), 8.
- Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., & Jockers, R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(24), 21522–21528.
- Ayoub, M. A., Levoye, A., Delagrangé, P., & Jockers, R. (2004). Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction

properties compared with MT2 homodimers. *Molecular Pharmacology*, 66(2), 312–321.

Baba, K., Benleulmi-Chaachoua, A., Journé, A.-S., Kamal, M., Guillaume, J.-L., Dussaud, S., Gbahou, F., Yettou, K., Liu, C., Contreras-Alcantara, S., Jockers, R., & Tosini, G. (2013). Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Science Signaling*, 6(296), ra89.

Bähr, I., Mühlbauer, E., & Peschke, A. E. (2012). Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the Gαq protein-coupled and PI3K signaling pathways: Melatonin receptor and glucagon secretion. *J Pineal Res*, 53(4), 390–398.

Barateau, L., & Dauvilliers, Y. (2019). Recent advances in treatment for narcolepsy. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 12, 1756286419875622.

Baumann-Vogel, H., Schreckenbauer, L., Valko, P. O., Werth, E., & Baumann, C. R. (2021). Narcolepsy type 2: A rare, yet existing entity. *Journal of Sleep Research*, 30(3), e13203.

Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1070–1073.

Bhaskar, S., Hemavathy, D., & Prasad, S. (2016). Prevalence of chronic insomnia in adult patients and its correlation with medical comorbidities. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 5(4), 780–784.

Biggio, G., Biggio, F., Talani, G., Mostallino, M. C., Aguglia, A., Aguglia, E., & Palagini, L. (2021). Melatonin: From neurobiology to treatment. *Brain Sciences*, 11(9), 1121.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M. H., Barbagli, B., Fort, P., & Luppi, P.-H. (2002). The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and

maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study: REM sleep brainstem structures in rats. *Eur J Neurosci*, 16(10), 1959–1973.

Boissard, Romuald, Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B., & Luppi, P.-H. (2003). Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *The European Journal of Neuroscience*, 18(6), 1627–1639.

Bollu, P. C., & Kaur, H. (2019). Sleep medicine: Insomnia and sleep. *Missouri Medicine*, 116(1), 68–75.

Bon, L. (2020). Relationships between REM and NREM in the NREM-REM sleep cycle: a review on competing concepts. *Sleep Med [Internet]*, 70, 6–16.

Bondi, C. D., McKeon, R. M., Bennett, J. M., Ignatius, P. F., Brydon, L., Jockers, R., Melan, M. A., & Witt-Enderby, P. A. (2008). MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 288–298.

Borbély, A. (2022). The two-process model of sleep regulation: Beginnings and outlook. *Journal of Sleep Research*, 31(4), e13598.

Boucetta, S., Cissé, Y., Mainville, L., Morales, M., & Jones, B. E. (2014). Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(13), 4708–4727.

Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, 92(3), 1087–1187.

Chen, K.-S., Xu, M., Zhang, Z., Chang, W.-C., Gaj, T., Schaffer, D. V., & Dan, Y. (2018). A hypothalamic switch for REM and non-REM sleep. *Neuron*, 97(5), 1168-1176.e4.

- Chen, M., Cecon, E., Karamitri, A., Gao, W., Gerbier, R., Ahmad, R., & Jockers, R. (2020). Melatonin MT1 and MT2 receptor ERK signaling is differentially dependent on Gi/o and Gq/11 proteins. *Journal of Pineal Research*, 68(4), e12641.
- Chenu, F., El Mansari, M., & Blier, P. (2013). Electrophysiological effects of repeated administration of agomelatine on the dopamine, norepinephrine, and serotonin systems in the rat brain. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(2), 275–284.
- Chitimus, D. M., Popescu, M. R., Voiculescu, S. E., Panaitescu, A. M., Pavel, B., Zagrean, L., & Zagrean, A.-M. (2020). Melatonin's impact on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease. *Biomolecules*, 10(9), 1211.
- Chou, T. C., Bjorkum, A. A., Gaus, S. E., Lu, J., Scammell, T. E., & Saper, C. B. (2002). Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(3), 977–990.
- Cipolla-Neto, J., & Amaral, F. G. do. (2018). Melatonin as a hormone: New physiological and clinical insights. *Endocrine Reviews*, 39(6), 990–1028.
- Cortés, M. D. C. (2011). *Estudio electroencefalográfico de los episodios de inmovilidad en la rata Taiep: papel del sistema colinérgico*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cortés, Ma Del Carmen, Gavito, B., Ita, M. L., Valencia, J., & Eguibar, J. R. (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 58(2), 95–101.
- Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *Journal of Molecular Endocrinology*, 63(4), R93–R102.

- Curiel, J., Rodríguez Bey, G., Takanohashi, A., Bugiani, M., Fu, X., Wolf, N. I., Nmezi, B., Schiffmann, R., Bugaighis, M., Pierson, T., Helman, G., Simons, C., van der Knaap, M. S., Liu, J., Padiath, Q., & Vanderver, A. (2017). TUBB4A mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Human Molecular Genetics*, *26*(22), 4506–4518.
- de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., 2nd, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M., & Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(1), 322–327.
- Descamps, A., Rousset, C., Millan, M. J., Spedding, M., Delagrangé, P., & Cespuoglio, R. (2009). Influence of the novel antidepressant and melatonin agonist/serotonin_{2C} receptor antagonist, agomelatine, on the rat sleep–wake cycle architecture. *Psychopharmacology*, *205*(1), 175–175.
- Di, W. L., Kadva, A., Johnston, A., & Silman, R. (1997). Variable bioavailability of oral melatonin. *The New England Journal of Medicine*, *336*(14), 1028–1029.
- Dittrich, L., Heiss, J. E., Warriar, D. R., Perez, X. A., Quik, M., & Kilduff, T. S. (2012). Cortical nNOS neurons co-express the NK1 receptor and are depolarized by Substance P in multiple mammalian species. *Frontiers in Neural Circuits*, *6*, 31.
- Dittrich, L., Morairty, S. R., Warriar, D. R., & Kilduff, T. S. (2015). Homeostatic sleep pressure is the primary factor for activation of cortical nNOS/NK1 neurons. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *40*(3), 632–639.
- Dollins, A. B., Zhdanova, I. V., Wurtman, R. J., Lynch, H. J., & Deng, M. H. (1994). Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(5), 1824–1828.

- Dortch-Carnes, J., & Tosini, G. (2013). Melatonin receptor agonist-induced reduction of SNP-released nitric oxide and cGMP production in isolated human non-pigmented ciliary epithelial cells. *Experimental Eye Research*, *107*, 1–10.
- Duncan, I. D., Lunn, K. F., Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., & Brignolo-Holmes, L. (1992). The *taiep* rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *Journal of Neurocytology*, *21*(12), 870–884.
- Eguibar, J. R., Cortés, M. D. C., & Lara-Lozano, M. (2010). Presynaptic dopaminergic agonists increased gripping-generated immobility episodes in the myelin-mutant *taiep* rat. *Neuroscience Letters*, *483*(3), 189–192.
- Eguibar, J. R., Cortés, M. D. C., Valencia, J., & Arias-Montaña, J. A. (2006). Alpha2 adrenoceptors are involved in the regulation of the gripping-induced immobility episodes in *taiep* rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, *60*(5), 362–370.
- Espinoza, P. K. G. (2019). *Estudio del sistema orexinérgico en un modelo animal de narcolepsia: la rata TAIEP*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Flynn-Evans, E. E., Shekleton, J. A., Miller, B., Epstein, L. J., Kirsch, D., Brogna, L. A., Burke, L. M., Bremer, E., Murray, J. M., Gehrman, P., Rajaratnam, S. M. W., & Lockley, S. W. (2017). Circadian phase and phase angle disorders in primary insomnia. *Sleep*, *40*(12).
- Fruhstorfer, B., Mignot, E., Bowersox, S., Nishino, S., Dement, W. C., & Guilleminault, C. (1989). Canine narcolepsy is associated with an elevated number of alpha 2-receptors in the locus coeruleus. *Brain Research*, *500*(1–2), 209–214.
- Funk, C. M., Peelman, K., Bellesi, M., Marshall, W., Cirelli, C., & Tononi, G. (2017). Role of somatostatin-positive cortical interneurons in the generation of sleep slow waves. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *37*(38), 9132–9148.

- Garduno-Robles, A., Alata, M., Piazza, V., Cortes, C., Eguibar, J. R., Pantano, S., & Hernandez, V. H. (2020). MRI features in a rat model of H-ABC tubulinopathy. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 555.
- Gerashchenko, D., Wisor, J. P., Burns, D., Reh, R. K., Shiromani, P. J., Sakurai, T., de la Iglesia, H. O., & Kilduff, T. S. (2008). Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(29), 10227–10232.
- Gerdin, M. J., Masana, M. I., Ren, D., Miller, R. J., & Dubocovich, M. L. (2003). Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *304*(3), 931–939.
- Gerdin, Matthew J., Masana, M. I., Rivera-Bermúdez, M. A., Hudson, R. L., Earnest, D. J., Gillette, M. U., & Dubocovich, M. L. (2004). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *18*(14), 1646–1656.
- Gobbi, G., & Comai, S. (2019). Differential function of melatonin MT1 and MT2 receptors in REM and NREM sleep. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 87.
- Gompf, H. S., & Anaclet, C. (2020). The neuroanatomy and neurochemistry of sleep-wake control. *Current Opinion in Physiology*, *15*, 143–151.
- Gong, H., Szymusiak, R., King, J., Steininger, T., & McGinty, D. (2000). Sleep-related c-Fos protein expression in the preoptic hypothalamus: effects of ambient warming. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *279*(6), R2079-88.

- Gvilia, I., Xu, F., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2006). Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(37), 9426–9433.
- Hardeland, R. (2017). Taxon- and site-specific melatonin catabolism. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), 2015.
- Hassani, O. K., Lee, M. G., Henny, P., & Jones, B. E. (2009). Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(38), 11828–11840.
- Hayakawa, T., Uchiyama, M., Kamei, Y., Shibui, K., Tagaya, H., Asada, T., Okawa, M., Urata, J., & Takahashi, K. (2005). Clinical analyses of sighted patients with non-24-hour sleep-wake syndrome: a study of 57 consecutively diagnosed cases. *Sleep*, 28(8), 945–952.
- Heyde, I., & Oster, H. (2019). Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. *Scientific Reports*, 9(1), 20114.
- Holmes, S. W., & Sugden, D. (1982). Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 76(1), 95–101.
- Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Riboni, L., & Vega-SaenzdeMiera, E. C. (1989). Sprague Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Laboratory Animal Science*, 39(3), 226–228.
- Iwata, M., & Kaneko, K. (2020). Non-24-hour sleep-wake disorder successfully treated with the combination of ramelteon and suvorexant in a case of autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology Reports*, 40(4), 383–387.
- Izuhara, M., Kawano, K., Otsuki, K., Hashioka, S., & Inagaki, M. (2021). Prompt improvement of difficulty with sleep initiation and waking up in the morning and daytime somnolence by combination therapy of suvorexant and ramelteon in

delayed sleep-wake phase disorder: a case series of three patients. *Sleep Medicine*, 80, 100–104.

Jang, S. H., & Kwon, H. G. (2015). The ascending reticular activating system from pontine reticular formation to the hypothalamus in the human brain: a diffusion tensor imaging study. *Neuroscience Letters*, 590, 58–61.

Jones, B. E. (2020). Arousal and sleep circuits. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 45(1), 6–20.

K Pavlova, M., & Latreille, V. (2019). Sleep disorders. *The American Journal of Medicine*, 132(3), 292–299.

Kamal, M., Gbahou, F., Guillaume, J.-L., Daulat, A. M., Benleulmi-Chaachoua, A., Luka, M., Chen, P., Kalbasi Anaraki, D., Baroncini, M., Mannoury la Cour, C., Millan, M. J., Prevot, V., Delagrangé, P., & Jockers, R. (2015). Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT₂/5-HT_{2C} receptor heteromers. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11537–11546.

Klosen, P., Lapmanee, S., Schuster, C., Guardiola, B., Hicks, D., Pevet, P., & Felder-Schmittbuhl, M. P. (2019). MT₁ and MT₂ melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *Journal of Pineal Research*, 67(1), e12575.

Kroeger, D., Absi, G., Gagliardi, C., Bandaru, S. S., Madara, J. C., Ferrari, L. L., Arrigoni, E., Münzberg, H., Scammell, T. E., Saper, C. B., & Vetrivelan, R. (2018). Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nature Communications*, 9(1), 4129.

Lee, B. H., Hille, B., & Koh, D.-S. (2021). Serotonin modulates melatonin synthesis as an autocrine neurotransmitter in the pineal gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(43), e2113852118.

- Lee, S.-J., Jung, Y. H., Oh, S. Y., Yun, S. P., & Han, H. J. (2014). Melatonin enhances the human mesenchymal stem cells motility via melatonin receptor 2 coupling with Gαq in skin wound healing. *Journal of Pineal Research*, *57*(4), 393–407.
- Leon-Chavez, B. A., Aguilar-Alonso, P., Gonzalez-Barrios, J. A., Eguibar, J. R., Ugarte, A., Brambila, E., Ruiz-Arguelles, A., & Martinez-Fong, D. (2006). Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the *taiep* rat during its severe demyelination stage. *Brain Research*, *1121*(1), 221–230.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes¹. *Journal of the American Chemical Society*, *80*(10), 2587–2587.
- Li, S.-B., Damonte, V. M., Chen, C., Wang, G. X., Kebschull, J. M., Yamaguchi, H., Bian, W.-J., Purmann, C., Pattni, R., Urban, A. E., Mourrain, P., Kauer, J. A., Scherrer, G., & de Lecea, L. (2022). Hyperexcitable arousal circuits drive sleep instability during aging. *Science (New York, N.Y.)*, *375*(6583), eabh3021.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P. J., Nishino, S., & Mignot, E. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, *98*(3), 365–376.
- López-Canul, M., He, Q., Sasson, T., Ettaoussi, M., Gregorio, D. D., Ochoa-Sanchez, R., Catoire, H., Posa, L., Rouleau, G., Beaulieu, J. M., Comai, S., & Gobbi, G. (2024). Selective enhancement of REM sleep in male rats through activation of melatonin MT1 receptors located in the locus ceruleus norepinephrine neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *44*(29), e0914232024.
- Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(10), 3830–3842.

- Lu, Jun, Bjorkum, A. A., Xu, M., Gaus, S. E., Shiromani, P. J., & Saper, C. B. (2002). Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(11), 4568–4576.
- Ma, B., Chen, J., Mu, Y., Xue, B., Zhao, A., Wang, D., Chang, D., Pan, Y., & Liu, J. (2018). Proteomic analysis of rat serum revealed the effects of chronic sleep deprivation on metabolic, cardiovascular and nervous system. *PloS One*, 13(9), e0199237.
- Mackenzie, R. S., Melan, M. A., Passey, D. K., & Witt-Enderby, P. A. (2002). Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochemical Pharmacology*, 63(4), 587–595.
- Malkani, R. G., Abbott, S. M., Reid, K. J., & Zee, P. C. (2018). Diagnostic and treatment challenges of sighted non-24-hour sleep-wake disorder. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 14(04), 603–613.
- Mendelson, W. B., Gillin, J. C., Dawson, S. D., Lewy, A. J., & Wyatt, R. J. (1980). Effects of melatonin and propranolol on sleep of the rat. *Brain Research*, 201(1), 240–244.
- Mendelson, Wallace B. (2002). Melatonin microinjection into the medial preoptic area increases sleep in the rat. *Life Sciences*, 71(17), 2067–2070.
- Mini, L. J., Wang-Weigand, S., & Zhang, J. (2007). Self-reported efficacy and tolerability of ramelteon 8 mg in older adults experiencing severe sleep-onset difficulty. *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*, 5(3), 177–184.
- Miyamoto, M., Nishikawa, H., Doken, Y., Hirai, K., Uchikawa, O., & Ohkawa, S. (2004). The sleep-promoting action of ramelteon (TAK-375) in freely moving cats. *Sleep*, 27(7), 1319–1325.

- Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), 445–462.
- Moroni, I., & Garcia-Bennett, A. E. (2021). Effects of absorption kinetics on the catabolism of melatonin released from CAP-coated mesoporous silica drug delivery vehicles. *Pharmaceutics*, 13(9), 1436.
- Moruzzi, G., & Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1(4), 455–473.
- Nikolaev, G., Robeva, R., & Konakchieva, R. (2021). Membrane melatonin receptors activated cell signaling in physiology and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 471.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauchere, J. L., Delagrangé, P., Canet, E., & Boutin, J. A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31311–31317.
- Nosjean, O., Nicolas, J. P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E., & Boutin, J. A. (2001). Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol [Internet]*, 61(11), 1369–1379.
- Omori, Y., Kanbayashi, T., Sagawa, Y., Imanishi, A., Tsutsui, K., Takahashi, Y., Takeshima, M., Takaki, M., Nishino, S., & Shimizu, T. (2018). Low dose of aripiprazole advanced sleep rhythm and reduced nocturnal sleep time in the patients with delayed sleep phase syndrome: an open-labeled clinical observation. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 14, 1281–1286.
- Paul, P., Lahaye, C., Delagrangé, P., Nicolas, J. P., Canet, E., & Boutin, J. A. (1999). Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(1), 334–340.

- Preitner, N., Damiola, F., Zakany, J., Duboule, D., & Albrecht, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, *110*, 251–260.
- Prieto, G. J., Urbá-Holmgren, R., & Holmgren, B. (1991). Sleep and EEG disturbances in a rat neurological mutant (*taiep*) with immobility episodes: a model of narcolepsy-cataplexy. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *79*(2), 141–147.
- Quera-Salva, M. A., Kilic-Huck, U., & Vecchierini, M. F. (2021). Members of the MEL consensus group of the SFRMS. Melatonin (MEL) and its use in circadian rhythm sleep-wake disorders: Recommendations of the French Medical and Research Sleep Society (SFRMS). *Rev Neurol*, *177*(3), 235–244.
- Reid, M. S., Tafti, M., Nishino, S., Sampathkumaran, R., Siegel, J. M., & Mignot, E. (1996). Local administration of dopaminergic drugs into the ventral tegmental area modulates cataplexy in the narcoleptic canine. *Brain Research*, *733*(1), 83–100.
- Rodenbeck, A., Huether, G., Rùther, E., & Hajak, G. (1998). Altered circadian melatonin secretion patterns in relation to sleep in patients with chronic sleep-wake rhythm disorders. *Journal of Pineal Research*, *25*(4), 201–210.
- Rodríguez-Labrada, R., Galicia-Polo, L., Canales-Ochoa, N., Voss, U., Tuin, I., Peña-Acosta, A., Estupiñán-Rodríguez, A., Medrano-Montero, J., Vázquez-Mojena, Y., González-Zaldivar, Y., Auburger, G., & Velázquez-Pérez, L. (2019). Sleep spindles and K-complex activities are decreased in spinocerebellar ataxia type 2: relationship to memory and motor performances. *Sleep Medicine*, *60*, 188–196.
- Ruan, W., Yuan, X., & Eltzhig, H. K. (2021). Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *20*(4), 287–307.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., ... Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a

family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(5), 1 page following 696.

Sapin, E., Lapray, D., Béroud, A., Goutagny, R., Léger, L., Ravassard, P., Clément, O., Hanriot, L., Fort, P., & Luppi, P.-H. (2009). Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PloS One*, 4(1), e4272.

Sarasso, S., Zubler, F., Pigorini, A., Sartori, I., Castana, L., & Nobili, L. (2021). Thalamic and neocortical differences in the relationship between the time course of delta and sigma power during NREM sleep in humans. *Journal of Sleep Research*, 30(3), e13166.

Sateia, M. J. (2014). International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. *Chest*, 146(5), 1387–1394.

Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527–537.

Scammell, T. E., Arrigoni, E., & Lipton, J. O. (2017). Neural circuitry of wakefulness and sleep. *Neuron*, 93(4), 747–765.

Sharma, R., Sahota, P., & Thakkar, M. M. (2018). Melatonin promotes sleep in mice by inhibiting orexin neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *Journal of Pineal Research*, 65(2), e12498.

Sher, S., Green, A., Khatib, S., & Dagan, Y. (2021). The possible role of endozepines in Sleep Regulation and biomarker of process S of the Borbély sleep model. *Chronobiology International*, 38(1), 122–128.

Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F., & Saper, C. B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons

in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(12), 4705–4721.

Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W., & Saper, C. B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5246), 216–219.

Shiu, S., Pang, B., Tam, C. W., & Yao, K.-M. (2010). Signal transduction of receptor-mediated antiproliferative action of melatonin on human prostate epithelial cells involves dual activation of G α (s) and G α (q) proteins: Melatonin signaling in cell proliferation. *J Pineal Res [Internet]*, 49(3), 301–311.

Sletten, T. L., Magee, M., Murray, J. M., Gordon, C. J., Lovato, N., Kennaway, D. J., Gwini, S. M., Bartlett, D. J., Lockley, S. W., Lack, L. C., Grunstein, R. R., Rajaratnam, S. M. W., & Delayed Sleep on Melatonin (DeSoM) Study Group. (2018). Efficacy of melatonin with behavioural sleep-wake scheduling for delayed sleep-wake phase disorder: A double-blind, randomised clinical trial. *PLoS Medicine*, 15(6), e1002587.

Song, J., Carson, J. H., Barbarese, E., Li, F.-Y., & Duncan, I. D. (2003). RNA transport in oligodendrocytes from the *taiep* mutant rat. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 24(4), 926–938.

Su, Y.-T., Gu, M.-Y., Chu, X., Feng, X., & Yu, Y.-Q. (2018). Whole-brain mapping of direct inputs to and axonal projections from GABAergic neurons in the parafacial zone. *Neuroscience Bulletin*, 34(3), 485–496.

Sun, S.-Y., & Chen, G.-H. (2022). Treatment of circadian rhythm sleep-wake disorders. *Current Neuropharmacology*, 20(6), 1022–1034.

Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews. Genetics*, 18(3), 164–179.

- Takeshima, M., Shimizu, T., Ishikawa, H., & Kanbayashi, T. (2020). Ramelteon for delayed sleep-wake phase disorder: A case report. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience: The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 18(1), 167–169.
- Thannickal, T. C., Moore, R. Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., & Siegel, J. M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27(3), 469–474.
- Thorpy, M. J., Siegel, J. M., & Dauvilliers, Y. (2024). REM sleep in narcolepsy. *Sleep Medicine Reviews*, 77(101976), 101976.
- Tononi, G., & Cirelli, C. (2014). Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*, 81(1), 12–34.
- Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., & Fougere, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current Neuropharmacology*, 15(3), 434–443.
- Tosches, M. A., Bucher, D., Vopalensky, P., & Arendt, D. (2014). Melatonin signaling controls circadian swimming behavior in marine zooplankton. *Cell*, 159(1), 46–57.
- Uschakov, A., Gong, H., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2007). Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience*, 150(1), 104–120.
- Van Dort, C. J., Zachs, D. P., Kenny, J. D., Zheng, S., Goldblum, R. R., Gelwan, N. A., Ramos, D. M., Nolan, M. A., Wang, K., Weng, F.-J., Lin, Y., Wilson, M. A., & Brown, E. N. (2015). Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2), 584–589.

- Wade, A. G., Crawford, G., Ford, I., McConnachie, A., Nir, T., Laudon, M., & Zisapel, N. (2011). Prolonged release melatonin in the treatment of primary insomnia: evaluation of the age cut-off for short- and long-term response. *Current Medical Research and Opinion*, 27(1), 87–98.
- Walter, A., van der Spek, L., Hardy, E., Bemelmans, A. P., Rouach, N., & Rancillac, A. (2019). Structural and functional connections between the median and the ventrolateral preoptic nucleus. *Brain Structure & Function*, 224(9), 3045–3057.
- Wang, Q., Zhu, D., Ping, S., Li, C., Pang, K., & Zhu, S. (2020). Melatonin recovers sleep phase delayed by MK-801 through the melatonin MT2 receptor- Ca²⁺-CaMKII-CREB pathway in the ventrolateral preoptic nucleus. *J Pineal Res*, 69(3).
- Wang, Y., Chen, Y., Tong, Y., Li, C., Li, J., & Wang, X. (2022). Heterogeneity in estimates of incidence and prevalence of narcolepsy: A systematic review and meta-regression analysis. *Neuroepidemiology*, 56(5), 319–332.
- Wu, M. F., Gulyani, S. A., Yau, E., Mignot, E., Phan, B., & Siegel, J. M. (1999). Locus coeruleus neurons: cessation of activity during cataplexy. *Neuroscience*, 91(4), 1389–1399.
- Xu, H., Zhang, C., Qian, Y., Zou, J., Li, X., Liu, Y., Zhu, H., Meng, L., Liu, S., Zhang, W., Yi, H., Guan, J., Chen, Z., & Yin, S. (2020). Efficacy of melatonin for sleep disturbance in middle-aged primary insomnia: a double-blind, randomised clinical trial. *Sleep Medicine*, 76, 113–119.
- Xu, M., Chung, S., Zhang, S., Zhong, P., Ma, C., Chang, W.-C., Weissbourd, B., Sakai, N., Luo, L., Nishino, S., & Dan, Y. (2015). Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1641–1647.
- Yang, H. J., Kim, M. J., Kim, S. S., & Cho, Y.-W. (2021). Melatonin modulates nitric oxide-regulated WNK-SPAK/OSR1-NKCC1 signaling in dorsal raphe nucleus of rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the*

Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, 25(5), 449–457.

Yukuhiro, N., Kimura, H., Nishikawa, H., Ohkawa, S., Yoshikubo, S.-I., & Miyamoto, M. (2004). Effects of ramelteon (TAK-375) on nocturnal sleep in freely moving monkeys. *Brain Research*, 1027(1–2), 59–66.

Zammit, G., Erman, M., Wang-Weigand, S., Sainati, S., Zhang, J., & Roth, T. (2007). Evaluation of the efficacy and safety of ramelteon in subjects with chronic insomnia. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 3(5), 495–504.

Zetner, D., Andersen, L. P. K., Alder, R., Jessen, M. L., Tolstrup, A., & Rosenberg, J. (2021). Pharmacokinetics and safety of intravenous, intravesical, rectal, transdermal, and vaginal melatonin in healthy female volunteers: A cross-over study. *Pharmacology*, 106(3–4), 169–176.

Zhang, C., Huang, L., & Xu, M. (2022). Dopamine control of REM sleep and cataplexy. *Neuroscience Bulletin*, 38(12), 1617–1619.

Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16219–16224.

Zisapel, N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation: Melatonin in human sleep and circadian rhythms. *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3190–3199.

Zisapel, N., Lemoine, Garfinkel, D., Laudon, M., & Nir. (2011). Prolonged-release melatonin for insomnia – an open-label long-term study of efficacy, safety, and withdrawal. *Therapeutics and clinical risk management*, 301.