

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA



VNIVERSITAT^Ö VALÈNCIA

ALTERACIONES DEL RITMO DEL SUEÑO EN MODELOS
ANIMALES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Tesis doctoral

Presentada por: Nicolás Peñaranda Sarmiento

Dirigida por: Dra. Carmina Montoliu
Dr. Vicente Felipo
Dra. María Ángeles Lloret

DOCTORADO EN MEDICINA
2016

FUNDACIÓN INVESTIGACIÓN CLÍNICO DE VALENCIA-INCLIVA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE
UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Alteraciones del ritmo del sueño en modelos animales de encefalopatía hepática

Tesis Doctoral

Presentada por: Nicolás Peñaranda Sarmiento

Dirigida por: Dra. Carmina Montoliu
Dr. Vicente Felipo
Dra. María Ángeles Lloret

SEPTIEMBRE, 2016

La Dra. **Carmina Montoliu**, Investigadora del INCLIVA y Profesora del Dpto. De Patología (Área de Histología, Universidad de Valencia),

El Dr. **Vicente Felipo**, Investigador y Jefe del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

La Dra. **María Ángeles Lloret**, Médico especialista del servicio de Neurofisiología Clínica, Hospital Clínico Universitario de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D. Nicolás Peñaranda Sarmiento, titulada “Alteraciones del ritmo del sueño en modelos animales de encefalopatía hepática”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, a Septiembre del 2016.

Fdo. C. Montoliu Felix

Fdo. V. Felipo Orts

Fdo. M.A. Lloret Alcaniz

A mi esposa Mónica y mi hijo Juan

Agradecimientos

Una vez acabada mi tesis doctoral es imposible no pararse un momento a mirar atrás, recapitular y pensar cómo he llegado hasta aquí, y dar las gracias a todas las personas que han hecho posible, de una manera u otra, el culminar este importante proyecto.

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.

Si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de su autor, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación de todas aquellas personas que directa o indirectamente han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Todo esto nunca hubiese sido posible sin el amparo incondicional de mi familia, sin el amor y la paciencia de Mónica y sin el estímulo constante de mi hijo Juan. Esto es también vuestro premio.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que les agradezco el haberme brindado todo su apoyo, colaboración, ánimo y amistad.

Para ellos, muchas gracias.

Índice

I. Introducción	2
1. Encefalopatía hepática	2
2. Alteraciones neuropsiquiátricas en encefalopatía hepática.	4
2.1. Alteraciones cognitivas en encefalopatía hepática.....	5
2.2. Alteraciones motoras en encefalopatía hepática.	6
2.3 Otras alteraciones neuropsiquiátricas.....	8
3. Modelos animales de encefalopatía hepática.	8
3.1 Modelo de EH por anastomosis porta-cava (PCS).....	8
3.2 Modelo de EH por Ligadura Biliar (BDL).....	9
3.3 Modelo de hiperamonemia sin fallo hepático.	9
4. Bases neurofisiológicas.	10
5. Fisiología del sueño.	12
6. Neurobiología del sueño	15
6.1 Vigilia.....	16
6.2 Sueño NREM.	20
6.3 Sueño REM.	22
7. Sueño y encefalopatía hepática.	24
II. Objetivos	27
III. Metodología	30
1. Animales	30
1.1 Modelo de hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático.	30
1.2 Modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porta-cava (PCS).	31
1.3 Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar (BDL, Bile duct-ligation).	31
1.4 Modelo de intervención simulada control (SHAM).	32
1.5 Modelos de encefalopatía hepática con administración de opciones terapéuticas (Sildenafil/Zolpidem).	32
1.6 Implantación de electrodos para electroencefalograma (EEG).....	33
2. Registro electroencefalográfico	34
3. Análisis cualitativo de registro electroencefalográfico.	35
4. Analisis cuantitativo del registro electroencefalografico	36
5. Análisis estadísticos	36
IV. Resultados	38
1. Modelos animales PCS frente a modelos SHAM	38
2. Modelos BDL de 6 y 10 semanas frente a modelos SHAM de 6 y 10 semanas	43
3. Modelos SHAM y BDL de 6 semanas frente a modelos SHAM y BDL hiperamonemicas .	51
4. Modelos PCS frente modelos BDL de 6 y 10 semanas	58
5. Modelos SHAM y PCS tratadas con sildenafil frente a modelos SHAM y PCS no tratadas con sildenafil	64
6. Modelo SHAM y PCS tratados con zolpidem frente modelos SHAM y PCS no tratados con zolpidem.....	72
V. Discusión	83
VI. Conclusiones	96
VII. Bibliografía	99

Abreviaturas

Ach	Hormona anti-diurética
BDL	(<i>Bile duct-ligation</i>) Ligadura biliar
CV-s	Ciclo vigilia-sueño
EEG	Electroencefalograma
EH	Encefalopatía hepática
EHM	Encefalopatía hepática mínima
EMG	Electromiograma
EOG	Electroculograma
LTP	Potenciación a largo plazo
HA	Hiperamonemia
MDF	Frecuencia media dominante
NA	Noradrenalina
NREM	(<i>Non rapid eye movement</i>) No movimientos oculares rápidos
PB	Prosencefalo basal
PCS	(<i>Porto-caval shunt</i>) Anastomosis porto-cava
PGOs	Ponto-geniculo occipital
PHES	(<i>Psychometric hepatic encephalopathy score</i>) Escala psicométrica para Encefalopatía hepática
REM	(<i>Rapid eye movement</i>) Movimientos oculares rápidos
RPC	Núcleo reticular caudal del puente
RPO	Núcleo reticular oral del puente
SHAM	(<i>Straw HAndling Model</i>) Modelo de intervención simulada control
δ	Banda delta
θ	Banda theta
α	Banda alfa
β	Banda beta

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

1. Encefalopatía hepática.

La encefalopatía hepática un síndrome neuropsiquiátrico complejo que refleja una alteración funcional del sistema nervioso central, que se presenta en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas o agudas. La encefalopatía hepática se define como una alteración de la función del sistema nervioso central subsiguiente a un fallo hepático y puede progresar en diferentes estadios hasta el coma (1, 2). Se clasifica en 3 tipos (1):

1. Tipo A, o encefalopatía hepática aguda, suele ocurrir en el marco de un fallo hepático fulminante con necrosis masiva del hígado y una rápida progresión de los síntomas. Entre las causas cabe destacar las hepatitis virales agudas, intoxicación por paracetamol y reacciones idiosincrásicas a fármacos. El grado de mortalidad en la encefalopatía hepática aguda es muy elevado y se debe frecuentemente a un aumento de la presión intracraneal como consecuencia de un edema cerebral.
2. Tipo B, o encefalopatía hepática crónica, por derivación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Existen derivaciones porto-sistémicas espontáneas, como la causada por la obstrucción de la vena porta extra-hepática. Es una causa común de hipertensión portal en niños (2). Estos pacientes presentan flujo sanguíneo hepático reducido, concentraciones de amonio en sangre aumentadas y en ocasiones anastomosis porta-cava espontánea.

3. Tipo C, o encefalopatía hepática crónica, asociada a cirrosis hepática e hipertensión portal. Es la más frecuente. También genera derivaciones porto-sistémicas como consecuencia de enfermedades crónicas del hígado, generalmente cirrosis, con una apreciable desviación de la sangre portal a la circulación sistémica (encefalopatía porto-sistémica). Se pueden producir episodios de encefalopatía hepática clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de encefalopatía hepática son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es eliminado. La desviación porto-sistémica también se realiza quirúrgicamente para tratar problemas como la hemorragia digestiva secundaria a ruptura de várices esofagogástricas, una complicación muy frecuente y severa de los pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal.

La encefalopatía hepática es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se estima que 3 años después del primer episodio de encefalopatía clínica la mortalidad es del 60-80%.

Las encefalopatías hepáticas de tipo B y C pueden ser clínicamente evidentes (encefalopatía hepática clínica) o no (encefalopatía hepática mínima (EHM)). La encefalopatía hepática clínica se clasifica en tres formas, según el patrón temporal de su manifestación: ocasional, recurrente y persistente. La EH ocasional está caracterizada por un episodio de alteración neuropsiquiátrica debido a un factor desencadenante y generalmente no deja huellas en los pacientes en términos de alteraciones en los test psicométricos y/o en el electroencefalograma (EEG). La EH recurrente se caracteriza por episodios múltiples de encefalopatía intercalados entre periodos en los que la situación neurológica del paciente es aparentemente normal. La forma persistente se caracteriza por alteraciones neuropsiquiátricas evidentes y continuas, aunque de duración variable en el tiempo, y

aparece sin una clara causa desencadenante.

Además de los 3 tipos de EH clínica mencionados, existe una forma más leve denominada EHM. Pacientes sin signos evidentes de EH clínica pueden presentar diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) y motores, que no son detectables en un examen neurológico rutinario, pero se ponen de manifiesto cuando se realizan tests psicométricos o neurofisiológicos adecuados (3).

Este tipo de EH se denominaba encefalopatía hepática subclínica o latente, términos que hoy en día han sido reemplazados por EHM., la cual disminuye la calidad de vida de los pacientes, aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico, y predispone a sufrir EH clínica. Se han utilizado diversas baterías de pruebas psicométricas para detectar y valorar la EH mínima. Se ha llegado a un consenso para utilizar los mismos tests en todos los hospitales, seleccionando como batería de referencia, la denominada PHES (*Psychometric hepatic encephalopathy score*).

2. Alteraciones neuropsiquiátricas en encefalopatía hepática.

La encefalopatía hepática crónica se desarrolla lentamente y sus síntomas varían desde ligeros déficits de atención y cambios en la personalidad en la encefalopatía hepática mínima, a enlentecimiento psicomotor, falta de atención y síntomas extrapiramidales como hipomimia (falta de expresión facial) y bradiquinesia en el grado I de encefalopatía hepática, desorientación y comportamiento extraño en el grado II, acabando finalmente en estupor y coma en los grados III y IV (4). Los signos más tempranos suelen ser alteraciones en el sueño y cambios en el

comportamiento, que no son obvios para el médico que examina al paciente pero sí para los familiares y amigos de éste (5).

El espectro clínico de la encefalopatía hepática es muy amplio, por lo que su diagnóstico puede ser difícil dado que no existe un síntoma o examen de laboratorio específico para su diagnóstico.

La gravedad de la encefalopatía hepática clínica se clasifica en 4 grados según las manifestaciones neuropsicológicas. En la Tabla 1 se presentan los criterios de West–Haven para la estadificación del grado de encefalopatía en pacientes con encefalopatía hepática clínica (6).

2.1. Alteraciones cognitivas en encefalopatía hepática.

Las alteraciones cognitivas comienzan con falta de concentración y de atención, así como con una disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con encefalopatía hepática presentan un descenso continuo en la atención acompañado de un descenso en el estado de alerta desde el grado II al grado III finalizando en coma (4). Incluso los pacientes que parecen no estar clínicamente afectados manifiestan distintos déficits de atención en los tests psicométricos, indicando una disfunción de los tres subsistemas que cooperan en la atención: vigilia (capacidad para mantener el estado de alerta), orientación y funciones ejecutivas (como hacer planes, detección de errores, resolución de conflictos, etc.).

Tabla 1. Criterios de West Haven para la estadificación del estado mental en encefalopatía hepática clínica.

<i>Grados</i>	<i>Sintomatología</i>
0	Sin anormalidad detectada.
1	Leve falta de atención e incapacidad para mantenerla, euforia, ansiedad. Dificultad para realizar suma o sustracción de números sencillos.
2	Letargo, apatía, desorientación en tiempo y espacio. Cambios obvios de la personalidad.
3	Somnolencia a semiestupor, pero con respuesta a estímulos. Confusión. Desorientación importante.
4	Coma. Sin posibilidad de realizar pruebas de función mental.

En fases más avanzadas la falta de atención se agudiza, de forma que cuando se formula una pregunta a un paciente, frecuentemente hay que repetir la cuestión y las repuestas son lentas y a menudo carentes de sentido (4).

2.2. Alteraciones motoras en encefalopatía hepática.

En pacientes con encefalopatía hepática crónica se presentan frecuentemente alteraciones en la actividad y coordinación motoras (Tabla 2) (7).

Los trastornos del movimiento (8) pueden ser debidos a alteraciones de la vía cortico-espinal, circuitos de los ganglios basales y/o del cerebelo. En los pacientes con encefalopatía hepática crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los tres niveles de

organización.

Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un mal funcionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales) se han descrito en pacientes con encefalopatía hepática mínima y cirrosis hepática compensada (9). La presencia de alteraciones motoras extrapiramidales predice el desarrollo de encefalopatía hepática clínica y los signos como la incoordinación, ataxia o asterixis, avanzan a medida que avanza la enfermedad, reduciendo la calidad de vida (9).

Tabla 2. Alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática (clasificación West-Haven).

<i>Grado</i>	<i>Sintomatología</i>
0	Cambios sutiles en pruebas de conexión numérica o en pruebas psicométricas.
1	Temblor, incoordinación, apraxia ^a .
2	Asterixis ^b , lenguaje lento o incomprensible, ataxia ^c .
3	Reflejos hipoactivos, nistagmo ^d , rigidez muscular y clonus.
4	Postura descerebrada y dilatación pupilar, reflejo oculocefálico, ausencia de respuesta a estímulos en estadios avanzados.

- a. Trastorno de la ejecución del movimiento aprendido que no puede ser explicado como consecuencia de debilidad muscular, pérdida sensorial o falta de comprensión o atención a las órdenes verbales*
- b. Temblor de las manos en forma de aleteo.*
- c. Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares.*
- d. Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular, que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos.*

Las alteraciones de la coordinación motora (cerebelosas) están presentes en pacientes con encefalopatía hepática de grado I y II, y las alteraciones de la vía cortico-espinal en pacientes desde el grado I al IV de encefalopatía hepática (4).

2.3 Otras alteraciones neuropsiquiátricas.

Se ha descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija, amnesia, cambios en el temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (10).

Un 50% de los pacientes con cirrosis hepática presentan alteraciones del sueño caracterizadas por somnolencia durante el día, sobre todo a primeras horas, letargia y sopor, mientras que durante la noche la calidad del sueño está disminuida: duermen menos tiempo y el sueño está fragmentado, con múltiples despertares (11).

3. Modelos animales de encefalopatía hepática.

Para poder avanzar en el estudio de los mecanismos que causan la encefalopatía hepática (EH) y las posibles alternativas terapéuticas de la misma, se requiere el uso de modelos animales. Estos modelos reproducen muchas de las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en pacientes con encefalopatía hepática.

3.1 Modelo de EH por anastomosis porta-cava (PCS).

Este tipo de cirugía se ha utilizado en ratas, conejos, perros y cerdos. La cirugía consiste en suturar la vena porta, principal aporte sanguíneo al hígado, con la vena cava. De esta forma la

sangre que proviene del intestino no llega adecuadamente al hígado y la metabolización de sustancias tóxicas por el mismo se reduce notablemente. Entre estas sustancias se encuentra el amonio, cuyos niveles aumentan tras la anastomosis porta-cava, produciendo hiperamonemia.

Las ratas con anastomosis porta-cava (PCS) presentan alteraciones metabólicas como hiperamonemia, aumento de amonio y glutamina en cerebro y disminución de la utilización de glucosa en cerebro. También presentan alteraciones en ritmos circadianos, alteraciones motoras como hipoquinesia y alteraciones cognitivas como disminución de la memoria y la capacidad de aprendizaje.

3.2 Modelo de EH por Ligadura Biliar (BDL).

Consiste en obstruir el conducto biliar mediante una o varias ligaduras. Se impide totalmente el flujo de bilis al intestino.

Las ratas BDL presentan hiperamonemia (19), ictericia e hipertensión portal (20) fibrosis, translocación bacteriana y disfunción del sistema inmune (21-24). También presentan alteraciones cognitivas y motoras.

3.3 Modelo de hiperamonemia sin fallo hepático.

Este modelo se desarrolló a finales de los años 80 en nuestro laboratorio (35, 36). Consiste en administrar a las ratas una dieta que contiene acetato amónico (25 % p/p). Esto produce un estado de hiperamonemia crónica moderada en la que los niveles de amonio en sangre son aproximadamente el doble que en las ratas control.

El modelo de hiperamonemia sin fallo hepático reproduce muchas de las alteraciones presentes en la encefalopatía hepática y permite discernir qué alteraciones cerebrales y neurológicas son debidas a la hiperamonemia y cuales son debidas a otros factores asociados al fallo hepático.

Este modelo es sencillo y permite mantener hiperamonemia sostenida durante largos periodos de tiempo sin alterar la función hepática. Ha permitido la realización de estudios a largo plazo sobre la regulación del ciclo de la urea (37, 38), toxicidad del amonio (39, 40), alteración de los niveles de tubulina en cerebro (37, 41, 42) y de los niveles de ATP y otros metabolitos en hígado y cerebro (43). Este modelo se ha empleado también para estudiar el efecto de la hiperamonemia crónica sobre la función de vías de transducción de señales en cerebro in vivo (44), la potenciación a largo plazo o LTP (45) y sobre la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada (46).

4. Bases neurofisiológicas.

La actividad eléctrica cerebral es consecuencia de las corrientes iónicas generadas por los diversos procesos bioquímicos a nivel celular, y fue puesta de manifiesto tras los estudios del británico Richard Caton en 1875. Posteriormente en 1933, Hans Berger publicó los primeros resultados de sus mediciones en seres humanos y a partir de este momento, el registro de la actividad bioeléctrica cerebral a través del electroencefalograma experimentó un progresivo reconocimiento hasta llegar a ser totalmente aceptado como método de exploración de las funciones cerebrales en estados normales y patológicos.

La señal del electroencefalograma es generada básicamente por la suma de actividad

eléctrica de distintas poblaciones neuronales, con una modesta contribución de las células gliales. Se trata por tanto, de una estimación del comportamiento colectivo de los diversos grupos neuronales.

Dado que las neuronas son células excitables dotadas de propiedades eléctricas intrínsecas características, y que la abundante comunicación interneuronal esta mediada por procesos electroquímicos en la sinapsis, se deduce que estas neuronas llegan a generar potenciales eléctricos y magnéticos que pueden ser registrados a cierta distancia de sus fuentes de producción.

Los principales responsables de las ondas registradas en el electroencefalograma son los potenciales postsinápticos, dado que estos poseen una mayor duración, y afectan a una superficie más extensa de la membrana, haciendo posible su suma, tanto a nivel temporal como espacial. El origen de las corrientes iónicas más importantes procede de cambios de conductividad de la membrana celular, causada tanto por procesos intrínsecos de la membrana, como por acciones sinápticas. El cambio neto resultante de estos procesos puede ser una corriente iónica tanto positiva como negativa que fluyen en el medio circundante, ya que no existen estructuras en las que se pueda producir una acumulación de carga.

Analizando la estructura de la corteza cerebral se observa que las neuronas piramidales de la corteza se encuentran alineadas de forma perpendicular a la superficie, con las dendritas alineadas en paralelo, formando capas de neuronas empalizadas. A escala macroscópica, la activación sináptica de un determinado grupo neuronal dispuesto de este modo puede tener lugar dentro de capas bien definidas y de forma sincronizada, provocando la activación de capas de dipolos. Los campos eléctricos resultantes pueden ser muy extensos si la actividad dentro de una determinada

población celular se produce de forma coherente, es decir, si la actividad neuronal esta sincronizada.

Una propiedad fundamental de la corteza cerebral es que grupos neuronales tienden a formar circuitos locales organizados en columnas corticales de unos 200-300 μm de sección. Existen diferentes sistemas de fibras que interconectan estas columnas corticales, sobre todo colaterales de los axones de las neuronas piramidales, ramificaciones de los axones terminales aferentes y colaterales de interneuronas, de los cuales una gran parte son inhibitorias. Esos sistemas se extienden en un intervalo de distancias del orden de unos cientos de micrómetros, lo que determina la longitud característica de las interacciones corticales.

En general, se puede afirmar que el potencial eléctrico cerebral generado por una determinada población neuronal representa un promedio espacial y temporal de los potenciales generados por distintas neuronas organizadas en esa columna. Ante una activación sináptica, se produce el flujo de corrientes extracelulares, que pueden ser descompuestas en componentes longitudinales, paralelos al eje mayor de la neurona, y componentes transversales, que discurren de forma perpendicular a este eje. La resultante de la combinación de estos campos radiales y tangenciales, es el campo bioeléctrico registrado por el electroencefalograma (47).

5. Fisiología del sueño.

El sueño es un estado biológico presente en animales y en seres humanos que se define en función de unas características comportamentales y fisiológicas.

Características comportamentales: Durante el sueño existe una ausencia o disminución de movimientos corporales voluntarios y se adopta una postura estereotipada de descanso, distinta en cada especie animal. Además existe una escasa respuesta a estímulos externos de baja intensidad que es reversible (a diferencia del coma).

Características fisiológicas: Gracias al desarrollo del electroencefalograma (EEG) en 1933 por el psiquiatra Hans Berger se empezó a registrar la actividad eléctrica cerebral en (48). En esta actividad eléctrica cerebral se identifican cuatro tipos de ritmos biológicos caracterizados por su frecuencia, topografía y reactividad: ritmo alfa (8-13 Hz., localizado en regiones posteriores, durante la vigilia tranquila y con los ojos cerrados), ritmo beta (más de 13 Hz, aparece en áreas frontales y en vigilia activa), ondas theta (4-7,5 Hz) y ondas delta ($\leq 3,5$ Hz).

En 1937, Loomis y cols. observaron cambios típicos en la actividad eléctrica cerebral durante el sueño y el incremento de la proporción de ondas lentas a medida que el sueño se profundiza, lo que permitió establecer la primera clasificación de las fases del sueño. Posteriormente en 1968, Rechtschaffen y Kales (49) establecieron los primeros criterios que facilitaron el estudio de los cambios de actividad eléctrica cerebral durante el sueño y que, desde entonces, se han venido empleado en los laboratorios de sueño. Mediante el registro de las señales biológicas fundamentales (EEG, EMG (electromiograma) y EOG (electroculograma)) se pueden identificar las fases de sueño y los episodios de vigilia.

Existen dos tipos de sueño bien diferenciados: el sueño de movimientos oculares rápidos, conocido como sueño REM (*Rapid Eye Movement*) o sueño paradójico, y el sueño de ondas lentas, también conocido como sueño NREM (*Non Rapid Eye Movement*), por contraposición al sueño REM (50).

El sueño de ondas lentas o NREM está constituido por la fase 1 (anteriormente denominado estadio 1-NREM), fase 2 (antes estadio 2-NREM) y fase 3 (anteriormente denominada fase 3 y 4 del sueño NREM o sueño profundo). En este estado del sueño se observa ausencia de movimientos oculares rápidos, quiescencia muscular y regularidad, y lentitud del pulso y de la respiración, con reducción de la presión sanguínea y menor umbral de alertamiento que el del sueño REM.

En la fase de sueño REM se observan movimientos rápidos de los ojos y de los pequeños músculos faciales. También es característico el incremento e irregularidad en pulso, respiración y presión sanguínea. Este estado se ha denominado paradójico, porque en él se observa la máxima relajación muscular y el máximo umbral de alertamiento, con un sueño ligero según criterios EEG (es decir, con una actividad cerebral más similar a la vigilia activa).

En un adulto sano, durante una noche de sueño normal, del 75 al 80% del total de sueño es sueño NREM que se reparte aproximadamente en un 5% para el estadio 1, 50% para el estadio 2 y 20% para el estadio 3. La duración del sueño REM ocupa entre el 20 y el 25% del total del sueño (51).

Al conciliar el sueño, se inicia en fase 1 de sueño NREM, que dura unos pocos minutos, seguido de la fase 2 y, posteriormente, pasamos a sueño profundo o lento, estadio 3. Este período de sueño NREM se sigue de un período REM, que en condiciones normales no debe aparecer hasta transcurridos 60 a 90 minutos del comienzo de la fase 1. Esta alternancia sueño NREM - sueño REM se sucede a lo largo de la noche formando ciclos; cada uno de ellos de aproximadamente 90-120 minutos de duración y se repiten de 4 a 6 veces a lo largo de una noche. La composición de estos ciclos varía durante la noche. En el primer tercio de la noche, predomina el sueño de ondas lentas y a medida que progresa el sueño, aumenta el porcentaje de sueño superficial y de sueño

REM (52).

Para evaluar el sueño como fisiológico es tan importante el mantenimiento de los porcentajes relativos de las distintas etapas como la valoración de la arquitectura del sueño. Esta arquitectura puede verse modificada por diferentes factores como la privación de sueño, la hora de inicio del sueño, la temperatura ambiental, el consumo de tóxicos (café, alcohol, nicotina, marihuana), la utilización de fármacos (benzodiazepinas, hipnóticos, antidepresivos) y por la existencia de algunos trastornos del sueño y trastornos médicos.

6. Neurobiología del sueño.

El sueño es no sólo un fenómeno activo, necesario y periódico sino que es también un proceso variado y complejo. En el ciclo vigilia-sueño (V-S) y ciclo circadiano, podemos distinguir, bioeléctrica y comportamentalmente numerosas fases. Tanto en el hombre como en estudios experimentales de modelos animales, siendo el gato, el animal más utilizado para este tipo de estudios, se sintetiza el ciclo V-S en tres fases: vigilia, sueño con movimientos oculares rápidos (sueño REM) y sueño sin movimientos oculares rápidos (sueño NREM). El paso de una fase a otra se hace de una forma secuencial habiéndose descrito fases de transición a las que cada día se concede mayor importancia (53).

Con los avances en investigación, hoy se conocen la mayor parte de las estructuras responsables de cada una de estas fases del ciclo V-S y se sabe que están anatómicamente conectadas entre sí. Estas interconexiones utilizan neurotransmisores que, en un ejercicio de excitación-inhibición, permiten la alternancia de las fases del ciclo. Un “reloj biológico” situado en

el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo establece el ritmo circadiano, que es adaptado a las 24 horas del día por reguladores externos, de los que es principal la retina por sus conexiones con este núcleo.

Desde la descripción del EEG por Berger (54), se consideró al trazado de pequeño voltaje y alta frecuencia, “EEG activado”, como característico de la vigilia y al trazado de ondas lentas de baja frecuencia y gran voltaje característico del sueño. Hoy se conoce que hay fases de sueño con EEG activado y para distinguirlo bioeléctricamente de la vigilia hemos de recurrir a otros parámetros. Experimentalmente, en la vigilia, junto a un EEG activado, observamos movimientos oculares relacionados con la visión, un tono muscular elevado, ninguna actividad fásica en el registro en el núcleo geniculado lateral y ritmo theta en hipocampo. Estos parámetros lo distinguen del sueño NREM en el que son infrecuentes y muy lentos los movimientos oculares, menor actividad en el EMG, ausencia de ritmo theta en hipocampo y actividad sincronizada, desde husos de sueño a ondas lentas de gran voltaje, en el EEG neocortical. En el sueño REM, el electroculograma (EOG) muestra movimientos oculares rápidos, ausencia de tono muscular, en el núcleo geniculado lateral observamos las puntas características de la actividad ponto-genículooccipital (PGOs), en el hipocampo ritmo theta muy marcado y en la neocorteza un EEG activado. Estos son los parámetros esenciales que permiten caracterizar, junto con la observación del comportamiento, las fases del ciclo V-S en el modelo animal.

6.1 Vigilia.

En 1918, Von Economo (55) describió que enfermos con una lesión del hipotálamo posterior por encefalitis, perdían vigilia y mostraban un aumento de somnolencia, señalando la importancia de esta estructura en el ciclo V-S para el mantenimiento del estado de vigilia. Bremer

(56) señaló que mientras en el encéfalo permanecía una actividad bioeléctrica (EEG activado), en la corteza cerebral se perdían los signos de vigilia y aparecían los de sueño (EEG sincronizado) en lesiones por encefalitis, atribuyendo esta pérdida de vigilia, a la supresión de los impulsos ascendentes de las vías sensitivas que penetraban en el tronco del encéfalo.

Moruzzi y Magoun publicaron en 1949 (57), que esos impulsos ascendentes activadores, responsables de la vigilia, que se suprimen en la corteza, no son los conducidos por las vías sensitivas al tálamo, sino que proceden de la formación reticular del tronco del encéfalo. Demostraron que la lesión en el mesencéfalo de las vías sensitivas ascendentes, no alteraba el estado de vigilia, mientras que la supresión de los impulsos ascendentes desde la formación reticular daba a lugar a un EEG sincronizado y un comportamiento de sueño. Estos autores concluyeron que el estado de vigilia es mantenido por el sistema reticular ascendente de activación que actúa sobre el tálamo y la corteza cerebral facilitando su funcionamiento. La formación reticular activadora del EEG, se prolongaba hasta el hipotálamo posterior y lateral (58-59). Igualmente se comprobó que la porción caudal del tegmento pontino era hipnagénica, pues su eliminación por una sección a nivel medial del puente o por lesiones del tegmento pontino caudal producía un aumento de vigilia, demostrada por una activación del EEG (60-61).

Por otra parte, no son de menos importancia el papel de las neuronas GABAérgicas que se encuentran en todas estas regiones, que modulan por una parte la actividad de estas estructuras y por otra, proyectan sobre centros nerviosos responsables de otras fases del ciclo V-S, contribuyendo a su inhibición durante la vigilia (62). Las estructuras del sistema reticular ascendente de activación proyectan sobre el tálamo, núcleo basal magnocelular del prosencéfalo basal (PB) y directamente sobre corteza cerebral. A su vez las neuronas colinérgicas (Ach) del prosencéfalo basal proyectan

de forma topográficamente organizada sobre la corteza cerebral. Para que se produzca la activación de la vigilia, con todos los matices plásticos que la caracterizan, es necesaria la acción sinérgica de todos, o varios, de estos neurotransmisores en el tálamo y corteza cerebral.

Todos estos neurotransmisores tienen una distribución específica en el tálamo. A través de ellos, el sistema reticular ascendente de activación permite que en el despertar y la vigilia, se procese la información que llega al tálamo, por las vías sensitivas o desde otras áreas corticales, y sea transmitida, de forma precisa a la corteza cerebral por la generación de potenciales de acción.

Del mismo modo, todo neurotransmisor tiene una distribución específica en cada área cortical, incluso en cada hemisferio cerebral, a veces complementaria. Se ha descrito una acción diferente para cada uno de estos neurotransmisores en la corteza cerebral. Así, la acetilcolina es necesaria para la activación cortical y para un correcto funcionamiento de los circuitos corticales en la vigilia y el sueño REM. La dopamina, que se libera abundantemente en la vigilia activa, modula los circuitos córtico-corticales, influye en los procesos integrativos de alto nivel cortical y es necesaria para organizar una respuesta motora adecuada. Las neuronas dopaminérgicas, inervan fundamentalmente la corteza motora y las áreas asociativas.

La noradrenalina (NA) es imprescindible para una vigilia bien organizada, se encuentra aumentada en el despertar y en los procesos atencionales. Es necesaria para la inducción de los factores de transcripción que ocurren en la vigilia. Recientemente Cirelli y Tononi (63) señalan que la NA durante la vigilia modula la transcripción neuronal para favorecer la potenciación sináptica, mientras que su inactividad durante el sueño juega un papel permisivo en el aumento de la síntesis de proteínas en el cerebro. Modula en resumen la atención, la vigilia y el aprendizaje.

La serotonina, que se distribuye en las áreas y en las capas de la corteza cerebral de una forma complementaria con la NA, es especialmente abundante en las cortezas visuales temporales y en la capa IV de la corteza cerebral. Aumenta en el despertar y se mantiene en la vigilia. En contraposición con el efecto fásico de la NA ejerce un efecto tónico sobre las neuronas corticales. Se le atribuye la modulación de la actividad neuronal cortical en los cambios de fase (64).

El aumento de liberación de aminas, acetilcolina y glutamato durante la vigilia suprime la actividad lenta de las neuronas corticales que pasan a descargar tónicamente con espigas. Así, la corteza cerebral puede procesar la información que recibe desde el tálamo y otras áreas corticales durante esta fase.

Una función importante de la corteza cerebral en la vigilia es modular por sus proyecciones desde la capa VI, la transmisión de los impulsos que llegan a los núcleos ventrales del tálamo desde vías sensitivas y otras estructuras subcorticales, y a los núcleos dorsales y laterales desde las cortezas asociativas.

Así, Nicolelis y Fanselow (65) señalan que la acción simultánea sobre el complejo ventral posterior talámico de los impulsos ascendentes, por la vía táctil somatosensorial, y descendentes, desde la corteza somatosensorial, optimiza la percepción de estímulos táctiles en la vigilia activa.

En resumen, tálamo y corteza, en la vigilia, modulados ambos por el sistema reticular ascendente de activación, son el sustrato adecuado y necesario para la percepción y para que tengan lugar los complejos procesos cognitivos.

6.2 Sueño NREM.

El sueño NREM se caracteriza bioeléctricamente por un EEG sincronizado, desde los husos de sueño de la fase 2, hasta las ondas lentas de gran voltaje de la fase 3. Eran los indicadores del sueño hasta que se descubrió el sueño REM. La fase 3 constituye el llamado sueño de ondas lentas, situado en las primeras 5 horas de la noche en el adulto joven, con una duración total de 80-90 minutos. Es el sueño imprescindible, el más constante en duración en los dormidores largos y cortos, el que primero se recupera después de la privación de sueño. Se le considera necesario para un rendimiento físico, intelectual y comportamental normal.

Fue también Von Economo (55) quien atribuyó a una estructura encefálica ser la responsable de organizar el sueño, al comprobar que enfermos con encefalitis que afectaba al hipotálamo anterior, cursaban con disminución de sueño. Este hecho también demostraba que el sueño era un proceso activo y no un fenómeno pasivo, consecuencia de la supresión de vigilia, como preconizarían los hallazgos de Bremer (66) y Moruzzi y Magoun (57).

Estos primeros hallazgos se vieron reforzados experimentalmente por Hess (67) que demostró en gatos un aumento de sueño comportamental y bioeléctrico, después de la estimulación de esta región del hipotálamo anterior y prosencéfalo basal. Poco después Nauta (68) demostró un aumento de la vigilia en ratas al desconectar el hipotálamo anterior del posterior, que atribuyó a la eliminación de la inhibición que las estructuras hipnogénicas situadas en el hipotálamo anterior y prosencéfalo basal ejercían sobre las estructuras vigilantígenas del hipotálamo posterior.

La extensión y naturaleza de estas estructuras hipnogénicas rostrales ha ido precisándose en

años sucesivos. Primero Serman y Clemente (69) demostraron disminución de sueño con amplias lesiones en el prosencéfalo basal. Después Madoz (70), en su tesis doctoral, precisó, usando pequeñas lesiones el área del prosencéfalo basal, una disminución de sueño, principalmente de sueño NREM (71).

También existen otras estructuras cerebrales que han sido implicadas en la organización del sueño NREM. Hess (67) había conseguido dormir a los gatos estimulando con baja frecuencia el tálamo. Posteriormente, Morrison y Dempsey (72) estimulando con baja frecuencia, describieron respuestas de reclutamiento en el sistema talamocortical, semejantes tanto en estructura, como en su distribución cortical a los husos de sueño. Estos mismos autores demostraron que la lesión del tálamo suprimía uno y otro de estos fenómenos bioeléctricos característicos de esta fase del ciclo V-S. Villablanca (73) demostró la carencia de husos de sueño en los animales atalámicos; y Steriade (74) la necesidad del núcleo reticular del tálamo como marcapasos de los husos de sueño. Por otra parte, Lugaresi et al. (75) demostraron que la lesión patognomónica del síndrome “insomnio familiar fatal” es la lesión del núcleo dorsomedial del tálamo y Marini y Mancina (76) que la lesión, en el animal, del núcleo dorsomedial del tálamo disminuye el sueño NREM.

Jouvet (77) demostró que en el animal decorticado no se daban ondas lentas, por lo que suponía que esta corteza era necesaria para el sueño de ondas lentas. Villablanca (73) extendió este papel a todas las estructuras telencefálicas. Hoy se conoce que los mecanismos bioeléctricos que se dan en el sueño NREM dependen esencialmente de las relaciones bidireccionales tálamo-corteza cerebral (78).

El tronco del encéfalo también participa activamente en la organización del sueño NREM.

Camacho et al. demostraron, haciendo pequeñas lesiones en todo el tronco del encéfalo, que eran las lesiones situadas en la mitad anterior del tegmento pontino caudal las que producían una disminución de la sincronización del EEG, atribuyendo a esta región, en consecuencia, un papel hipnogénico (61). También con pequeñas lesiones situadas en esta región del tegmento pontino caudal producían disminución del sueño de ondas lentas (79-80).

Todo ello confirma a la parte anterior del tegmento pontino caudal como una estructura importante en la extensa red neuronal responsable de la organización del sueño NREM (81).

6.3 Sueño REM.

El sueño REM se caracteriza bioeléctricamente, además de por los movimientos rápidos de los ojos, por un EEG de bajo voltaje y de alta frecuencia parecido al de la vigilia, atonía muscular, actividad ponto-genículo-occipital y marcado ritmo theta en hipocampo (82).

Diferentes estudios (83- 84) permitieron precisar las estructuras responsables de cada una de las manifestaciones bioeléctricas que caracterizan el sueño REM, como lo es el tegmento pontino dorsolateral y el núcleo reticular bulbar magnocelular en relación a la atonía; el núcleo pedunculopontino con la actividad ponto-geniculo-occipital; de la activación del EEG son responsables el núcleo pedunculopontino y la formación reticular pontomesodiencefálica y de los movimientos oculares rápidos, la formación reticular medial del puente ayudada por el núcleo periabducens y el núcleo prepósito del hipogloso, entre otras estructuras.

Baghdoyan et al (85) describieron que la estimulación química con un agonista colinérgico,

el carbacol, en el tegmento pontino y no en los tegmentos bulbar y mesencefálico, producía con corta latencia, sueño REM, confirmando la importancia del puente en estos mecanismos. También en los años ochenta (86) se demostró que durante el sueño REM había un aumento de la actividad de las neuronas de los grupos colinérgicos troncoencefálicos y del prosencéfalo basal, y una disminución de las de los grupos aminérgicos (noradrenérgicos y serotoninérgicos). Por lo tanto, la acetilcolina jugaba también un papel importante en el sueño REM, mientras que las aminas biógenas lo hacían sólo en la vigilia. En el sueño NREM disminuía ligeramente la actividad neuronal de ambos grupos celulares, aminérgicos y colinérgicos, en relación con la vigilia.

Se sabía que la estimulación colinérgica producía una corta latencia del sueño REM semejante al sueño REM fisiológico, por lo que a finales de los años ochenta y principio de los noventa varios grupos de investigadores trataron de investigar la localización en el tegmento pontino de la estructura responsable de la inducción de esta fase del ciclo V-S. Los primeros fueron Baghdoyan et al. (87) que, con inyecciones de 500 nl de una solución de carbacol, precisaron que el lugar se encontraba situado en el tegmento pontino dorsal y oral. Sin embargo, si se traslada al tronco del encéfalo las coordenadas estereotáxicas que dan en el trabajo el sitio de inducción del sueño REM, se encuentra situado en la parte ventral y anterior del núcleo reticular caudal del puente (RPC), introduciéndose en la parte caudal y ventral del núcleo reticular oral del puente (RPO). Dos trabajos posteriores, haciendo inyecciones de 200 nl de una solución de carbacol, sitúan la estructura inductora de sueño REM en el tegmento pontino oral, incluyendo la parte dorsal del RPO. El primero de ellos lo sitúa en el locus coeruleus α y en el perilocus coeruleus α , situados dorsales al RPO, estructuras ricas en su parte anterior en neuronas colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas (86). El otro (88) lo situó como un cilindro en la parte dorsal del tegmento pontino oral incluyendo parte del área de Vanni-Mercier et al. (89) y la parte dorsal del RPO.

Otros autores (90- 91) demostraron que la región equivalente al RPO del gato en la rata era la más efectiva en la inducción del sueño REM por estimulación colinérgica, así como la estimulación del RPO con otros neurotransmisores en el gato y en la rata producían también sueño REM.

7. Sueño y encefalopatía hepática.

Hoy por hoy, la investigación neurofisiológica de la encefalopatía hepática en la práctica clínica, se basa fundamentalmente en los estudios electroencefalográficos de la actividad bioeléctrica cerebral. Estos reflejos de la actividad postsináptica de las neuronas corticales, en particular de las células piramidales de la cuarta capa, son muy sensibles a la influencia de los nutrientes y energía proveniente de los sistemas metabólicos, la homeostasis electrolítica y a la toxicidad de sustancias de producción tanto endógenas, como exógenas. Sin embargo, los patrones electroencefalográficos son aún muy inespecíficos y su aparición depende directamente de la severidad de la encefalopatía hepática.

Los cambios descritos en la literatura de la actividad cortical como respuesta al cambio metabólico-toxico de la encefalopatía hepática leve son una lentificación de la actividad bioeléctrica en áreas posteriores, con pérdida de sus ritmos alfa de forma que a medida que empeora la disfunción hepática, la actividad cerebral es remplazada por ondas de frecuencias más lentas tipo theta y delta distribuidas de forma difusa sobre todas las áreas cerebrales, junto a una actividad paroxística generalizada delta rítmica de predominio frontal.

Estudios recientes publicados por Martino y cols (92) en el que se analizó la actividad

bioeléctrica cerebral durante el sueño tanto en pacientes cirróticos sin encefalopatía hepática, como en sujetos sanos, describen las primeras alteraciones tanto en la microestructura, como en la macroestructura del sueño, con aumento del poder de la banda theta durante el sueño REM asociado a un descenso del poder de la banda delta durante todas las etapas del sueño. Con base a esto, en pacientes cirróticos sin encefalopatía hepática manifiesta, estas alteraciones puedan reflejar la aparición de un grado mínimo de encefalopatía hepática, convirtiéndola en una herramienta adecuada para la evaluación funcional de la actividad cerebral y su seguimiento.

OBJETIVOS

II. Objetivos

Una de las primeras alteraciones neurológicas que presentan los pacientes con enfermedades hepáticas es la alteración en los ritmos de sueño y vigilia, con una latencia de sueño aumentada, un tiempo total de sueño reducido, y una fragmentación del sueño nocturno con frecuentes despertares, asociado a episodios de somnolencia durante el día. También parecen tener desplazado el ritmo circadiano de los niveles de melatonina en sangre (10), relacionado con los ritmos de sueño.

En la actualidad, estudios en ratas con encefalopatía hepática secundaria a derivación portocava han descrito niveles de melatonina alterados en la glándula pineal durante el día, asociándolo a alteraciones del ritmo circadiano en la actividad motora y reducción del tiempo total de sueño, deteriorándose tanto el tiempo de sueño REM como el NREM, junto a una fragmentación del sueño con aumento de despertares. Estas alteraciones de la arquitectura del sueño y de los patrones de actividad motora en ratas con derivación portocava son similares a las alteraciones del sueño en pacientes cirróticos, constatando un modelo adecuado para el estudio de las alteraciones del sueño.

Nuestra hipótesis para esta trabajo es que del mismo modo que reproducen las alteraciones cognitivas y motoras, los modelos animales de encefalopatía hepática deben reproducir las alteraciones del sueño que presentan los pacientes con cirrosis hepática, teniendo así los patrones del ritmo de sueño alterados de modo similar al de los pacientes cirróticos.

Si esto es así, se podrían utilizar en el futuro los modelos animales de encefalopatía hepática para estudiar los mecanismos moleculares responsables de las alteraciones del sueño y ensayar

procedimientos terapéuticos para revertirlos.

Los objetivos concretos de esta tesis son:

- Caracterizar las alteraciones en la arquitectura del sueño en ratas con encefalopatía hepática.
- Caracterizar las alteraciones en los ritmos de la actividad bioeléctrica cerebral en ratas con encefalopatía hepática.
- Analizar el efecto de opciones terapéuticas sobre las alteraciones en la arquitectura del sueño y de los ritmos de la actividad cerebral en ratas con encefalopatía hepática.

METODOLOGÍA

III. Metodología

1. Animales.

Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) suministradas por Charles River. Los animales se estabularon en jaulas en un ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (7h-19h) y 12 h de oscuridad (19h-7h), 23 ± 1 °C de temperatura y una humedad del $55 \pm 5\%$. Los animales se alimentaron con piensos comerciales y tuvieron libre acceso a agua y comida.

Todos los procedimientos fueron supervisados y aprobados por la institución donde se han realizado estos estudios en animales, siguiendo la legislación española “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos” y de acuerdo con las normas de la Unión Europea.

1.1 Modelo de hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático.

Como modelo de hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático se utilizó la administración a las ratas de una dieta rica en amonio (30% de acetato amónico p/p) durante cinco semanas como describen Felipo y cols. (37) y Azorín y cols. (36). Esta dieta produce un estado de hiperamonemia sostenida en el que los niveles de amonio en sangre ($\approx 430 \mu\text{M}$) son unas tres veces más altos que en las ratas control ($\approx 150 \mu\text{M}$). En cerebro, hígado y músculo los aumentos de los niveles de amonio son del 41, 37 y 50%, respectivamente. Los niveles de urea en sangre ($\approx 16 \text{ mM}$) y la eliminación de urea ($25 \text{ mmol}/24 \text{ h}$) en orina son aproximadamente el doble de los valores

correspondientes a animales control. Las ratas control se alimentaron con pienso comercial (Harlan 2014 Mantenimiento rata/ratón). Ambos grupos tuvieron libre acceso a agua y comida.

1.2 Modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porta-cava (PCS).

La intervención quirúrgica se llevó a cabo en ratas Wistar macho de 200 a 220 gramos al principio del experimento. Se administró a cada rata 0,3 ml de morfina (20 mg/ml) por vía subcutánea 30 minutos antes de la operación para inducir la analgesia. Se anestesiaron los animales con isoflurano (5% en oxígeno para inducir la anestesia, 2% para mantenerla y 0,5 % en el momento de clampar las venas) y se procedió a la anastomosis porta-cava según la técnica descrita por Lee y Fisher (1961). Para ello, tras laparotomía, se clamparon la vena porta inferior y la vena cava durante un tiempo no superior a 20 minutos, durante el cual se realizó la operación que consiste en la unión de la vena porta con la vena cava. Se realiza una pequeña incisión en la vena cava inferior del diámetro de la vena porta inferior y se suturan ambas. A continuación se evaluó el intestino para ver si existía cianosis y si esta persistía el animal se sacrificaba.

Para comprobar el éxito de la operación de anastomosis, una vez sacrificados los animales, se examinó la atrofia del hígado. Como medida del grado de atrofia se determinó en cada rata la relación entre el peso del hígado y el peso corporal. En una rata control el peso del hígado constituye aproximadamente un 3% del peso corporal. En una rata con anastomosis porta-cava es alrededor del 2%. Los cambios en el peso corporal fueron similares a los descritos en la literatura para este modelo animal.

1.3 Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar (BDL, Bile duct-ligation).

Se administró analgesia para inducción y anestesia con isoflurano con las mismas condiciones a las descritas en el anterior modelo. Tras laparotomía, se expuso la vía biliar caudal al intestino, separando el conducto biliar de la vena porta y arteria hepática. Posteriormente se coloca una sutura 5-0 alrededor del conducto biliar y se fijaron con dos nudos quirúrgicos. Al atar los nudos se aumenta la fuerza de tracción continua para garantizar la obstrucción efectiva sin cortar el conducto biliar. Se añadió una segunda ligadura craneal de la misma manera sin seccionar el conducto biliar en el medio.

1.4 Modelo de intervención simulada control (SHAM).

Al igual que en modelos anteriores, se administró analgesia para inducción y anestesia con isoflurano con las condiciones descritas anteriormente. A las ratas control (SHAM) tras laparotomía, se les clampó la vena cava inferior y la porta durante 15 minutos sin practicar la anastomosis.

1.5 Modelos de encefalopatía hepática con administración de opciones terapéuticas (Sildenafil/Zolpidem).

La administración de las diferentes opciones terapéuticas se realizó tanto para los modelos de intervención simulada control (SHAM), como para los modelos con anastomosis porta-cava (PCS) de la siguiente manera:

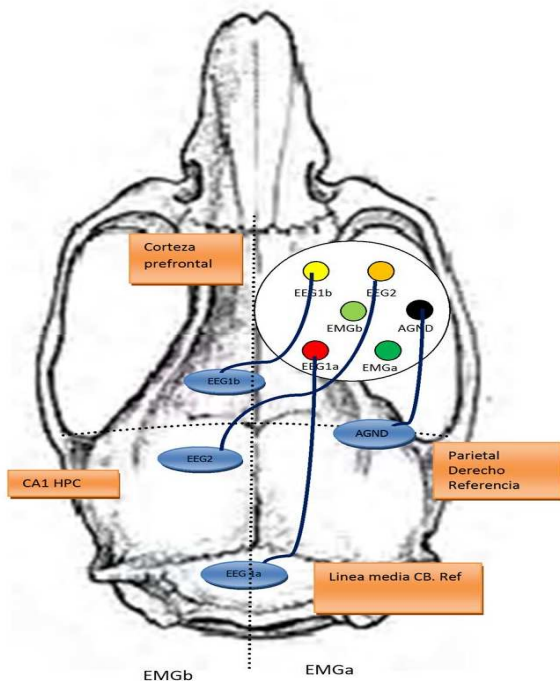
- Modelo con administración de Zolpidem: Se administró oralmente una dosis al día de 10 mg/Kg de una concentración de 5 mg/ml, por medio de una jeringuilla directamente en la boca desde el día de la cirugía, hasta el día de finalización del

registro polisomnográfico (14 días).

- Modelo con administración de Sildenafil: Se administró en el agua de bebido con acceso libre durante 15 días previos a la intervención quirúrgica, hasta la finalización del registro polisomnográfico (aproximadamente 29 días en total) a una concentración de 50 mg/lt.

1.6 Implantación de electrodos para electroencefalograma (EEG).

La implantación de electrodos para el registro electroencefalográfico se realiza 3 semanas posterior a la intervención quirúrgica según modelo de encefalopatía hepática e intervención simulada anteriormente descritas. La inducción anestésica se realizó con Isoflurano (5% en oxígeno para inducir la anestesia, 2% para mantenerla). Se realizó una perforación craneal de aproximadamente 1 mm de diámetro en el área del hipocampo izquierdo, bajo guía estereotáxica, lo que permitió la colocación de un electrodo de registro de acero inoxidable de 0,125 mm de diámetro. Adicionalmente se implanto un electrodo de registro de las mismas características en córtex prefrontal medial. Un electrodo de referencia común se implantó encima del cerebelo, 1 mm posterior a la línea media lambda. Para el registro electromiográfico, se implantaron dos electrodos de acero inoxidable de 0,12 mm de diámetro, recubiertos de teflón sobre el músculo trapecio superior bilateralmente. Se colocó un electrodo de tierra en región parietal contralateral. Todos los electrodos se unieron a un receptor extracorpóreo y se fijaron en el cráneo con cemento dental. (Ver coordenadas finales de electrodos en Figura 1).



CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL

EEG1b: AP 3,7 mm; ML 0,8 mm; DV -3,5 mm

HIPOCAMPO

EEG2: AP-3,3 mm; ML: 1,4 mm; DV: -2.3 mm

CEREBELO MEDIO

EEG1a: AP: -10,5 mm; ML: -1 mm; DV: -1 mm

AGND (tierra):

Parietal contralateral al resto, justo detrás de la sutura (tornillo).

EMG: musculatura del cuello, simétricos bilateralmente y suturados subcutáneamente para que no se muevan. cianoacrilato y tres tornillos craneales de acero.

Figura 1. Zonas de implantación de electrodos para el registro electroencefalográfico.

2. Registro electroencefalográfico.

Posteriormente a la implantación de electrodos cerebrales, los modelos animales tuvieron 10 días de recuperación postquirúrgica y 4 días de habituación en sala experimental previa adquisición electroencefalográfica. Las condiciones de luz de la sala de registro fueron exactas a las de su propio animalario (12:12), iniciándose los registros EEG al comienzo del ciclo de luz (8:00 am o unos minutos antes) durante 48 horas separados en dos sets de datos de 24 horas continuas. Las imágenes de vídeo se adquirieron sincrónicamente con la grabación electrofisiológica, usando cámaras de vídeo Modelan AP-5006, la Tecnología de Pináculo, controlada por el mismo software.

La señal electroencefalográfica fue adquirida usando el software Sirenia Acquisition, versión 1.8, de Pinnacle Technology (Kansas, USA), con una ganancia de preamplificación de x10,

y una ganancia de hardware x50,78, con filtros de 0,5-100 Hz para la señal electroencefalográfica, y de 10-100 Hz para la señal electromiográfica, a una frecuencia de muestreo de 200 Hz.

3. Análisis cualitativo de registro electroencefalográfico.

El análisis de la señal electroencefalográfica fue realizada por el autor, medico especialista en Neurofisiología Clínica, usando el software Sirenia Score, versión 1.8, de Pinnacle Technology (Kansas, USA)

Para el análisis de las distintas fases del sueño nos basamos en los criterios descritos por Datta y Hobson (93):

- Despierto (WK): La actividad cortical EEG presenta ondas de de bajo voltaje (40-60 μ V) y de alta frecuencia 35-50 Hz). El registro EMG presenta un tono alto, de gran variabilidad, en ocasiones con descargas bruscas de la actividad muscular secundaria a los movimientos de la musculatura cervical.
- NREM: La actividad EEG presenta una progresiva lentificación de su frecuencia e incremento de su amplitud. En general, la actividad cortical presenta una baja frecuencia (0,1-10,0 Hz) y una alta amplitud (200-400 μ V). Sobre esta actividad, se puede en ocasiones reconocer husos de sueño (10-14 Hz) sobrepuestos a ondas lentas bifásicas (complejos K). El tono muscular del registro EMG es mas bajo que en la etapa despierto, y en ocasiones puede llegar a estar ausente.

- **REM:** Durante el sueño REM, la actividad EEG se caracteriza por una alta frecuencia (20-40 Hz) y de baja amplitud global (50-80 μ V). El registro EMG mostrara atonia muscular o menor tono EMG que en etapa NREM.

4. Análisis cuantitativo del registro electroencefalográfico.

Los parámetros calculados para el análisis cuantitativo fueron del rango de 1 a 26,5 Hz para la frecuencia media dominante (MDF), y las potencias relativas de las diferentes ondas cerebrales en los rangos Delta entre 1,0 a 3,4 Hz, Theta entre 3.5 a 7.4 Hz, Alpha entre 7,5 a 13,4 Hz y ondas Beta entre 13,5 a 26,5 Hz La potencia relativa se expresó como porcentajes de la potencia total, con base a lo descrito por Almodio et al. (1999).

5. Análisis estadísticos.

Los resultados se expresan como media \pm SEM (error estándar de la media) del número de animales indicados en cada caso. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni para comparaciones entre grupos. Se utilizó un análisis ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni para evaluar el efecto del tiempo y de la operación realizada a los modelos animales. Los análisis estadísticos fueron realizados con los programas estadísticos GraphPad Prism 6 y SPSS 16.0, considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

IV. Resultados

Para la realización del análisis comparativo se agruparon los modelos animales en seis grupos experimentales:

- 1) modelos animales PCS frente a modelos SHAM;
- 2) modelos BDL de 6 y 10 semanas frente a modelos SHAM de 6 y 10 semanas;
- 3) modelos SHAM y BDL de 6 semanas frente a modelos SHAM y BDL hiperamonémicas;
- 4) modelos PCS frente a modelos BDL de 6 y 10 semanas;
- 5) modelos SHAM y PCS tratados con sildenafil frente a modelos SHAM y PCS no tratados con sildenafil;
- 6) modelo SHAM y PCS tratados con zolpidem frente a modelos SHAM y PCS no tratados con zolpidem.

1. Modelos animales PCS frente a modelos SHAM

En el análisis de sueño durante la noche, los modelos PCS se duermen $11,6 \pm 1,6$ veces y los modelos SHAM se duermen 7 ± 1 veces ($p < 0,05$), observando que el grupo PCS se duermen 5 veces (40%) más durante la noche que las SHAM (Ver Figura 2).

Igualmente, durante la noche los modelos PCS duermen $187 \pm 43,9$ minutos y los modelos SHAM duermen 50 ± 12 minutos ($p < 0,05$), observando que los modelos PCS duermen 137 (73%) minutos más durante la noche que las SHAM (Ver Figura 3).

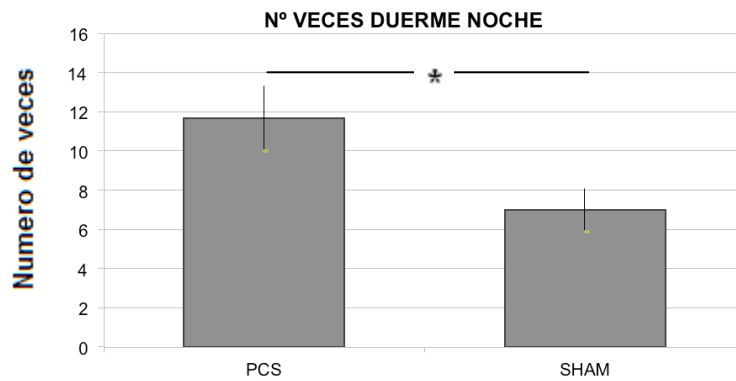


Figura 2. Número de veces que se duerme durante la noche (SHAM y PCS). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estado despierto (WK) a estadios de sueño (REM y NREM) para determinar las veces en que se dormían durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el número de veces que duermen durante la noche en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

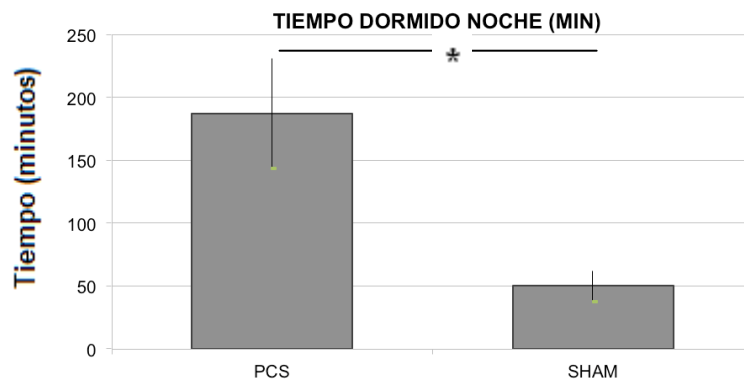


Figura 3. Tiempo dormido durante la noche (SHAM, PCS). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el tiempo dormido durante la noche en minutos en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

Durante el sueño nocturno, las PCS tienen $20,7 \pm 3\%$ de sueño REM, que es significativamente mayor ($p < 0,01$) que en los modelos SHAM con un $1,8 \pm 1\%$; observando así un 18,8% más de sueño en fase REM en los modelos PCS. Respecto a la proporción de sueño en fase NREM, las PCS tienen un $79 \pm 3\%$ de sueño en fase NREM durante la noche, significativamente

menor ($p < 0,01$) que las SHAM, que tienen un $98 \pm 1\%$, observando en los modelos PCS un 19% menos de sueño en fase NREM que las SHAM (Ver Figuras 4 y 5).

En el análisis del sueño durante el día, las PCS duermen 320 ± 55 minutos y los modelos SHAM duermen 368 ± 53 minutos, observando que los modelos PCS pasan 49 (12,9%) minutos de tiempo menos dormidas que las SHAM (Ver Figura 6).

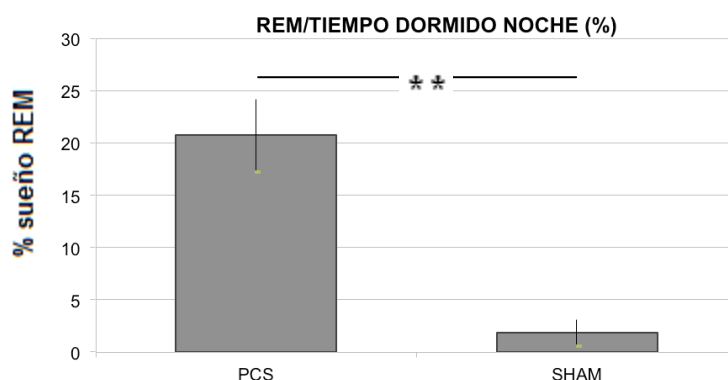


Figura 4. Proporción porcentual de sueño REM durante la noche (SHAM y PCS). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormido durante la noche. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (** $p < 0,01$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

En el análisis proporcional de fases durante el sueño diurno, las PCS tienen un $23,8 \pm 5\%$ de sueño en fase REM, y los modelos SHAM un $7,8 \pm 1,8\%$, observando que los modelos PCS tienen un 16% más de sueño en fase REM que los modelos SHAM ($p < 0,05$). Respecto a la proporción de sueño NREM, los modelos PCS tienen un $76 \pm 5\%$ de sueño en fase NREM, y los modelos SHAM un $92 \pm 1,8\%$, observando un menor porcentaje de sueño en fase NREM del 15% en los modelos PCS. (Ver Figuras 7 y 8).

En el análisis de despertares, el grupo de PCS tienen 17 ± 2 despertares y los modelos SHAM 18 ± 3 despertares, observando que los modelos PCS tienen 0,5 (2,65%) menos despertares

que las SHAM. (Ver Figura 9).

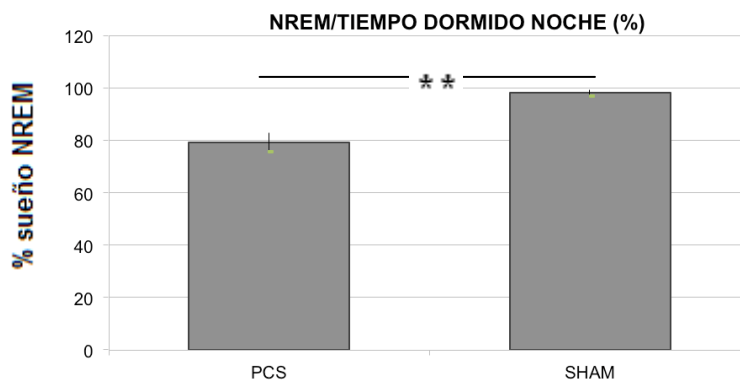


Figura 5. Proporción porcentual de sueño NREM durante la noche (SHAM y PCS). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (** $p < 0.01$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

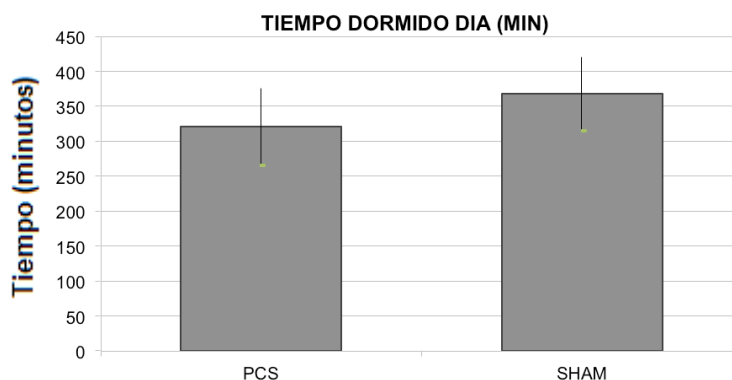


Figura 6. Tiempo de sueño durante el día (SHAM y PCS). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se encienden las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de oscuridad. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro diurno. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el tiempo dormido durante el día en minutos en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma, durante el periodo de vigilia los modelos SHAM presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $12 \pm 0,3$ Hz y los modelos PCS de $9 \pm 0,6$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM, la MDF de los modelos SHAM fue de $11,8 \pm 0,3$ Hz, y para los modelos PCS de $8,8 \pm 0,4$ Hz. Durante los periodos de sueño REM, la MDF

de los modelos SHAM fue de $9,7 \pm 1$ Hz, y para los modelos PCS de $8,9 \pm 0,4$ Hz.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen unas potencias durante periodo de vigilia para los modelos SHAM de la banda delta (δ): $15,3 \pm 1\%$; theta (θ): $32,1 \pm 1,6\%$; alfa (α): $27,2 \pm 1\%$ y beta (β): $24,7 \pm 1,9\%$. Respecto al modelo PCS, las potencias relativas durante el periodo de vigilia fueron para la banda δ : $23,2 \pm 5,6\%$; θ : $35,9 \pm 1\%$; α : $23,4 \pm 3\%$ y β : $17,4 \pm 2\%$.

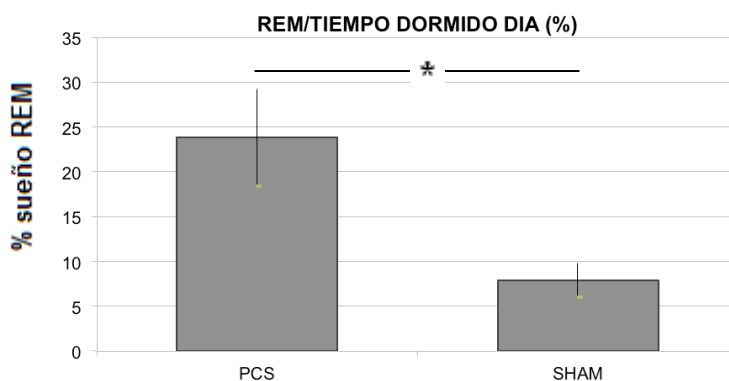


Figura 7. Proporción porcentual de sueño REM durante el día (SHAM y PCS). Se analizo el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

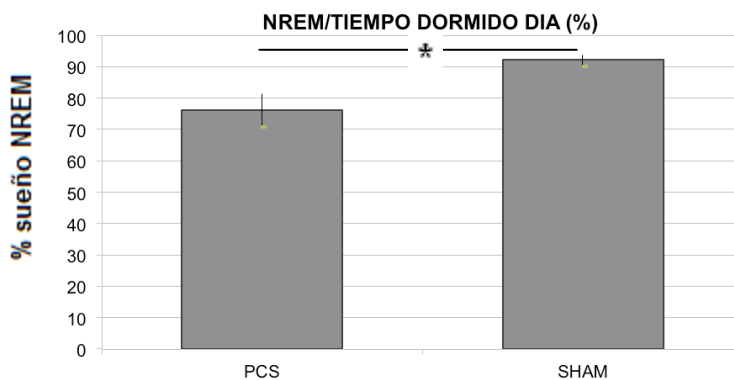


Figura 8. Proporción porcentual de sueño NREM durante el día (SHAM y PCS). Se analizo el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente

significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

Durante los periodos de sueño NREM, las potencias relativas de los modelos SHAM fueron para la banda δ : $18,2 \pm 2\%$; θ : $29,2 \pm 1\%$; α : $28,3 \pm 1\%$ y β : $24,1 \pm 2\%$. Para los modelos PCS fueron de δ : $24,3 \pm 5\%$; θ : $36,5 \pm 1\%$; α : $22,8 \pm 2,8\%$ y β : $16,3 \pm 1,9\%$.

Durante los periodos de sueño REM, las potencias relativas de los modelos SHAM fueron para la banda δ : $22,1\%$; θ : $29,2\%$; α : $28,6\%$ y β : $22,1\%$. Para los modelos PCS fueron de δ : $23,5\%$; θ : $36,4\%$; α : $22,7\%$ y β : $17,2\%$.

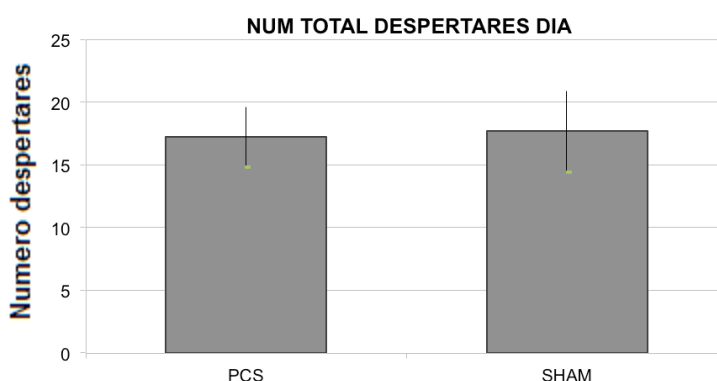


Figura 9. Numero de despertares durante el sueño (SHAM y PCS). Se analizo cualitativamente el electroencefalograma según los diferentes estadios (WK, REM, NREM). Posteriormente se realizo un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a estadio despierto (WK) para determinar el número de despertares. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el número de despertares durante el sueño en ratas SHAM y PCS. SHAM= modelo de intervención simulada control; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava.

2. Modelos BDL de 6 y 10 semanas frente a modelos SHAM de 6 y 10 semanas

En el análisis de sueño durante la noche, el grupo BDL de 6 semanas se duerme $16,6 \pm 4$ veces y el de 10 semanas se duerme 19 ± 5 veces. El grupo de modelo SHAM de 6 semanas se duerme 12 ± 5 veces y el de 10 semanas $16,9 \pm 6$ veces durante la noche, observando que los modelos

BDL de 6 y 10 semanas se duermen 4,3 (26%) y 2 (11%) veces más durante la noche que las SHAM de 6 y 10 semanas respectivamente. (Ver Figura 10).

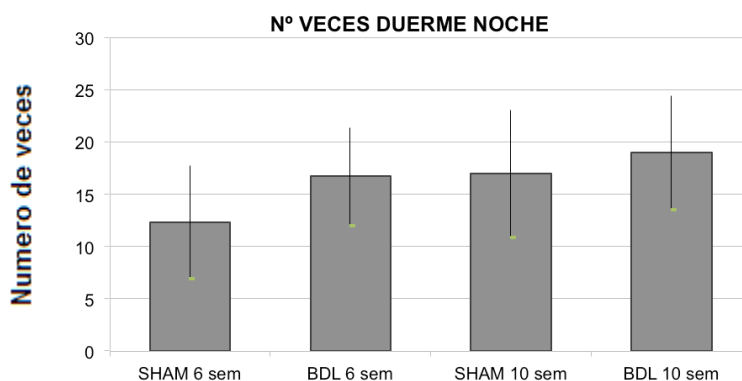


Figura 10. Número de veces que se duerme durante la noche (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadio despierto (WK) a estadios de sueño (REM y NREM) para determinar las veces en que se dormían durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el número de veces que duermen durante la noche en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis del tiempo que pasan dormidos durante la noche, el grupo de BDL de 6 semanas duerme 111 ± 19 minutos durante la noche y el de 10 semanas duerme $165,7 \pm 61$ minutos. Respecto a los modelos SHAM, los de 6 semanas duermen 90 ± 40 minutos durante la noche, y los de 10 semanas 142 ± 55 minutos, observando que los modelos BDL de 6 y 10 semanas duermen 21 (19%) y 23 (14%) minutos más durante la noche que las SHAM de 6 y 10 semanas respectivamente (Ver Figura 11).

Durante el sueño nocturno, las ratas BDL de 6 semanas tienen un $10,3 \pm 3\%$ de sueño en fase REM, y los modelos SHAM de 6 semanas tienen un $5,5 \pm 1\%$, observando que el grupo BDL de 6 semanas tienen un 5% más de sueño en fase REM que las SHAM de 6 semanas. Respecto a la proporción de sueño en fase NREM, los modelos BDL de 6 semanas tienen un $91,4 \pm 3\%$ y los modelos SHAM de 6 semanas tienen un $94,4 \pm 1\%$, observando que los modelos BDL de 6 semanas

tienen un 3% menos de sueño en fase NREM que las SHAM de 6 semanas. (Ver Figuras 12 y 13).

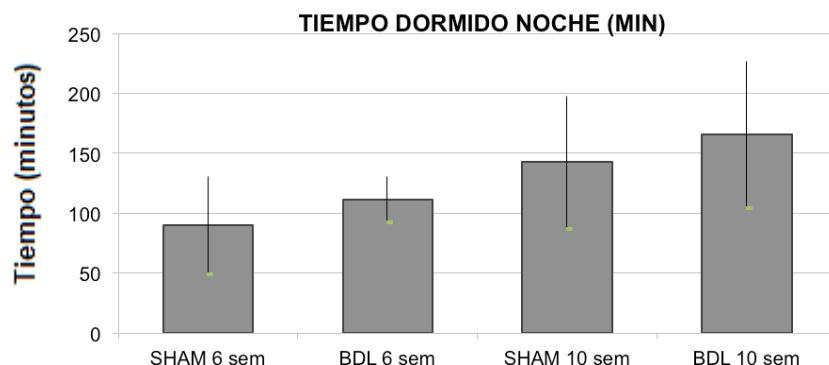


Figura 11. Tiempo dormido durante la noche (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se cuantificó el tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el tiempo dormido durante la noche en minutos en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

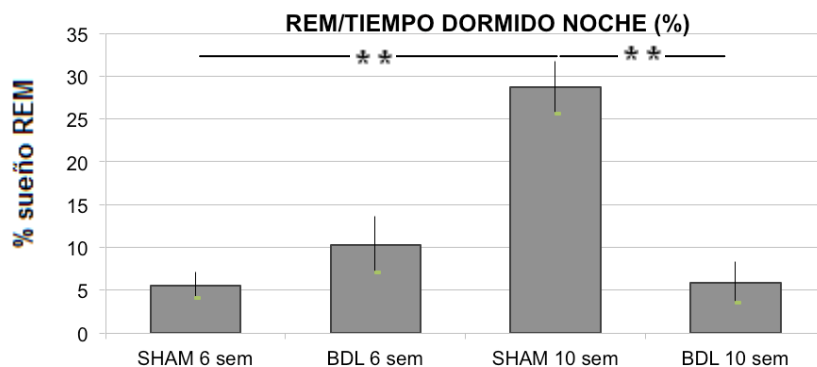


Figura 12. Proporción porcentual de sueño REM durante la noche (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (***) ($p < 0.01$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

Analizando comparativamente los grupos BDL y SHAM de 10 semanas, los modelos BDL de 10 semanas tienen un $5,9 \pm 2\%$ de sueño en fase REM, y los modelos SHAM de 10 semanas un $28,6 \pm 3\%$, observando una proporción de sueño en fase REM de un 23% menos en el grupo de BDL

($p < 0,01$). Respecto a la proporción de sueño en fase NREM, el grupo BDL de 10 semanas tiene un $94 \pm 2\%$ y el grupo SHAM de 10 semanas un $74,9 \pm 4\%$, observando un aumento del 19% de sueño en fase NREM en el grupo BDL de 10 semanas respecto al grupo SHAM de 10 semanas ($p < 0,01$). (Ver Figuras 12 y 13).

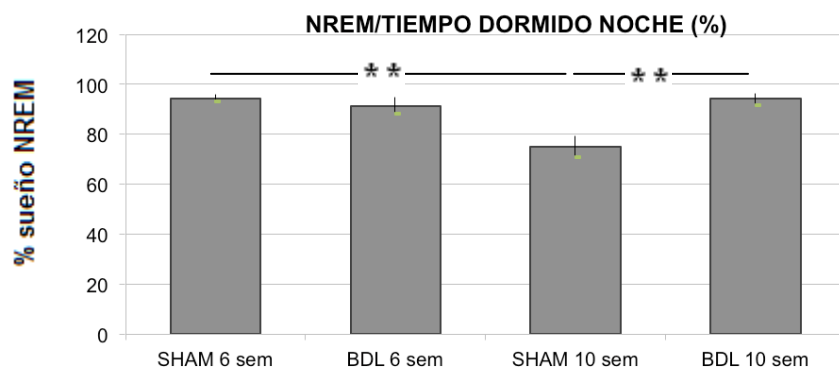


Figura 13. Proporción porcentual de sueño NREM durante la noche (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (** $p < 0,01$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis del sueño durante el día, los modelos BDL de 6 semanas pasan 307 ± 62 minutos de tiempo dormidas, y los modelos SHAM de 6 semanas pasan 368 ± 53 minutos, observando que los modelos BDL de 6 semanas pasan 61 (16,5%) minutos de tiempo menos dormidas durante el día que las SHAM de 6 semanas. Respecto a los modelos de 10 semanas, el grupo BDL pasa 315 ± 41 minutos dormidas durante el día, y el grupo SHAM 175 ± 43 minutos, observando que los modelos BDL de 10 semanas pasan 140 minutos (44%) más de tiempo dormidas durante el día que las SHAM de 10 semanas. (Ver Figura 14).

En el análisis proporcional de fases durante el sueño diurno, las BDL de 6 semanas tiene un $14,5 \pm 4\%$ de sueño en fase REM, y las SHAM de 6 semanas un $7,8 \pm 1\%$, observando que los

modelos BDL de 6 semanas tienen un 7% más de sueño en fase REM que los modelos SHAM de 6 semanas. Respecto al porcentaje de sueño en fase NREM, los modelos BDL de 6 semanas tienen un $85,4\pm 4\%$ y los modelos SHAM de 6 semanas un $92\pm 1\%$, observando que los modelos BDL de 6 semanas tienen un 7% menos de sueño en fase NREM que las SHAM de 6 semanas. (Ver Figuras 15 y 16).

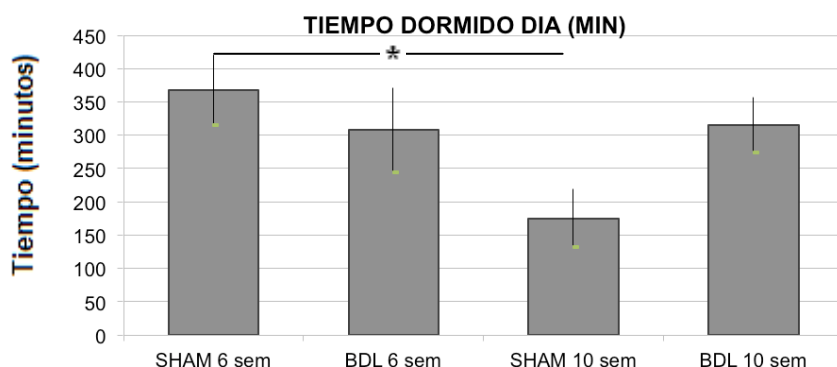


Figura 14. Tiempo dormido durante el día (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se encienden las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de oscuridad. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro diurno. Los valores son la media junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el tiempo dormido durante el día en minutos en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis proporcional de fases de los modelos de 10 semanas, las BDL de 10 semanas tienen un $7\pm 1\%$ de sueño en fase REM, y los modelos SHAM de 10 semanas un $14,9\pm 5\%$, observando que el grupo BDL de 10 semanas presenta un 8% menos de sueño en fase REM que el grupo SHAM de 10 semanas. Respecto a la proporción de sueño en fase NREM, los modelos BDL de 10 semanas tienen $92,9\pm 1\%$ y los modelos SHAM de 10 semana un $85\pm 5\%$, observando un 8% más de sueño NREM en el grupo BDL de 10 semanas respecto a las SHAM de 10 semanas. (Ver Figuras 15 y 16).

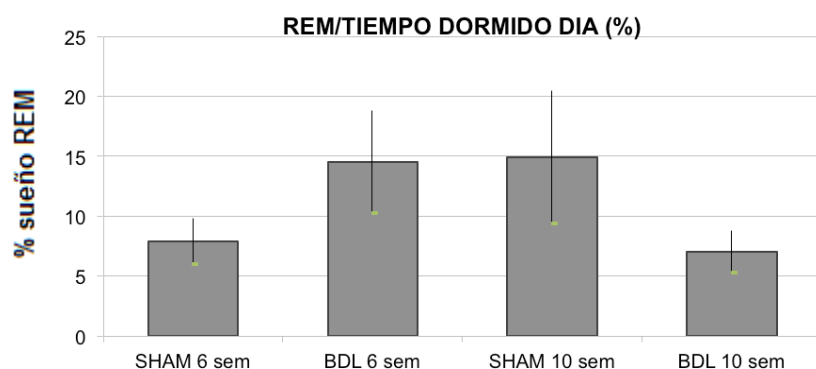


Figura 15. Proporción porcentual de sueño REM durante el día (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis de despertares y transiciones de fase durante el sueño, el grupo BDL de 6 semanas tienen $20,4 \pm 4$ despertares durante el sueño, y el grupo de SHAM de 6 semanas $17,7 \pm 3$ despertares, observando que el grupo de BDL de 6 semanas tiene 3 despertares (13%) más que las SHAM de 6 semanas, y mayor número de transiciones de fase, especialmente de fase NREM a Vigilia. (Ver Figura 17).

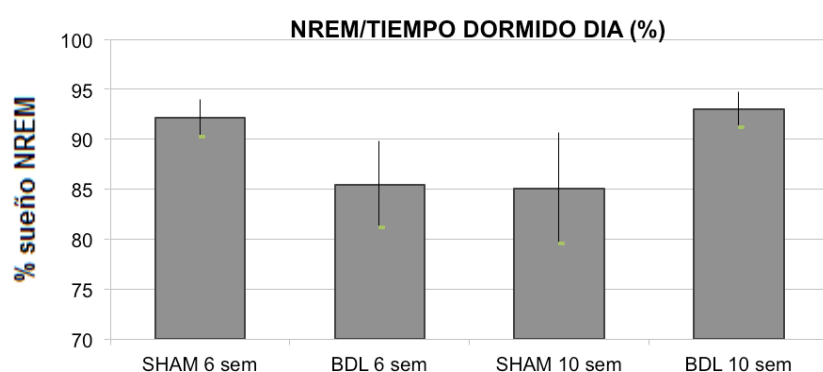


Figura 16. Proporción porcentual de sueño NREM durante el día (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

Respecto al grupo de 10 semanas, los modelos BDL tienen $27,3 \pm 2$ despertares y las SHAM tienen $16,6 \pm 3$ despertares, observando que los modelos BDL tienen 11 despertares (39%) más que las SHAM, y mayor número de transiciones de fase NREM a vigilia. (Ver Figuras 17).

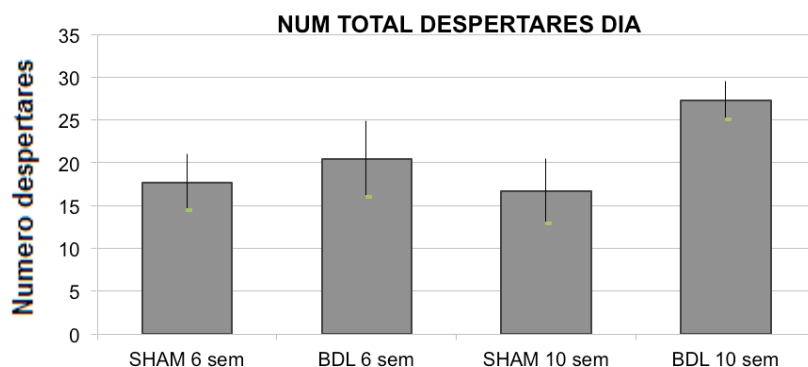


Figura 17. Número de despertares durante el sueño (BDL 6 y 10 semanas, SHAM 6 y 10 semanas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma según los diferentes estadios (WK, REM, NREM). Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a estadio despierto (WK) para determinar el número de despertares. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el número de despertares durante el sueño en ratas SHAM de 6 y 10 semanas, y BDL de 6 y 10 semanas. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma, durante el periodo de vigilia los modelos SHAM de 6 semanas presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $12 \pm 0,3$ Hz y los modelos SHAM de 10 semanas de $10,7 \pm 0,9$ Hz. Los modelos BDL de 6 semanas durante periodos de vigilia presentan una MDF de $11 \pm 0,3$ Hz y los modelos BDL de 10 semanas de $12,8 \pm 0,3$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM, la MDF de los modelos SHAM de 6 semanas fue de $11,8 \pm 0,3$ Hz, y para los modelos SHAM de 10 semanas de $10,9 \pm 0,6$ Hz. Los modelos BDL de 6 semanas durante los periodos de sueño NREM presentan una MDF de $11 \pm 0,3$ Hz, y los modelos BDL de 10 semanas de $12,8 \pm 0,2$ Hz. Durante los periodos de sueño REM, la MDF de los modelos SHAM de 6 semanas es de $9,7 \pm 1$ Hz, y para los modelos SHAM de 10 semanas de $7 \pm 1,9$ Hz. Los modelos BDL de 6 semanas durante los periodos de sueño REM, la MDF es de $10 \pm 0,6$ Hz, y para los modelos BDL de 10 semanas de $12,8 \pm 0,2$ Hz.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas del EEG, se obtienen una potencias del grupo SHAM de 6 semanas durante el periodo de vigilia de δ : $8,3\pm 0,5\%$; θ : $24\pm 1,4\%$; α : $28,4\pm 1,5\%$ y β : $39,1\pm 2,2\%$. Para el grupo de SHAM de 10 semanas, durante el periodo de vigilia las potencias relativas fueron para la banda δ : $9,1\pm 0,2\%$; θ : $23,8\pm 1,4\%$; α : $25,6\pm 2,8\%$ y β : $36,7\pm 3,5\%$. Para el grupo de BDL de 6 semanas las potencias relativas durante la vigilia fueron δ : $8,6\pm 0,7\%$; θ : $26,4\pm 1,2\%$; α : $30,3\pm 1,6\%$ y β : $34,6\pm 3\%$. Para el grupo e BDL de 10 semanas las potencias relativas en vigilia fueron δ : $9,6\pm 0,5\%$; θ : $20,1\pm 2\%$; α : $24,4\pm 0,7\%$ y β : $45,6\pm 2,2\%$.

Durante los periodos de sueño NREM, para el grupo SHAM de 6 semanas las potencias relativas fueron δ : $9,3\pm 0,7\%$; θ : $24\pm 1,5\%$; α : $28\pm 1,6\%$ y β : $38,4\pm 2,2\%$. Para el grupo SHAM de 10 semanas las potencias relativas durante el periodo NREM fueron δ : $11,3\pm 1\%$; θ : $23,7\pm 1,5\%$; α : $27,1\pm 1,8\%$ y β : $33,9\pm 3,5\%$. Para el grupo BDL de 6 semanas, las potencias relativas durante en NREM fueron δ : $8,9\pm 1\%$; θ : $26,5\pm 1,3\%$; α : $29,3\pm 1,6\%$ y β : $34,3\pm 3\%$. Para el grupo de BDL de 10 semanas, las potencias relativas durante el NREM fueron δ : $10,1\pm 0,4\%$; θ : $19,6\pm 1,6\%$; α : $24,4\pm 0,4\%$ y β : $45,7\pm 1,7\%$.

Durante los periodos de sueño REM, las potencias relativas para el grupo SHAM de 6 semanas fueron δ : $9,2\pm 0,5\%$; θ : $24,28\pm 1,6\%$; α : $27,4\pm 1,3\%$ y β : $39\pm 2,2\%$. Para el grupo de SHAM de 10 semanas, durante los periodos de sueño REM presenta una potencias relativas de δ : $10,9\pm 0,9\%$; θ : $24,9\pm 2,1\%$; α : $27,9\pm 2,1\%$ y β : $36,1\pm 4,3\%$. Para el grupo de BDL de 6 semanas, las potencias relativas durante el REM fueron δ : $9,8\pm 1\%$; θ : $27,4\pm 1,8\%$; α : $27,2\pm 1,7\%$ y β : $35,4\pm 2,8\%$. Para el grupo BDL de 10 semanas, las potencias relativas durante el REM fueron δ : $9,9\pm 0,4\%$; θ : $19,9\pm 1,7\%$; α : $24,4\pm 0,2\%$ y β : $45,6\pm 1,6\%$.

3. Modelos SHAM y BDL de 6 semanas frente a modelos SHAM y BDL hiperamonémicas

En el análisis durante el sueño nocturno de los modelos hiperamonémicas, las BDL se duermen $18,6 \pm 3$ veces y los modelos SHAM 17 ± 3 veces durante la noche. Respecto a los modelos no hiperamonémicos, las BDL se duermen $16,6 \pm 4$ veces y las SHAM $12,3 \pm 5$ veces, observándose que el grupo BDL y SHAM hiperamonémicas se duermen 2 (10,5%) y 5 (28%) veces más durante la noche respectivamente que las no hiperamonémicas. (Ver Figura 18).

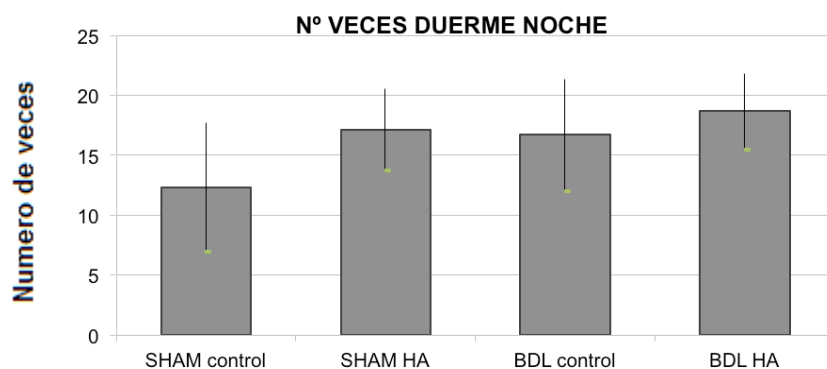


Figura 18. Número de veces que se duerme durante la noche (BDL y SHAM hiperamonémicas, BDL y SHAM no hiperamonémicas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estado despierto (WK) a estadios de sueño (REM y NREM) para determinar las veces en que se dormían durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el número de veces que duermen durante la noche en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

Igualmente, analizando el tiempo dormido durante la noche, el grupo BDL hiperamonémico duerme $186,5 \pm 54$ minutos y el grupo SHAM hiperamonémico $170,3 \pm 41$ minutos. Respecto a los modelos no hiperamonémicos, el grupo BDL duerme $111,4 \pm 19$ minutos y el grupo SHAM 90 ± 40 minutos, observándose que los grupos BDL y SHAM hiperamonémicas duermen 75 (40%) y 80 (47%) minutos más durante la noche que las no hiperamonémicas respectivamente. (Ver Figura 19).

En el análisis proporcional de fases durante el sueño nocturno, las BDL hiperamonémicas

tienen un $9\pm 2\%$ de fase REM durante el sueño y un $90,9\pm 2\%$ de fase NREM. Respecto al grupo BDL no hiperamonémicas, estas presentan un $10,3\pm 3\%$ de fase REM durante el sueño y un $89,6\pm 3\%$ de fase NREM, observando que las BDL hiperamonémicas tienen un 1% menos de sueño en fase REM y un 1% más de sueño en fase NREM que las BDL no hiperamonémicas respectivamente. (Ver Figuras 20 y 21).

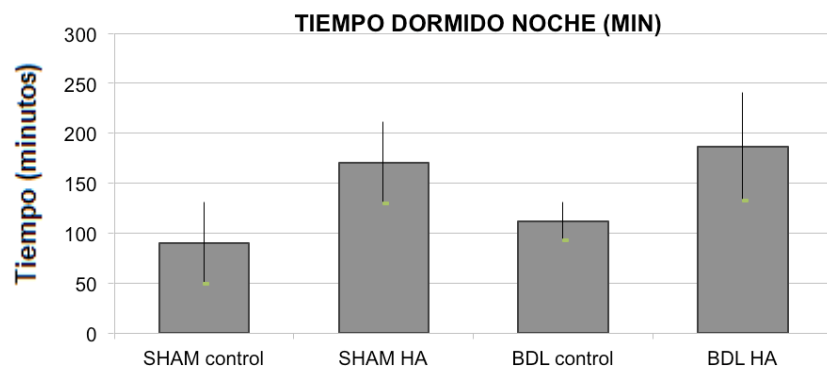


Figura 19. Tiempo dormido durante la noche (BDL y SHAM hiperamonémicas, BDL y SHAM no hiperamonémicas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se cuantificó el tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el tiempo dormido durante la noche en minutos en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

Analizando comparativamente los grupos SHAM, los modelos hiperamonémicos presentan un $7,8\pm 3\%$ de sueño REM durante el sueño y un $92\pm 3\%$ de sueño NREM. Por otra parte, los modelos SHAM no hiperamonémicos presentan un $5,5\pm 1\%$ de fase REM durante el sueño y un $94,4\pm 1\%$ de sueño NREM, observando una proporción de sueño en fase REM de un 2% más en el grupo hiperamonémico, con un 2% menos de sueño en fase NREM. (Ver Figuras 20 y 21).

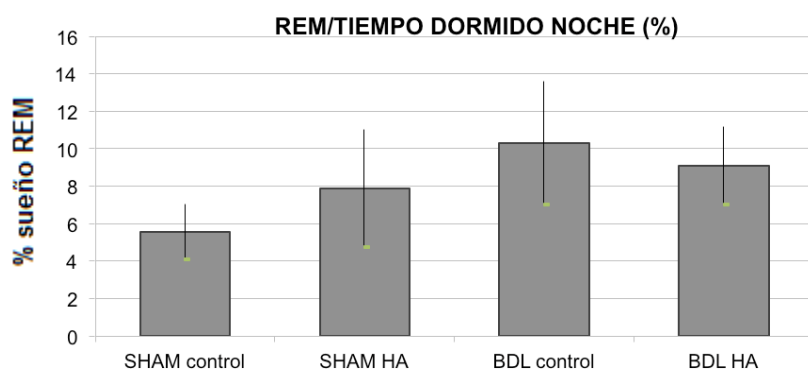


Figura 20. Proporción porcentual de sueño REM durante la noche (BDL y SHAM hiperamonémicas, BDL y SHAM no hiperamonémicas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

En el análisis del sueño durante el día, los modelos BDL hiperamonémicos pasan $468,8 \pm 54$ minutos dormidas y las no hiperamonémicas pasan 307 ± 62 minutos, observando que el grupo de BDL hiperamonémicas pasan 161,4 minutos (34,4%) más de tiempo dormidas que las no hiperamonémicas. Esta diferencia se invierte en el grupo de las SHAM, donde los modelos hiperamonémicos pasan 218 ± 24 minutos durmiendo y las no hiperamonémicas duermen 368 ± 53 minutos, observando que las expuestas a al amonio pasan 150 minutos menos (40,7%) de tiempo dormidas que las no hiperamonémicas (Ver Figura 22).

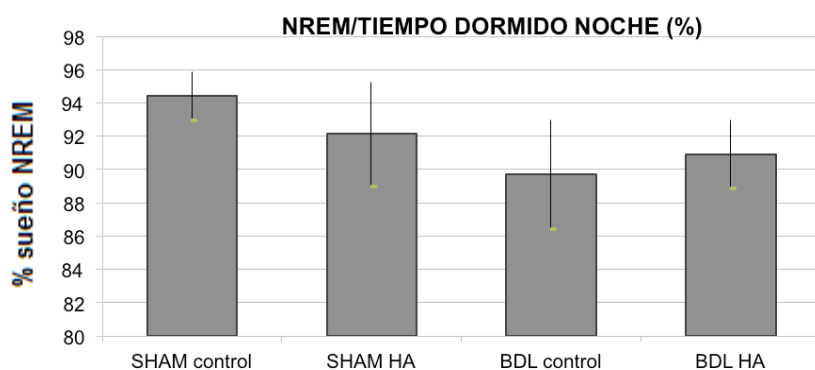


Figura 21. Proporción porcentual de sueño NREM durante la noche (BDL y SHAM hiperamonémicas, BDL y SHAM no hiperamonémicas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes

estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

En el análisis proporcional de fases durante el sueño diurno, las BDL hiperamonémicas tienen un 12,6±2% de fase REM durante el sueño y un 87,3±2% de fase NREM. Respecto al grupo de BDL no hiperamonémicas, estas tienen un 14,5±4% de sueño REM y un 85,4±4% de sueño NREM, observando que las BDL hiperamonémicas tienen un 2% menos de sueño en fase REM y un 2% más de sueño en fase NREM que las BDL no hiperamonémicas respectivamente. (Ver Figuras 23 y 24).

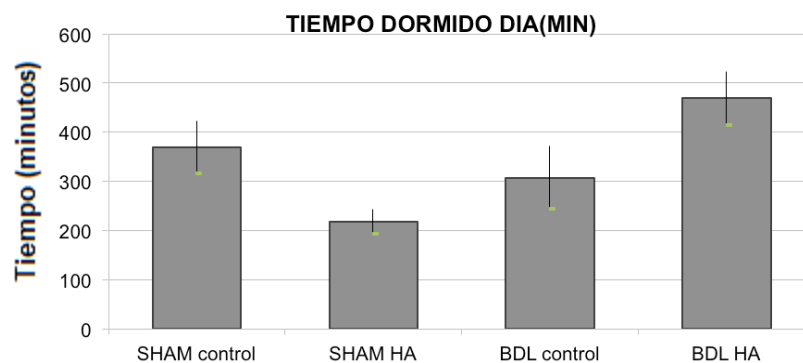


Figura 22. Tiempo dormido durante el día (BDL y SHAM hiperamonémicas, BDL y SHAM no hiperamonémicas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se encienden las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de oscuridad. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro diurno. Los valores son la media junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el tiempo dormido durante el día en minutos en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

En el análisis comparativo de los grupos SHAM, los modelos hiperamonémicos tienen un 10,9±3,8% de sueño en fase REM y un 89±3% en fase NREM. Respecto a los modelos SHAM no hiperamonémicos, estos tienen un 7,8±1% de sueño en fase REM y un 92±1% de fase NREM, observando una proporción de sueño en fase REM de un 3% más en el grupo hiperamonémicos, con

un 3% menos de sueño en fase NREM, respecto a las no hiperamonémicas. (Ver Figuras 23 y 24).

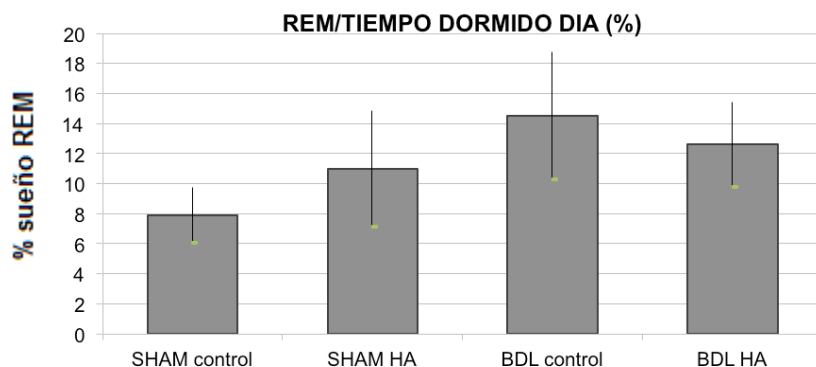


Figura 23. Proporción porcentual de sueño REM durante la día (BDL y SHAM hiperamonémicas, BDL y SHAM no hiperamonémicas). Se analizo el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

En el análisis de despertares y transiciones de fase durante el sueño, los modelos BDL hiperamonémicos tienen 31 ± 8 despertares y las no hiperamonémicas tienen $20,4 \pm 4$ despertares, observando que el grupo de BDL hiperamonémicas tienen 11 despertares (34%) más que las BDL no hiperamonémicas, y mayor número de transiciones de fase, especialmente de fase NREM a Vigilia. (Ver Figura 25).

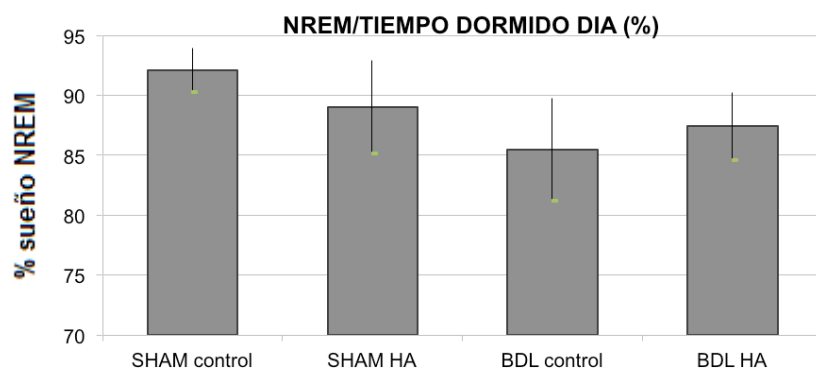


Figura 24. Proporción porcentual de sueño NREM durante la día (BDL y SHAM hiperamonémicas, BDL y SHAM no hiperamonémicas). Se analizo el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número

de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

Estas diferencias son similares en el grupo de las SHAM, donde los modelos hiperamonémicos tienen $22,3 \pm 5$ despertares y los no hiperamonémicos $17,7 \pm 3$ despertares, observando que el grupo hiperamonémico presenta 5 despertares (21%) más que las SHAM no hiperamonémicas, y mayor número de transiciones de fase NREM a vigilia. (Ver Figura 25).

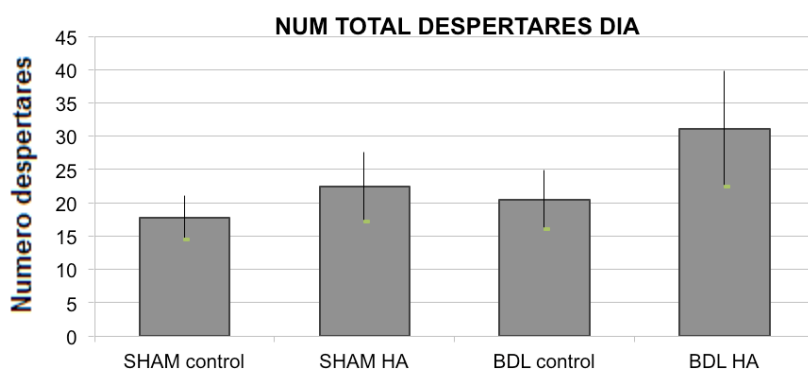


Figura 25. Número de despertares durante el sueño. Se analizó cualitativamente el electroencefalograma según los diferentes estadios (WK, REM, NREM). Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a estadio despierto (WK) para determinar el número de despertares. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el número de despertares durante el sueño en ratas SHAM controles y expuestas a dieta hiperamonémica y BDL controles y expuestas a dieta hiperamonémica. SHAM= modelo de intervención simulada control; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; Control= ratas no expuestas a dieta hiperamonémica; HA= ratas expuestas a dieta hiperamonémica.

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma, durante el periodo de vigilia los modelos SHAM no hiperamonémicos presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $12 \pm 0,3$ Hz y los modelos SHAM hiperamonémicos de $12 \pm 0,4$ Hz. Para el grupo BDL no hiperamonémico, durante la vigilia presenta una MDF de $11,3 \pm 0,3$ Hz, y para el grupo de modelos BDL hiperamonémicos de $10,9 \pm 1$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM los modelos SHAM no hiperamonémicos presentan una MDF de $11,8 \pm 0,3$ Hz y las SHAM hiperamonémicas de $12,2 \pm 0,3$ Hz. Para el grupo de BDL no hiperamonémicos, durante los periodos de sueño NREM presentan una MDF de $11,2 \pm 0,3$ Hz, y los modelos BDL hiperamonémicos de $10,7 \pm 1$ Hz. Durante los

periodos de sueño REM, los modelos SHAM no hiperamonémicos presentan una MDF de $9,7\pm 1$ Hz y las SHAM hiperamonémicas de $11\pm 1,3$ Hz. Los modelos BDL no hiperamonémicos presentan durante los periodos de sueño REM una MDF de $10,3\pm 0,6$ Hz, y las BDL hiperamonémicas de $10,7\pm 1$ Hz.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas del EEG, se obtienen unas potencias relativas durante la vigilia para el grupo SHAM no hiperamonémico de δ : $8,3\pm 0,5\%$; θ : $24\pm 1,7\%$; α : $28,4\pm 1,5\%$ y β : $39\pm 2,2\%$. Para el grupo SHAM hiperamonémico se obtienen unas potencias relativas durante vigilia de δ : $8,9\pm 0,6\%$; θ : $22,2\pm 2\%$; α : $27\pm 1,8\%$ y β : $41,7\pm 3\%$. Para el grupo BDL no hiperamonémico durante la vigilia presenta una potencias relativas de δ : $8,6\pm 0,7\%$; θ : $26,4\pm 1\%$; α : $30,3\pm 1,6\%$ y β : $34,6\pm 3\%$. Para el grupo BDL hiperamonémico, las potencias relativas durante la vigilia fueron δ : $9,3\pm 0,7\%$; θ : $25,3\pm 2,4\%$; α : $25,4\pm 2,4\%$ y β : $34,5\pm 5,7\%$.

Durante los periodos de sueño NREM, las potencias relativas para el grupo SHAM no hiperamonémico fueron δ : $9,3\pm 0,7\%$; θ : $24\pm 1,5\%$; α : $28\pm 1,6\%$ y β : $38,4\pm 2,2\%$. Para el grupo SHAM hiperamonémico las potencias relativas durante el sueño NREM fueron δ : $9,7\pm 1\%$; θ : $21,9\pm 1,8\%$; α : $26,9\pm 2,3\%$ y β : $41,3\pm 2,9\%$. Para el grupo BDL no hiperamonémico, las potencias relativas durante el NREM fueron δ : $9,6\pm 0,8\%$; θ : $26,5\pm 1,3\%$; α : $29,3\pm 1,6\%$ y β : $34,3\pm 3,1\%$. Para el grupo BDL hiperamonémico, las potencias relativas durante el NREM fueron δ : $10,9\pm 0,7\%$; θ : $25,8\pm 2,8\%$; α : $25,1\pm 2\%$ y β : $33,1\pm 6\%$.

Durante los periodos de sueño REM, las potencias relativas del grupo SHAM no hiperamonémico fueron δ : $9,2\pm 0,5\%$; θ : $24,2\pm 1,6\%$; α : $27,4\pm 1,3\%$ y β : $39\pm 2\%$. Para el grupo SHAM hiperamonémico, durante el sueño REM las potencias relativas fueron δ : $12,3\pm 1,6\%$; θ :

22,5±1,9%; α : 24,7±0,6% y β : 40,3±3%. Para el grupo BDL no hiperamonémico, las potencias relativas durante el sueño REM fueron δ : 9,8±1%; θ : 27,4±1,8%; α : 27,2±1,7% y β : 35,4±2,8%. Para el grupo BDL hiperamonémico, las potencias relativas durante el sueño REM fueron δ : 9,7±0,1%; θ : 27,1±3%; α : 25,9±2% y β : 32,6±6%.

4. Modelos PCS frente modelos BDL de 6 y 10 semanas

En el análisis de sueño durante la noche, los modelos PCS se duermen 11,6±1 veces, los BDL de 6 semanas 16,6±4 veces y los BDL de 10 semanas 19±5 veces durante la noche, observando que los BDL de 6 y 10 semanas se duermen 5 (30%) y 7,3 (38%) veces más durante la noche que las PCS respectivamente. (Ver Figura 26).

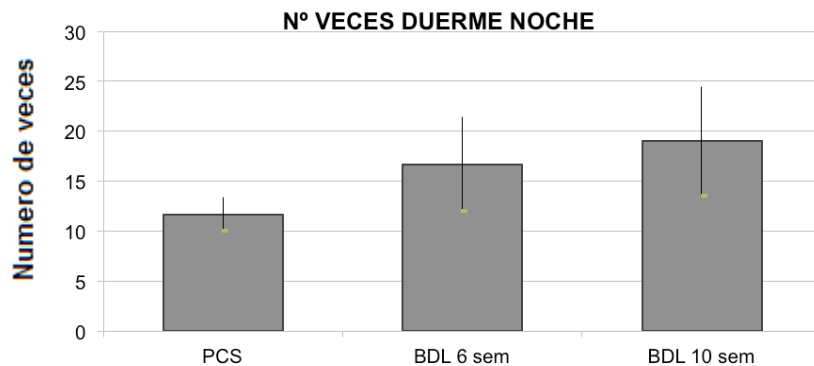


Figura 26. Número de veces que se duerme durante la noche (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadio despierto (WK) a estadios de sueño (REM y NREM) para determinar las veces en que se dormían durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el número de veces que duermen durante la noche en ratas PCS y BDL de 6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

Sin embargo, en el análisis de tiempo dormido durante la noche, el grupo PCS duerme 187±43 minutos, las BDL de 6 semanas duermen 111,4±19 minutos y las BDL de 10 semanas 165,7±61 minutos, observando que los modelos BDL de 6 y 10 semanas duermen 76 (40%) y 21,4 (11%) minutos menos durante la noche que las PCS respectivamente. (Ver Figura 27).

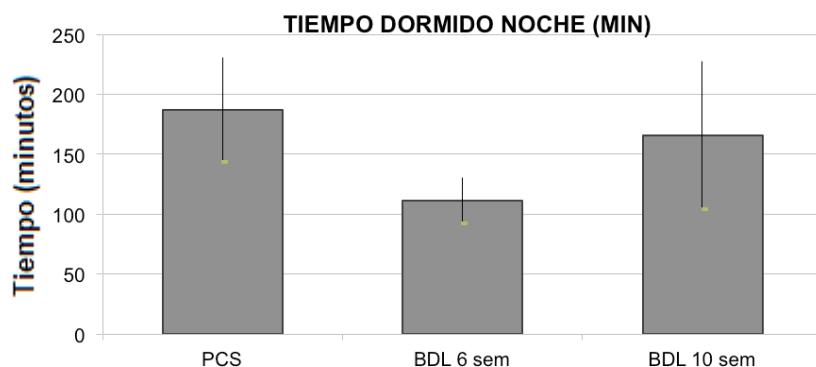


Figura 27. Tiempo dormido durante la noche (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizo cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se cuantifico el tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el tiempo dormido durante la noche en minutos en ratas PCS y BDL de 6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis de la proporción de fases durante el sueño nocturno, los modelos PCS tienen un $20,7\pm 3\%$ de sueño REM, los modelos BDL de 6 semanas $10,3\pm 3\%$ y los modelos BDL de 10 semanas $5,9\pm 2\%$, observando que los grupos BDL de 6 y 10 semanas tienen un 10% y un 15% menos de sueño en fase REM que las PCS respectivamente. Respecto a la proporción de sueño en fase NREM, los modelos PCS tienen un $79\pm 3\%$, las BDL de 6 semanas un $91,4\pm 3\%$ y las BDL de 10 semanas un $94\pm 2\%$, observando un mayor porcentaje de sueño NREM en los modelos BDL de 6 y 10 semanas de un 12% y un 15% más que las PCS respectivamente. (Ver Figuras 28 y 29).

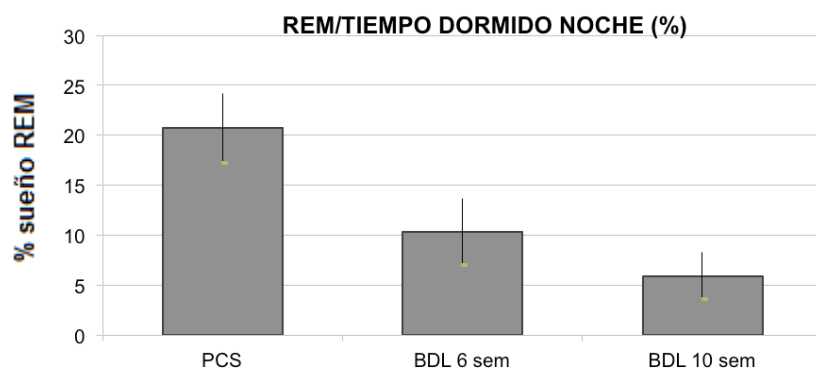


Figura 28. Proporción porcentual de sueño REM durante la noche (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizo el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas PCS y BDL de

6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

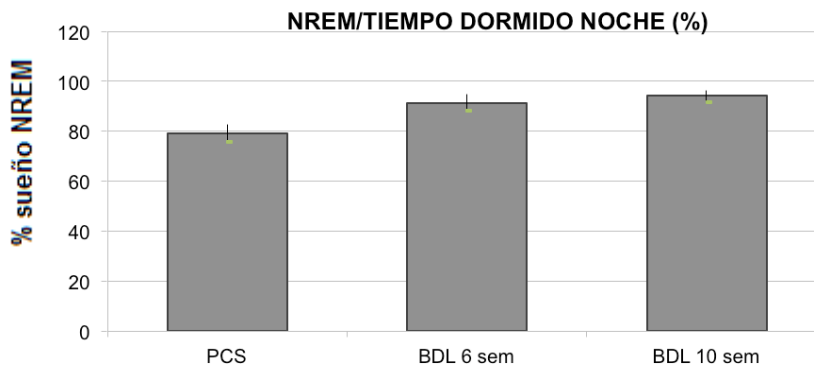


Figura 29. Proporción porcentual de sueño NREM durante la noche (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas PCS y BDL de 6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis del sueño durante el día, los modelos PCS pasan $320,4 \pm 55$ minutos dormidas, las BDL de 6 semanas $307,3 \pm 62$ minutos y las BDL de 10 semanas 315 ± 41 minutos, observando que los grupos BDL de 6 y 10 semanas pasan 13 (4%) y 5,3 (1,6%) minutos menos de tiempo dormidas que las PCS respectivamente. (Ver Figura 30).

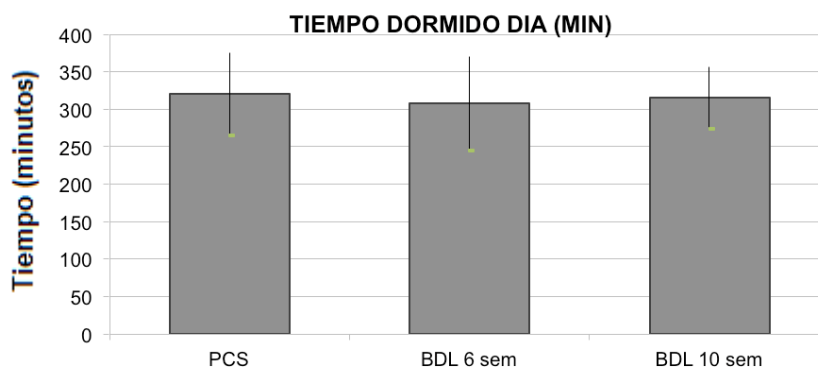


Figura 30 Tiempo dormido durante el día (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se encienden las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de oscuridad. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro diurno. Los valores son la media junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el tiempo dormido durante el día en minutos en ratas PCS y BDL de 6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis proporcional de fases durante el sueño diurno, los modelos PCS tienen un 23,8±5% de sueño en fase REM y un 76±5% de sueño en fase NREM. Respecto a los modelos BDL, los grupos de 6 semanas tienen un 14,5±4% de sueño en fase REM y un 85,4±4% en fase NREM; y los modelos BDL de 10 semanas tienen un 7±1% de sueño en fase REM y un 92,9±1% de sueño en fase NREM, observando que los grupos BDL de 6 y 10 semanas tienen un 9% y un 17% menos de sueño en fase REM que las PCS y un 8% y 15% más de sueño en fase NREM que las PCS respectivamente. (Ver Figuras 31 y 32).

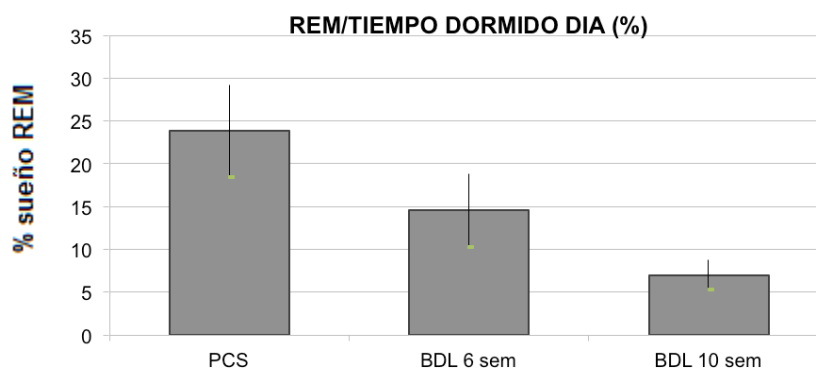


Figura 31. Proporción porcentual de sueño REM durante el día (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas PCS y BDL de 6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis de despertares durante el sueño, los modelos PCS tienen 17±2 despertares, los modelos BDL de 6 semanas 20,4±4 despertares y los modelos BDL de 10 semanas 27,3±2 despertares, observando que el grupo de las BDL de 6 y 10 semanas tienen 7 (35%) y 14 (51,6%) despertares más que las PCS respectivamente. (Ver Figura 33).

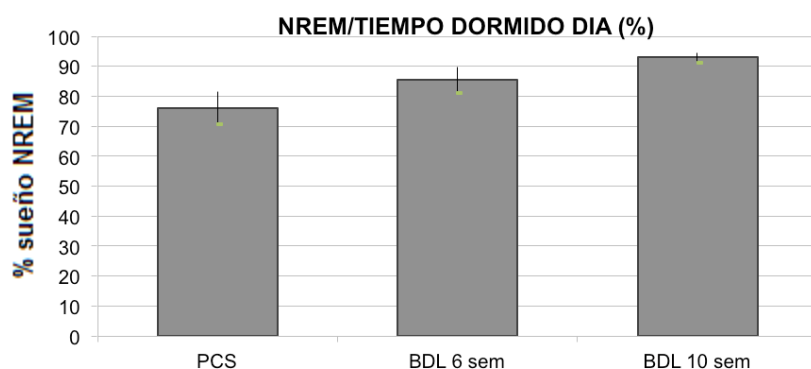


Figura 32. Proporción porcentual de sueño NREM durante el día (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormido durante el día. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas PCS y BDL de 6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma, durante el periodo de vigilia los modelos PCS presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $9,1 \pm 0,6$ Hz, los modelos BDL de 6 semanas de $11,3 \pm 0,6$ Hz, y los modelos BDL de 10 semanas de $12,8 \pm 0,3$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM, la MDF de los modelos PCS fue de $8,8 \pm 0,4$ Hz, para los modelos BDL de 6 semanas de $11,2 \pm 0,3$ Hz y para los modelos de BDL de 10 semanas de $12,8 \pm 0,2$ Hz. Durante los periodos de sueño REM, la MDF de los modelos PCS fue de $8,9 \pm 0,4$ Hz, para los modelos BDL de 6 semanas fue de $10,3 \pm 0,6$ Hz y los modelos BDL de 10 semanas de $12,8 \pm 0,2$ Hz.

En el análisis comparativo del EEG cuantitativo, se obtienen unas potencias relativas durante el periodo de vigilia a nivel cortical para el grupo PCS de δ : $23,2 \pm 5\%$; θ : $35,9 \pm 1\%$; α : $23,4 \pm 3\%$ y β : $17,4 \pm 2\%$. Para el grupo de BDL de 6 semanas durante el periodo de vigilia, las potencias relativas fueron δ : $14,9 \pm 1,6\%$; θ : $31,2 \pm 1\%$; α : $28,8 \pm 0,9\%$ y β : $25 \pm 1,8\%$. Para el grupo BDL de 10 semanas las potencias relativas durante la vigilia fueron δ : $13,4 \pm 0,5\%$; θ : $28,5 \pm 1,2\%$; α : $29,6 \pm 0,4\%$ y β : $28,3 \pm 1,3\%$.

Durante el periodo de sueño NREM, las potencias relativas del grupo PCS fueron δ : $24,3\pm 5,4\%$; θ : $36,5\pm 1,2\%$; α : $22,8\pm 2,8\%$ y β : $16,3\pm 1,9\%$. Para el grupo BDL de 6 semanas, las potencias relativas durante el NREM fueron δ : $17\pm 2\%$; θ : $29,6\pm 0,5\%$; α : $29,6\pm 1,4\%$ y β : $23,4\pm 1,9\%$. Para el grupo BDL de 10 semanas, las potencias relativas durante el sueño NREM fueron δ : $14\pm 0,9\%$; θ : $27,8\pm 0,8\%$; α : $32\pm 0,7\%$ y β : $25,9\pm 1,4\%$.

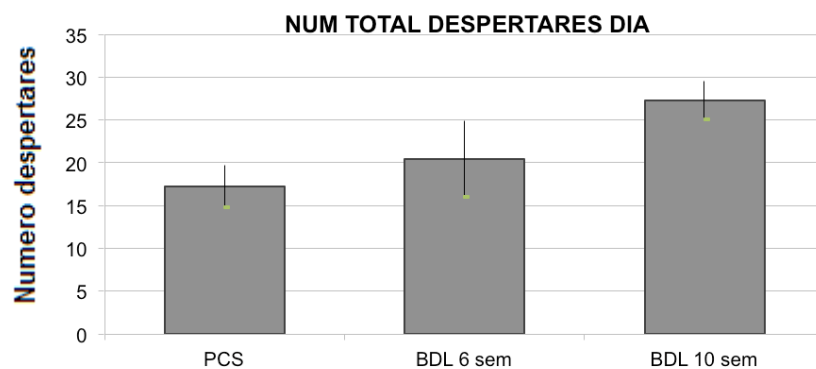


Figura 33. Número de despertares durante el sueño (PCS, BDL de 6 semanas y BDL de 10 semanas). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma según los diferentes estadios (WK, REM, NREM). Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a estadio despierto (WK) para determinar el número de despertares. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el número de despertares durante el sueño en ratas PCS y BDL de 6 y 10 semanas. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; BDL= Modelo de encefalopatía hepática por ligadura biliar; 6 sem= 6 semanas de evolución; 10 sem= 10 semanas de evolución.

Durante el periodo de sueño REM, las potencias relativas del grupo PCS fueron δ : $23,5\pm 5,8\%$; θ : $36,4\pm 1\%$; α : $22,7\pm 3\%$ y β : $17,2\pm 2\%$. Para el grupo BDL de 6 semanas, las potencias relativas durante el REM fueron δ : $16,5\pm 2,5\%$; θ : $30,9\pm 1,6\%$; α : $28\pm 2,1\%$ y β : $24,4\pm 2,6\%$. Para el grupo de 10 semanas, las potencias relativas a nivel cortical durante el sueño REM fueron δ : $13,2\pm 0,7\%$; θ : $28,4\pm 0,9\%$; α : $31,9\pm 1,2\%$ y β : $26,4\pm 1\%$.

5. Modelos SHAM y PCS tratadas con sildenafil frente a modelos SHAM y PCS no tratadas con sildenafil

En el análisis de sueño durante la noche los modelos SHAM se duermen 7 ± 1 veces durante la noche y los PCS $11,6 \pm 1$ veces. Respecto a los modelos expuestos al sildenafil, el grupo SHAM se duerme 14 ± 2 veces y los PCS con sildenafil 14 ± 2 veces, observándose que el grupo SHAM y PCS con sildenafil se duermen 7 (51%) y 2,7 (18,8%) veces más durante la noche que los modelos que no recibieron sildenafil respectivamente. (Ver Figura 34).

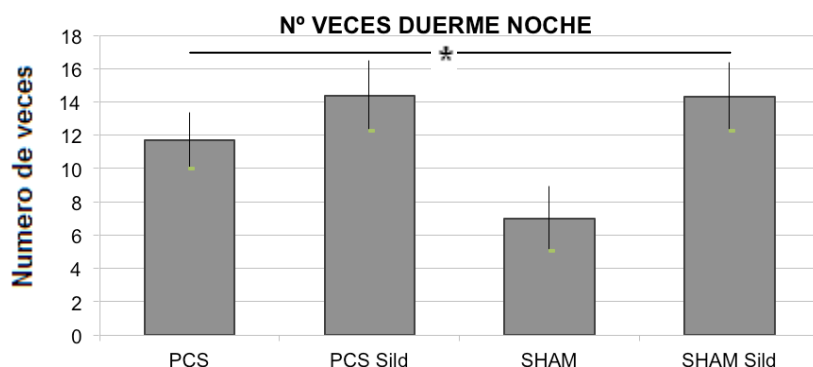


Figura 34. Número de veces que se duerme durante la noche (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadio despierto (WK) a estadios de sueño (REM y NREM) para determinar las veces en que se dormían durante el registro nocturno. Los valores son la media y el error estándar de la media del número de ratas analizadas. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el número de veces que duermen durante la noche en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

De manera similar, el grupo SHAM no expuesto al sildenafil duerme 50 ± 12 minutos durante la noche y los modelos SHAM expuestos duermen 168 ± 48 minutos, observando que el grupo de SHAM con sildenafil duerme 118 (70%) minutos más que el grupo SHAM sin sildenafil. Por el contrario, respecto a los modelos PCS, el grupo no expuestos al sildenafil duerme $187 \pm 43,91$ minutos y los PCS expuestos 140 ± 28 minutos, observando que el grupo

expuesto al sildenafil duerme 46 minutos (24,7%) menos durante la noche que las no expuestas. (Ver Figura 35).

En el análisis de proporción de fases durante el sueño nocturno, las SHAM con sildenafil tienen $7\pm 4\%$ de sueño REM, y las no expuestas al sildenafil un $1,8\pm 1\%$, observando que las SHAM con sildenafil tienen un 5% más de sueño en fase REM que las no expuestas al sildenafil. Respecto a los modelos PCS, las expuestas al sildenafil tienen un $15\pm 1\%$ de sueño en fase REM, y las no expuestas un $20,7\pm 3\%$, observando que las PCS con sildenafil tienen un 5,6% menos de sueño en fase REM que las no expuestas, sin embargo, el porcentaje de sueño REM siguen siendo significativamente mayor en el grupo PCS expuesto al sildenafil ($p < 0,05$) que en el grupo SHAM. (Ver Figura 36).

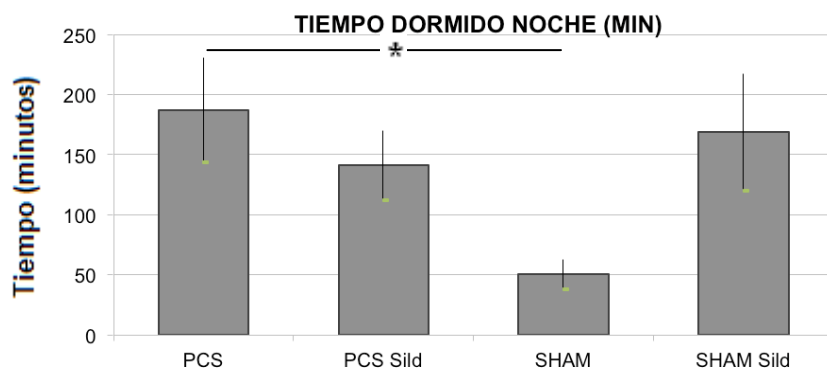


Figura 35. Tiempo dormido durante la noche (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se cuantificó el tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco ($*p < 0.05$). Las figuras muestran el tiempo dormido durante la noche en minutos en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

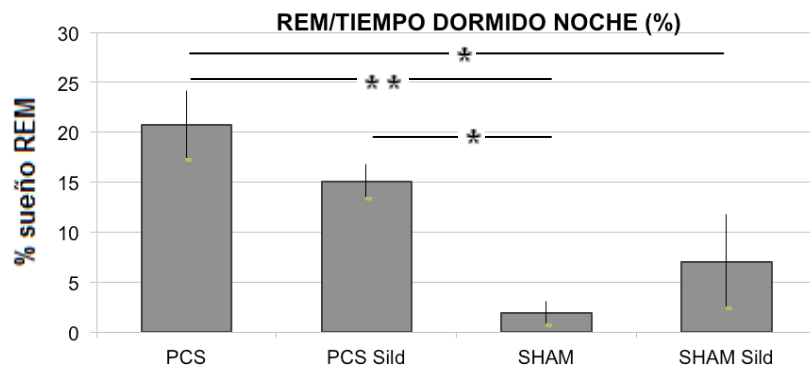


Figura 36. Proporción porcentual de sueño REM durante la noche (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

Analizando la proporción de sueño NREM, las ratas SHAM expuestas al sildenafil tienen un $90,6 \pm 4\%$ de sueño en fase NREM, y las SHAM no expuestas tienen un $98 \pm 1\%$, observando que las SHAM con sildenafil tienen un 7,5% menos de sueño en fase NREM que las SHAM sin sildenafil. Respecto al grupo de PCS, las expuestas al sildenafil tienen $85 \pm 1\%$ de sueño en fase NREM y las no expuestas un $79 \pm 3\%$, observando que las PCS con sildenafil tienen un 11% más de sueño en fase NREM que las no expuestas, sin embargo, el sildenafil no llega a recuperar el porcentaje de sueño NREM obtenido en el grupo SHAM, pues sigue observándose una diferencia significativa entre ellos ($p < 0,05$), aunque menos acusada que antes del tratamiento ($p < 0,01$). (Ver Figura 37).

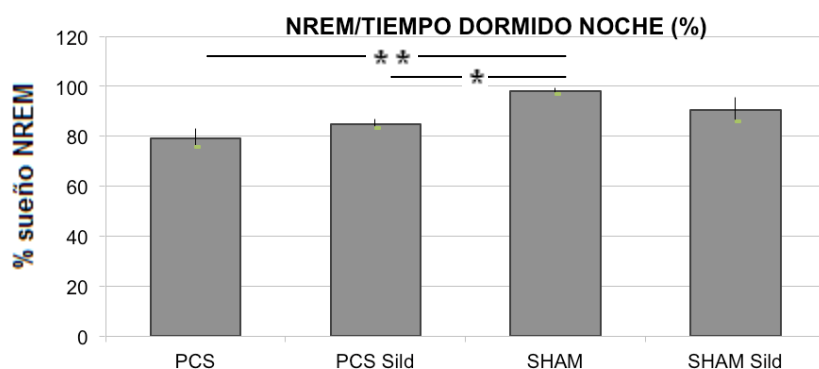


Figura 37. Proporción porcentual de sueño NREM durante la noche (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; Sham Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

En el análisis del sueño durante el día, los modelos SHAM expuestos al sildenafil pasan 261 ± 31 minutos dormidas, y las PCS con sildenafil $273,5 \pm 27$ minutos. Respecto a los grupos no expuestos al sildenafil, las SHAM pasan 368 ± 53 minutos dormidas y las PCS 320 ± 55 minutos, observando que los grupos SHAM y PCS con sildenafil pasan 107 (29%) y 47 (15%) minutos de tiempo menos dormidas durante el día que las no tratadas con sildenafil respectivamente. (Ver Figura 38).

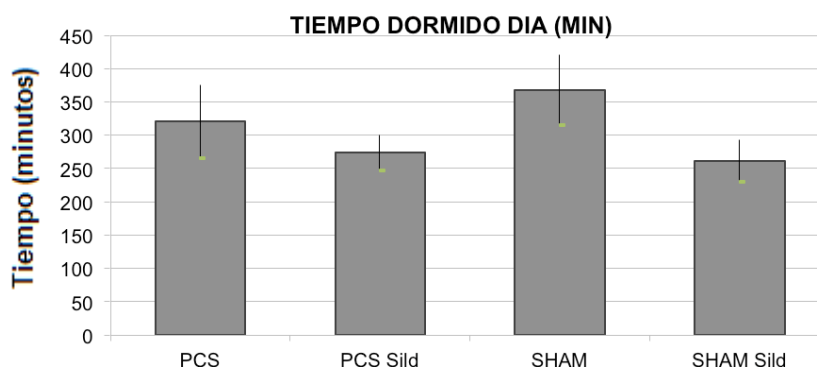


Figura 38. Tiempo dormido durante el día (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se encienden las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de oscuridad. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro diurno. Los valores son la media junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el tiempo

dormido durante el día en minutos en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

En el análisis proporcional de fases durante el sueño diurno, las SHAM con sildenafil tiene 20,3±5% de sueño en fase REM y las SHAM sin sildenafil 7,8±1%, observando que las SHAM con sildenafil tienen un 12,4% más de sueño en fase REM que las no expuestas al sildenafil. Respecto a los modelos PCS, los expuestos al sildenafil tienen un 16,7±1% de sueño en fase REM, y los no expuestos al sildenafil un 23,8±5%, observando que las PCS con sildenafil tienen un 7% menos de sueño en fase REM que las no expuestas. (Ver Figura 39).

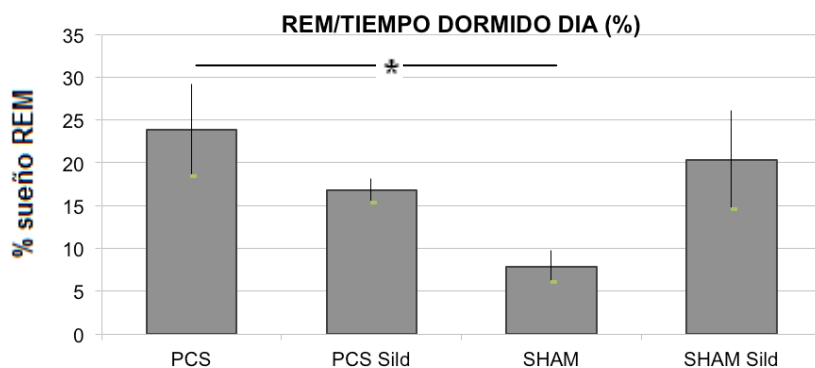


Figura 39. Proporción porcentual de sueño REM durante el día (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

Respecto a la proporción de sueño en fase NREM durante el día, las ratas SHAM expuestas al sildenafil tienen un 79,6±5% del sueño en fase NREM, y las no expuestas un 92±1%, observando que las SHAM con sildenafil tienen un 12,4% menos de sueño en fase NREM que las SHAM sin sildenafil. Respecto al grupo de las PCS, las expuestas al sildenafil tienen un 83,2±1% de sueño en fase NREM, y las no expuestas un 76±5%, observando que las PCS con sildenafil

tienen un 7% más de sueño en fase NREM que las no tratadas (Ver Figura 40).

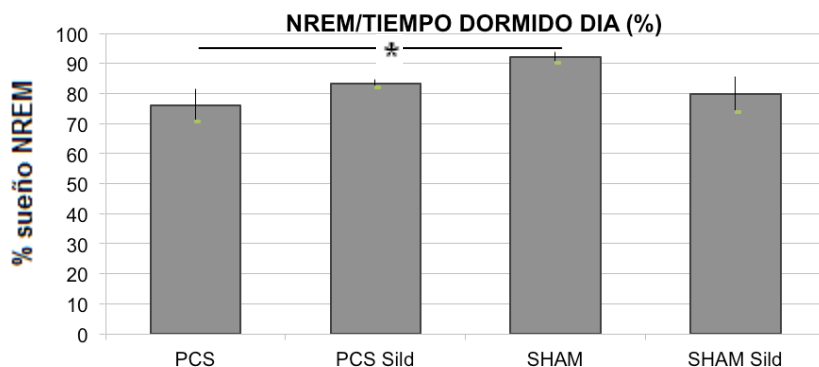


Figura 40. Proporción porcentual de sueño NREM durante el día (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

En el análisis de despertares durante el sueño, el grupo SHAM con sildenafil presentan 20 ± 7 despertares, las PCS con sildenafil $22,7 \pm 4$ despertares, los modelos SHAM no expuestos al sildenafil $17,7 \pm 3$ despertares y las PCS no expuestas al sildenafil $17,2 \pm 2$ despertares, observando que el grupo de SHAM y PCS con sildenafil tienen un 2,3 (11,5%) y un 5,5 (24%) más despertares que las SHAM y PCS sin sildenafil respectivamente (Ver Figura 41).

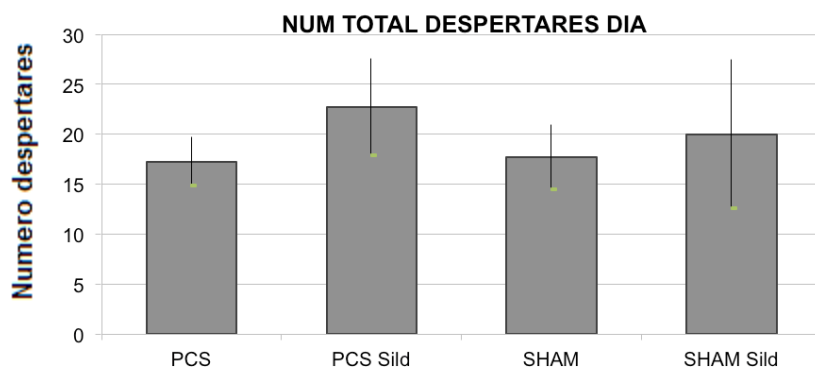


Figura 41. Número de despertares durante el sueño (SHAM y PCS con sildenafil, SHAM y PCS sin sildenafil). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma según los diferentes estadios (WK, REM, NREM). Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a

estadio despierto (WK) para determinar el número de despertares. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el número de despertares durante el sueño en ratas SHAM, SHAM Sild, PCS y PCS Sild. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM Sild= modelo de intervención simulada control en tratamiento con sildenafil; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS Sild= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil.

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma, durante el periodo de vigilia los modelos SHAM sin sildenafil presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $9,5 \pm 0,3$ Hz y los modelos SHAM con sildenafil de $10,2 \pm 0,1$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM, la MDF de los modelos SHAM sin sildenafil fue de $9,3 \pm 0,3$ Hz, y para los modelos SHAM con sildenafil de $10 \pm 0,2$ Hz. Durante los periodos de sueño REM, la MDF de los modelos SHAM sin sildenafil fue de $7,4 \pm 0,8$ Hz, y para los modelos SHAM con sildenafil fue de $10,2 \pm 0,1$ Hz.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas del EEG, se obtienen unas potencias relativas durante el periodo de vigilia en el grupo SHAM sin sildenafil de δ : $15,3 \pm 1\%$; θ : $32 \pm 1,6\%$; α : $27,7 \pm 1\%$ y β : $24,7 \pm 1,9\%$. Las potencias relativas para el grupo SHAM con sildenafil durante vigilia fueron δ : $11 \pm 0,8\%$; θ : $31,7 \pm 2\%$; α : $30,4 \pm 1,9\%$ y β : $26,7 \pm 0,7\%$.

Durante el periodo de sueño NREM, las potencias relativas del grupo SHAM sin sildenafil fueron δ : $18,2 \pm 2\%$; θ : $29,2 \pm 1\%$; α : $28,3 \pm 1,5\%$ y β : $24 \pm 2\%$. Para el grupo SHAM con sildenafil, las potencias relativas durante el sueño NREM fueron δ : $11,3 \pm 1\%$; θ : $31,2 \pm 3\%$; α : $31,3 \pm 3\%$ y β : $26 \pm 0,5\%$.

Durante el periodo de sueño REM, las potencias relativas para el grupo SHAM sin sildenafil fueron δ : $17,4 \pm 2\%$; θ : $29,2 \pm 1\%$; α : $26,4 \pm 2\%$ y β : $22 \pm 2\%$. Para el grupo SHAM con sildenafil las potencias relativas durante el REM fueron δ : $10,6 \pm 1\%$; θ : $28 \pm 1\%$; α : $35,2 \pm 2\%$ y β : $26 \pm 0,3\%$.

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma de los grupos PCS, durante el periodo de vigilia los modelos PCS sin sildenafil presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $8\pm 0,6$ Hz y los modelos PCS con sildenafil de $9,6\pm 0,2$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM, la MDF de los modelos PCS sin sildenafil fue de $7,8\pm 0,5$ Hz, y para los modelos PCS con sildenafil de $9,7\pm 0,1$ Hz. Durante los periodos de sueño REM, la MDF de los modelos PCS sin sildenafil fue de $8\pm 0,6$ Hz, y para los modelos PCS con sildenafil fue de $9,7\pm 0,1$ Hz.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas del EEG, se obtienen unas potencias relativas durante el periodo de vigilia en el grupo PCS sin sildenafil de δ : $23,2\pm 5,6\%$; θ : $35,9\pm 1\%$; α : $23,4\pm 3\%$ y β : $17,4\pm 2\%$. Las potencias relativas para el grupo PCS con sildenafil durante vigilia fueron δ : $16,8\pm 2,8\%$; θ : $30,3\pm 2,5\%$; α : $26,3\pm 2\%$ y β : $26,4\pm 2\%$. (Ver Tabla 3).

Durante el periodo de sueño NREM, las potencias relativas del grupo PCS sin sildenafil fueron δ : $24,3\pm 5\%$; θ : $36,5\pm 1\%$; α : $22,8\pm 2,8\%$ y β : $16,3\pm 1,9\%$. Para el grupo PCS con sildenafil, las potencias relativas durante el sueño NREM fueron δ : $15,8\pm 2\%$; θ : $29,8\pm 1\%$; α : $28,6\pm 2\%$ y β : $25,6\pm 1,7\%$. (Ver Tabla 3).

Durante el periodo de sueño REM, las potencias relativas para el grupo PCS sin sildenafil fueron δ : $23,5\pm 5,8\%$; θ : $36,4\pm 1\%$; α : $22,7\pm 3\%$ y β : $17,2\pm 2\%$. Para el grupo PCS con sildenafil las potencias relativas durante el REM fueron δ : $15,2\pm 2\%$; θ : $30,4\pm 1\%$; α : $28,2\pm 2\%$ y β : $26\pm 1\%$. (Ver Tabla 3).

Potencias Relativas (%)

PCS			
Ondas	Vigilia	Sueño REM	Sueño NREM
α	23,4 \pm 3	22,7 \pm 3	22,8 \pm 2,8
β	17,4 \pm 2	17,2 \pm 2	16,3 \pm 1,9
θ	35,9 \pm 1	36,4 \pm 1	36,5 \pm 1
δ	23,2 \pm 5,6	23,5 \pm 5,8	24,3 \pm 5
PCS Sildenafil			
Ondas	Vigilia	Sueño REM	Sueño NREM
α	26,3 \pm 2	28,2 \pm 2	28,6 \pm 2
β	26,4 \pm 2	26 \pm 1	25,6 \pm 1,7
θ	30,3 \pm 2,5	30,4 \pm 1	29,8 \pm 1
δ	16,8 \pm 2,8	15,2 \pm 2	15,8 \pm 2

Tabla 3. Porcentaje de Potencias Relativas (PCS con sildenafil y PSC sin sildenafil). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente el porcentaje de las potencias relativas de las diferentes ondas de actividad bioeléctrica cerebral. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. La tabla muestra el porcentaje de las potencias relativas durante la vigilia, el sueño REM y el sueño NREM en ratas PCS y PCS sildenafil. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS sildenafil= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con sildenafil; α = alfa; β = beta; θ = theta; δ = delta.

6. Modelo SHAM y PCS tratados con zolpidem frente modelos SHAM y PCS no tratados con zolpidem

En el análisis de sueño durante la noche, el grupo SHAM no expuesta al zolpidem se duerme 7 \pm 1 veces durante la noche, y los expuestos al zolpidem 7,5 \pm 3 veces, observando que el grupo SHAM con zolpidem se duermen 0,5 veces (7%) más durante la noche que las SHAM que no recibieron zolpidem. Respecto a los grupos PCS, los no expuestos al zolpidem se duermen 11,6 \pm 1 veces y las expuestas al zolpidem 10 \pm 3 veces, observando que las que recibieron tratamiento con zolpidem se duermen 1,1 veces (10%) menos durante la noche que las que no recibieron medicación (Ver Figura 42).

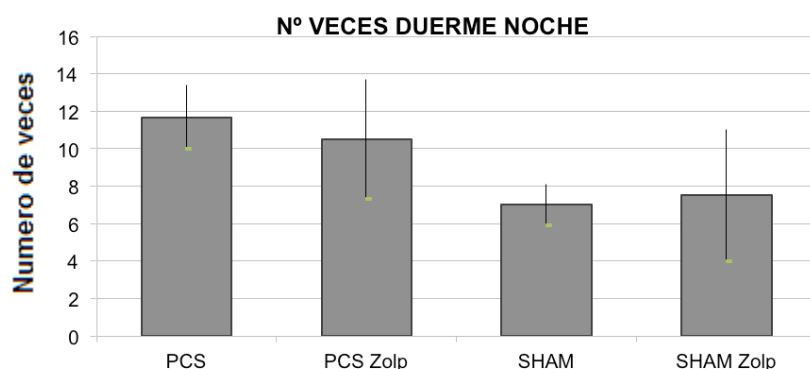


Figura 42. Número de veces que se duerme durante la noche (SHAM y PCS con zolpidem, SHAM y PCS sin zolpidem). Se analizo cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizo un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadio despierto (WK) a estadios de sueño (REM y NREM) para determinar las veces en que se dormían durante el registro nocturno. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el número de veces que duermen durante la noche en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

En el análisis del tiempo dormido durante la noche, los modelos SHAM no expuestos al zolpidem durmieron $50,3 \pm 12$ minutos, y los expuestos al zolpidem 76 ± 43 minutos, observando que el grupo de SHAM con zolpidem duerme 25,7 minutos (33,8%) más que el grupo SHAM sin zolpidem. Respecto a los grupos PCS, las no expuestas al zolpidem duermen $187,2 \pm 43$ minutos, y las expuestas al zolpidem $121,9 \pm 38$ minutos, observando que el grupo PCS expuesto al zolpidem duerme 65,3 (35%) minutos menos durante la noche que las no expuestas. (Ver Figura 43).

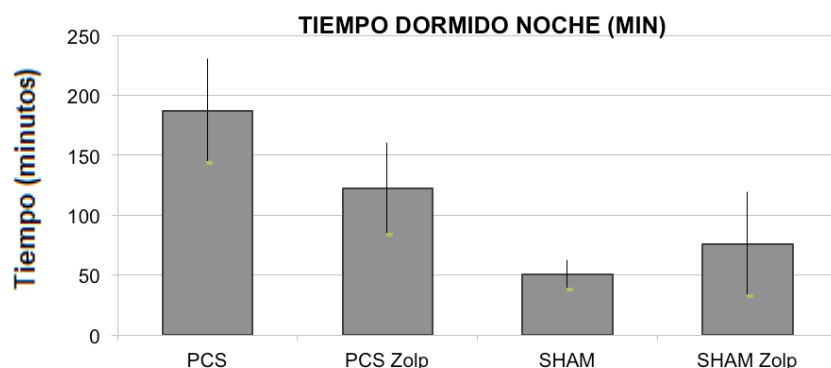


Figura 43. Tiempo dormido durante la noche (SHAM y PCS con zolpidem, SHAM y PCS sin zolpidem). Se analizo cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se apagan las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se realizo un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadio despierto (WK) a estadios de sueño (REM y NREM) para determinar el tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro nocturno. Los valores son la media,

junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

En el análisis proporcional de fases del sueño durante la noche, los modelos SHAM no expuestos al zolpidem tienen un $1,8 \pm 1\%$ de sueño en fase REM y las PCS no expuestas al zolpidem un $20,7 \pm 3\%$, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Respecto a los grupos expuestos al zolpidem, las SHAM tienen $30,6 \pm 1\%$ y las PCS $26,5 \pm 4\%$, observando que durante el sueño nocturno, las SHAM y PCS expuestas al zolpidem tienen un 29% y un 6% más de sueño en fase REM que las no expuestas al zolpidem respectivamente, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre los grupos SHAM. (Ver Figura 44).

En el análisis de la proporción de sueño en fase NREM, los modelos SHAM no expuestos al zolpidem tienen un $98 \pm 1\%$ de sueño en fase NREM, y las PCS no expuestas un $79 \pm 3\%$, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Referente a los modelos expuestos al zolpidem, las SHAM tienen $69,3 \pm 1\%$ de sueño en fase NREM, y las PCS un $73,4 \pm 4\%$, observando que las SHAM y PCS con zolpidem tienen un 28,8% y 5,8% menos de sueño en fase NREM que las SHAM y PCS sin zolpidem respectivamente. Esta disminución es estadísticamente significativa en el caso del grupo SHAM tratado con zolpidem con respecto a los no tratados ($p < 0,001$). (Ver Figura 45).

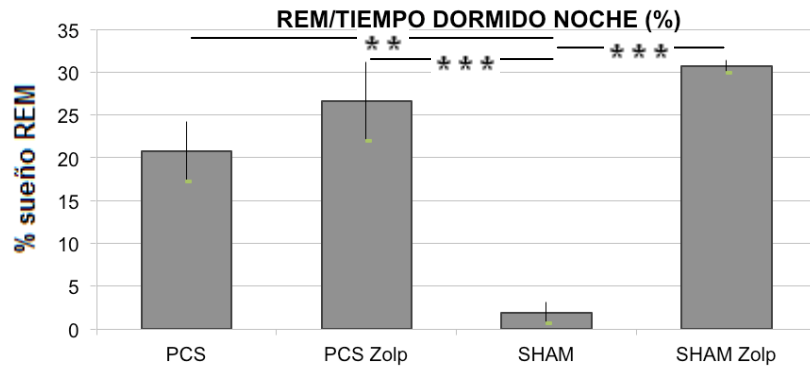


Figura 44. Proporción porcentual de sueño REM durante la noche (SHAM y PCS con zolpidem, SHAM y PCS sin zolpidem). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según las diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

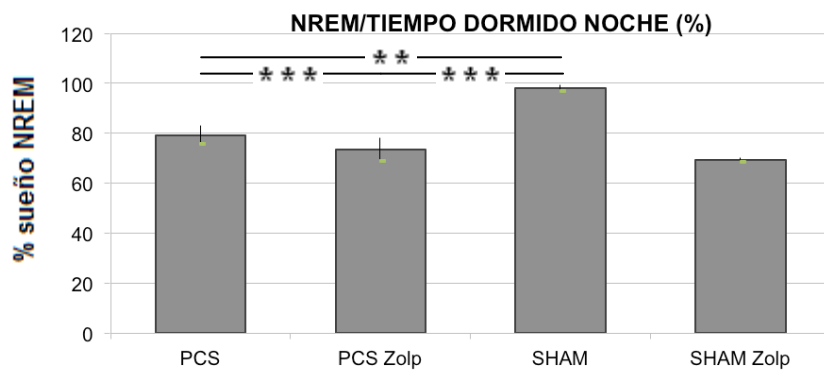


Figura 45. Proporción porcentual de sueño NREM durante la noche (SHAM y PCS con zolpidem, SHAM y PCS sin zolpidem). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según las diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante la noche. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño y NREM con respecto al tiempo dormido durante la noche en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

En el análisis del sueño durante el día, los modelos SHAM no expuestos al zolpidem duermen 368 ± 53 minutos y las expuestas 302 ± 103 minutos, observando que el grupo SHAM

expuesto al zolpidem pasa 66 minutos (18%) de tiempo menos dormidas que las no expuestas al zolpidem. Lo contrario ocurre al analizar el grupo de PCS, donde las no expuestas al zolpidem duermen 320 ± 55 minutos y las expuestas 346 ± 65 minutos, observando que las PCS expuestas al zolpidem pasan 25,5 (7,3%) minutos más de tiempo dormidas que las no expuestas. (Ver Figura 46).

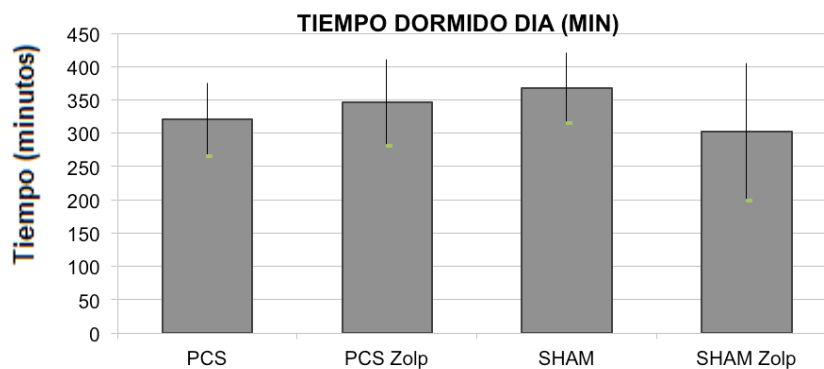


Figura 46. Tiempo dormido durante el día (SHAM y PCS con zolpidem, SHAM y PCS sin zolpidem). Se analizó cualitativamente el electroencefalograma, fraccionándolo desde el momento en el que se encienden las luces, hasta nuevamente el inicio del ciclo de oscuridad. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del tiempo en minutos que duraban en estadios de sueño (REM y NREM) durante el registro diurno. Los valores son la media junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el tiempo dormido durante el día en minutos en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

En el análisis proporcional de fases durante el sueño diurno, las SHAM expuestas al zolpidem tienen un $18,6 \pm 1\%$ de sueño en fase REM, y las no expuestas un $7,8 \pm 1\%$, observando que las SHAM con zolpidem tienen un 11% más de sueño en fase REM que las no tratadas con zolpidem, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa. Referente a los modelos PCS, los que recibieron zolpidem tienen un $22,3 \pm 3\%$ de sueño en fase REM, y las que no lo recibieron un $23,8 \pm 5\%$, observando que las PCS con zolpidem tienen un 1,5% menos de sueño en fase REM que las no lo recibieron. (Ver Figura 47).

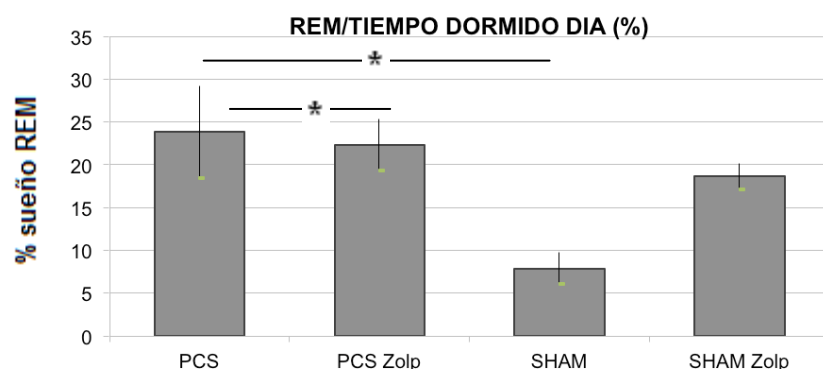


Figura 47. Proporción porcentual de sueño REM durante el día (SHAM y PCS con zolpidem, SHAM y PCS sin zolpidem). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase REM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño REM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

Respecto a la proporción de sueño en fase NREM, las SHAM expuestas la zolpidem tienen un $81,3 \pm 1\%$ de sueño en fase NREM, y las no expuestas un $92 \pm 1\%$, observando que las SHAM con zolpidem tienen un 11% menos que las SHAM sin zolpidem. Respecto a las PCS, las expuestas al zolpidem tienen un $78 \pm 3\%$ de sueño en fase NREM, y las no expuestas un $76 \pm 5\%$, observando que las PCS con zolpidem tienen un 2% más de sueño en fase NREM que las no expuestas. (Ver Figura 48).

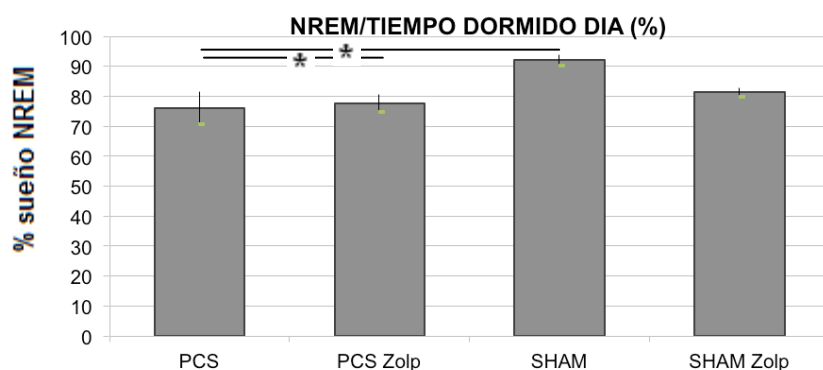


Figura 48. Proporción porcentual de sueño NREM durante la día (SHAM y PCS con zolpidem, SHAM y PCS sin zolpidem). Se analizó el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente la proporción de sueño en fase NREM del total del tiempo dormidas durante el día. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (* $p < 0.05$). Las figuras muestran el porcentaje de sueño NREM con respecto al tiempo dormido durante el día en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM=

modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

En el análisis de despertares durante el sueño, el grupo de las SHAM tratadas con zolpidem tiene $13,8 \pm 4$ despertares y las no tratadas con zolpidem $17,7 \pm 3$ despertares, observando que el grupo de SHAM con zolpidem tienen 4 despertares (29%) menos que las no tratadas. Al analizar los grupos PCS, las no expuestas a zolpidem tienen $17,2 \pm 2$ despertares y las expuestas $20,4 \pm 4$ despertares, observando que los modelos PCS que recibieron tratamiento con zolpidem tienen 3 despertares (15,5%) más que las no expuestas al tratamiento (Ver Figura 49).

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma de los grupos SHAM, durante el periodo de vigilia los modelos SHAM sin zolpidem presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $12 \pm 0,3$ Hz y los modelos SHAM con zolpidem de $9,3 \pm 0,2$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM, la MDF de los modelos SHAM sin zolpidem fue de $11,8 \pm 0,3$ Hz, y para los modelos SHAM con zolpidem de $9,3 \pm 0,2$ Hz. Durante los periodos de sueño REM, la MDF de los modelos SHAM sin zolpidem fue de $9,7 \pm 1,2$ Hz, y para los modelos SHAM con zolpidem fue de $9,4 \pm 0,2$ Hz.

En el análisis cuantitativo de potencias relativas del EEG, durante el periodo de vigilia el grupo SHAM sin zolpidem se obtienen una potencias relativas para las bandas δ : $15,3 \pm 1\%$; θ : $32 \pm 1,6\%$; α : $27,7 \pm 1\%$ y β : $24,7 \pm 1,9\%$. Para el grupo SHAM con zolpidem, las potencias relativas durante la vigilia fueron δ : $21,8 \pm 1,4\%$; θ : $26 \pm 2\%$; α : $28,6 \pm 1\%$ y β : $23,3 \pm 1,5\%$.

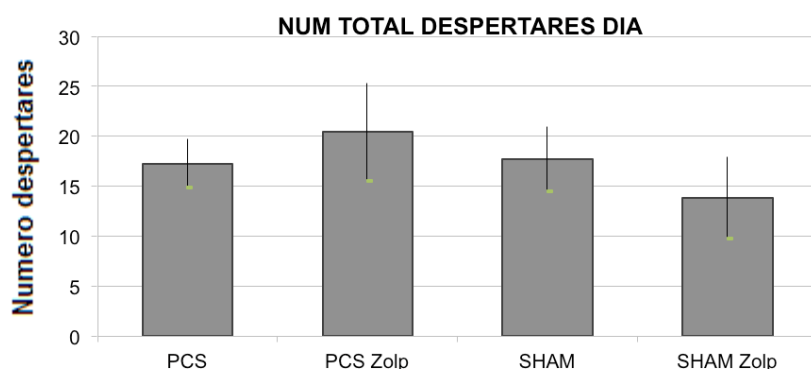


Figura 49. Numero de despertares durante el sueño. Se analizo cualitativamente el electroencefalograma según los diferentes estadios (WK, REM, NREM). Posteriormente se realizo un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a estadio despierto (WK) para determinar el número de despertares. Los valores son la media, junto el error estándar de la media del número de ratas analizado. Las figuras muestran el numero de despertares durante la el sueño en ratas SHAM, SHAM zolp, PCS y PCS zolp. SHAM= modelo de intervención simulada control; SHAM zolp= modelo de intervención simulada control en tratamiento con zolpidem; PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolp= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem.

Durante el periodo de sueño NREM, las potencias relativas para el grupo SHAM sin zolpidem fueron δ : $18,2\pm 2\%$; θ : $29,2\pm 1\%$; α : $28,3\pm 1,5\%$; β : $24\pm 2\%$. Para el grupo de SHAM con zolpidem, las potencias relativas durante el NREM fueron δ : $19,8\pm 1\%$; θ : $27\pm 2,5\%$; α : $29,4\pm 1\%$ y β : $23,5\pm 1,9\%$.

Durante el periodo de sueño REM, las potencias relativas para el grupo SHAM sin zolpidem fueron δ : $22\pm 5\%$; θ : $29,2\pm 1\%$; α : $28,6\pm 1,5\%$ y β : $22\pm 2,5\%$. Para el grupo SHAM con zolpidem, las potencias relativas durante el periodo REM fueron δ : $20,3\pm 1\%$; θ : $26,7\pm 2,6\%$; α : $29\pm 1,6\%$ y β : $23,7\pm 1,9\%$.

En el análisis cuantitativo del electroencefalograma de los grupos PCS, durante el periodo de vigilia los modelos PCS sin zolpidem presentan una frecuencia media dominante (MDF) de $9,1\pm 0,6$ Hz y los modelos PCS con zolpidem de $8,5\pm 0,7$ Hz. Durante los periodos de sueño NREM, la MDF de los modelos PCS sin zolpidem fue de $8,8\pm 0,4$ Hz, y para los modelos PCS con zolpidem de $8,7\pm 0,7$ Hz. Durante los periodos de sueño REM, la MDF de los modelos PCS sin zolpidem fue

de $8,9 \pm 0,4$ Hz, y para los modelos PCS con zolpidem fue de $8,9 \pm 0,6$ Hz.

En el análisis cuantitativo de potencias relativas del EEG, durante el periodo de vigilia el grupo PCS sin zolpidem se obtienen una potencias relativas para las bandas δ : $23,2 \pm 5,6\%$; θ : $35,9 \pm 1\%$; α : $23,4 \pm 3\%$ y β : $17,4 \pm 2\%$. Para el grupo PCS con zolpidem, las potencias relativas durante la vigilia fueron δ : $29,7 \pm 6\%$; θ : $37,2 \pm 1\%$; α : $20 \pm 2,5\%$ y β : $15,7 \pm 0,8\%$. (Ver Tabla 4).

Potencias Relativas (%)

PCS			
Ondas	Vigilia	Sueño REM	Sueño NREM
α	$23,4 \pm 3$	$22,7 \pm 3$	$22,8 \pm 2,8$
β	$17,4 \pm 2$	$17,2 \pm 2$	$16,3 \pm 1,9$
θ	$35,9 \pm 1$	$36,4 \pm 1$	$36,5 \pm 1$
δ	$23,2 \pm 5,6$	$23,5 \pm 5,8$	$24,3 \pm 5$
PCS Zolpidem			
Ondas	Vigilia	Sueño REM	Sueño NREM
α	$20 \pm 2,5$	$20,8 \pm 2$	$20,5 \pm 2$
β	$15,7 \pm 0,8$	$16,6 \pm 0,7$	$15,4 \pm 0,8$
θ	$37,2 \pm 1$	$34,3 \pm 3$	$37,6 \pm 1,3$
δ	$29,7 \pm 6$	$28,2 \pm 6$	$29,4 \pm 5,9$

Tabla 4. Porcentaje de Potencias Relativas (PCS con zolpidem y PCS sin zolpidem). Se analizo el electroencefalograma cualitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para posteriormente analizar cuantitativamente el porcentaje de las potencias relativas de las diferentes ondas de actividad bioelectrica cerebral. Los valores son la media, junto con el error estándar de la media del número de ratas analizado. La tabla muestra el porcentaje de las potencias relativas durante la vigilia, el sueño REM y el sueño NREM en ratas PCS y PCS zolpidem. PCS= modelo de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava; PCS zolpidem= modelos de encefalopatía hepática por anastomosis porto-cava en tratamiento con zolpidem; α = alfa; β = beta; θ = theta; δ = delta.

Durante el periodo de sueño NREM, las potencias relativas para el grupo PCS sin zolpidem fueron δ : $24,3 \pm 5\%$; θ : $36,5 \pm 1\%$; α : $22,8 \pm 2,8\%$ β : $16,3 \pm 1,9\%$. Para el grupo de PCS con zolpidem, las potencias relativas durante el NREM fueron δ : $29,4 \pm 5,9\%$; θ : $37,6 \pm 1,3\%$; α : $20,5 \pm 2\%$ y β : $15,4 \pm 0,8\%$. (Ver Tabla 4).

Durante el periodo de sueño REM, las potencias relativas para el grupo PCS sin zolpidem fueron δ : $23,5 \pm 5,8\%$; θ : $36,4 \pm 1\%$; α : $22,7 \pm 3\%$ y β : $17,2 \pm 2\%$. Para el grupo PCS con zolpidem, las potencias relativas durante el periodo REM fueron δ : $28,2 \pm 6\%$; θ : $34,3 \pm 3\%$; α : $20,8 \pm 2\%$ y β : $16,6 \pm 0,7\%$. (Ver Tabla 4).

DISCUSSION

V. Discusión

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico presente en más de 200.000 pacientes con enfermedades hepáticas en España, que conduce a alteraciones en el sueño, alteraciones cognitivas, motoras y de la consciencia. En pacientes con cirrosis hepática sin evidencia clínica de EH, la prevalencia de alteraciones en el sueño es del 50%, en comparación con el 5% en la población general. Ya en 1972, Kurtz et al. (94) estudió las alteraciones en el sueño nocturno en pacientes con encefalopatía hepática porta-cava, evidenciando una reducción del tiempo total de sueño y de fases de sueño lento, junto a un déficit de sueño REM, y frecuentes despertares nocturnos en pacientes en etapas tempranas de encefalopatía.

Estudios más recientes realizados por Blei et al. (95) y Cordoba et.al (11) en 1998, confirmaron que una de las primeras alteraciones neurológicas que presentan los pacientes con enfermedades hepáticas es la alteración en los ritmos de sueño y vigilia, con una latencia de sueño aumentada, un total de tiempo de sueño reducido, y una fragmentación del sueño nocturno con frecuentes despertares, asociados a episodios de somnolencia indeseada durante el día. También parecen tener desplazado el ritmo circadiano de niveles de melatonina en sangre (96), relacionado con los ritmos de sueño.

En la actualidad, estudios en ratas con encefalopatía hepática secundaria a derivación portocava han descrito niveles de melatonina alterados en la glándula pineal durante el día, asociándolo a alteraciones del ritmo circadiano en la actividad motora (97, 98), reducción del tiempo total de sueño, deteriorando tanto el tiempo de sueño REM como el NREM, junto a una fragmentación del sueño con aumento de despertares. Estas alteraciones de la arquitectura del sueño

y la actividad motora en ratas con derivación portocava son similares a las alteraciones del sueño en pacientes cirróticos.

En el 2012, Llansola M. y col. (108) publicaron un estudio donde describen igualmente una reducción significativa del sueño REM y del NREM, asociado a un aumento de la fragmentación del sueño en ratas con derivación portocava (PCS), similar a la presente en pacientes con encefalopatía hepática. También analizaron el papel de una dieta hiperamonemica en las alteraciones del sueño y el curso temporal de las mismas en los diferentes modelos experimentales. Describieron así que la disminución del sueño en ratas PCS ocurría a las 4 semanas, y empeoraba a las 7 y 11 semanas, y la fragmentación del sueño no aparecía hasta las 7 semanas, empeorando a las 11 semanas. Así mismo, las ratas expuestas a una dieta hiperamonemica mostraban una disminución del sueño REM a partir de las 7 semanas, pero sin cambios significativos en el sueño NREM ni en la fragmentación del sueño, concluyendo que las ratas PCS son un buen modelo para estudiar las alteraciones del sueño en la encefalopatía hepática, sus mecanismos y administrar potenciales tratamientos para revertir dichas alteraciones.

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de esta tesis es la caracterización de las alteraciones del sueño en los diferentes modelos experimentales, se ha analizado electroencefalográficamente la actividad cerebral durante el sueño de diferentes modelos de encefalopatía hepática en ratas, evidenciando en los modelos PCS una tendencia al desplazamiento del ciclo del sueño, aumentando sus tiempos de sueño durante los periodos de actividad motora y disminuyendo durante los periodos de descanso, reflejando así un mayor grado de somnolencia durante sus tiempos de actividad. Por otra parte, al realizar un análisis comparativo, los modelos PCS presentan una menor proporción de sueño NREM frente los modelos BDL y modelos no encefalopáticos.

De manera similar a los modelos PCS, los modelos BDL de 6 semanas presentan una tendencia a la inversión de ciclo del sueño, mostrando así una mayor somnolencia durante sus tiempos de actividad; cambios no observados en los modelos BDL de 10 semanas, en los que se evidencia un deterioro de la continuidad del sueño con aumento del fraccionamiento del mismo pero sin desplazamiento del ciclo. Referente a las proporciones de fases del sueño, los modelos BDL de 6 semanas también presentan un comportamiento similar a las PCS, observando una disminución de la proporción del sueño NREM, contrario a los modelos BDL de 10 semanas donde la mayor afectación que se observa es el decremento de la proporción del sueño REM.

Al analizar los efectos de una dieta hiperamonémica sobre la arquitectura del sueño, se evidencia una potenciación de la fragmentación del mismo con un importante aumento del número de despertares, sin un cambio significativo en las proporciones del sueño REM y NREM respecto a las no expuestas a la dieta.

En la actualidad, varias investigaciones, y entre ellas, las citadas por Cirelli y Tononi en el 2008, señalan que el sueño afecta a todo el organismo, y su efecto más importante lo tiene en el cerebro (99). De hecho existe ya un consenso general de que el sueño está estrictamente relacionado con la memoria, el aprendizaje y la plasticidad neuronal (100, 101, 102).

Aunque la relación entre memoria, sueño y plasticidad neuronal es ampliamente aceptada y ha sido, y está siendo, profundamente estudiada, todavía no se comprende totalmente (103). Los investigadores opinan que la consolidación de la memoria tiene lugar principalmente durante el sueño porque, debido a que las mismas redes neuronales son utilizadas para el procesamiento de los factores estresantes agudos, por lo que este proceso de consolidación interferiría con una adecuada codificación y recuperación durante la vigilia (104).

Hoy en día existen dos teorías principales que explican esta relación. Por una parte, diversas evidencias apuntan a la hipótesis de la homeostasis sináptica, esto es, el sueño facilitaría la disminución y debilitamiento de las sinápsis producidas durante la vigilia en los múltiples procesos de aprendizaje, con el fin de consolidar lo aprendido pero manteniendo la capacidad del cerebro para seguir aprendiendo. Durante la vigilia se produce un aumento gradual de la fuerza sináptica lo que conlleva un alto coste energético y una saturación del proceso de aprendizaje. El sueño permite una vuelta a la normalidad de las sinapsis corticales, disminuyendo el consumo de energía desaturando el sistema para que pueda seguir aprendiendo (99, 101). Por otra parte, otras evidencias parecen apoyar el modelo de consolidación basado en la reactivación durante el sueño de las mismas áreas que estuvieron activas en la vigilia (101). Según Urbain (105), esta teoría, a la que él llama teoría del diálogo hipocampo - neocortical, se basa en que el sueño consolida la memoria reactivando los patrones neuronales dependientes del aprendizaje durante el sueño. Esto permite la reorganización y redistribución de la nueva información en un grupo de representaciones nemotécnicas preexistentes con una transferencia progresiva de información almacenada en el hipocampo a las zonas neocorticales (103).

Tradicionalmente, profesionales del sueño han considerado que los dos principales tipos de memoria: la memoria procedimental (o no declarativa), independiente del hipocampo, y la memoria declarativa, dependiente del hipocampo, se consolidan respectivamente en el sueño REM y en los estadios profundos del NREM (103). Es la llamada teoría de los procesos duales. Pero, a día de hoy, esta teoría se considera excesivamente simple, y las evidencias han dado paso a una diferente teoría llamada la hipótesis secuencial o doble escalón. Según esta hipótesis los procesos de consolidación involucran tanto al sueño NREM como al REM, independientemente del tipo de memoria. Lo que lleva a la consolidación de lo que todavía es una huella débil de memoria es la repetición de los

ciclos de sueño NREM seguido por sueño REM. Por lo tanto, el sueño NREM favorecería una consolidación del sistema de memoria y es el sueño REM quien permitiría el adecuado procesamiento local de consolidación a nivel sináptico, donde las representaciones de memoria cortical serían consolidadas más a fondo (101, 106).

Dentro de las características fisiológicas del sueño NREM, esta que durante este, el cerebro se encuentra en un momento de anabolismo, es decir, sintetizando nuevas moléculas (proteínas, ácidos grasos, glucógeno...etc) para restaurar lo consumido durante la vigilia. El gasto energético originado durante el día debería recuperarse en el estado de reposo cuando el organismo presenta niveles reducidos de consumo de oxígeno, disminución del ritmo cardíaco y descenso del tono muscular (variaciones fisiológicas que se dan sólo durante el estado NREM). También se ha observado un consumo menor de glucosa comparado con la vigilia (107). En base a esto, varias investigaciones han afirmado que el sueño NREM tiene un importante papel en la recuperación y restauración (103) tanto física como neurológica.

Basándonos en estas hipótesis, podríamos en parte explicar la mayor somnolencia de los modelos PCS y BDL de 6 semanas durante sus periodos de actividad, sin importante desestructuración del sueño ni fragmentación del mismo, pero si con un decremento de las proporciones de sueño NREM en estos modelos, lo que favorecería así una alteración en la recuperación de la energía física y recuperación tanto corporal como neurológica (atención y vigilia), empeorando indirectamente su somnolencia durante los tiempos de actividad. De igual manera, teniendo en cuenta que el decremento de las proporciones de sueño en los modelos BDL de 10 semanas es principalmente de la fase REM, estos podrían manifestar de una forma más marcada respecto a los demás modelos encefalopáticos, una alteración en la consolidación de la memoria.

Actualmente, no solo el análisis cualitativo de la actividad electroencefalográfica ha aportado información sobre la actividad bioeléctrica cerebral. En las últimas décadas, el análisis cuantitativo del electroencefalograma (qEEG) ha realizado también contribuciones importantes en el ámbito de la investigación. En el EEG cuantitativo, cada derivación electroencefalográfica representa una mezcla de frecuencias las cuales pueden ser separadas mediante el procedimiento matemático conocido como Análisis de Fourier. Por medio del mismo, la señal EEG de cada derivación se transforma del dominio del tiempo al dominio de la frecuencia, y en lugar de tener oscilaciones de voltaje en función del tiempo, se tendrán valores de potencia en función de la frecuencia, los cuales surgen de elevar al cuadrado los valores de amplitud de cada una de las ondas en que se ha descompuesto la actividad correspondiente a cada derivación.

Entre las medidas espectrales más utilizadas en las investigaciones clínicas se encuentra la potencia absoluta y la potencia relativa. La potencia absoluta es el área representada bajo la curva del espectro, mientras que la potencia relativa representa el porcentaje de actividad en una banda respecto a la totalidad de las bandas estudiadas. Una de las limitaciones de la potencia absoluta, es su variación con la edad, lo que hace difícil decidir cuánto se encuentra dentro de los parámetros anormales para los sujetos en estudio.

Dado que la electrogénesis neuronal está influenciada por numerosos factores, incluyendo la presencia de toxinas circundantes, desbalance de electrolitos y cambios en el sistema metabólico, en el área de investigación de la encefalopatía hepática, el análisis EEG cuantitativo ha tomado un gran interés en investigación, mostrando un incremento en las potencias relativas de la actividad theta y un decremento de las potencias relativas de las bandas alfa en pacientes con cirrosis que no tienen evidencia clínica de encefalopatía (109). Martino ME y col. (110) publicaron en el 2014 un estudio

donde se analizó cuantitativamente las alteraciones electroencefalográficas en pacientes cirróticos sin encefalopatía hepática clínica evidente, describiendo un aumento del poder de la banda theta y de su frecuencia dominante media promedio, concluyendo así que el análisis cuantitativo del EEG resulta una herramienta útil para la evaluación funcional de la actividad cerebral en la encefalopatía hepática y su seguimiento.

Con base a estos resultados evidenciados en investigaciones previas, analizamos cuantitativamente la actividad cerebral registrada en el electroencefalograma de los diferentes modelos animales de encefalopatía hepática, evidenciando en los modelos PCS un aumento de las potencias relativas de la banda theta tanto en vigilia, como en fase REM y NREM del sueño, asociado a un descenso de la potencia relativa de la banda alfa, comparativamente con los modelos no encefalopáticos, resultados similares a los publicados en estudios cuantitativos sobre pacientes cirróticos sin encefalopatía hepática clínica evidente.

Esta alteración de la actividad bioeléctrica cerebral se produce también, aunque de una manera parcial en los modelos encefalopáticos por ligadura biliar (BDL), evidenciado un aumento de la potencia relativa de la banda theta en los modelos BDL de 6 semanas, sin alteración de la potencia de la banda alfa tanto en vigilia como en sus diferentes fases del sueño; y un descenso de la potencia relativa de la banda alfa en los modelos BDL de 10 semanas, pero sin alteración en la potencia relativa de la banda theta, hallazgos similares a los evidenciados cuando analizamos los efectos de una dieta hiperamonémica, donde la alteración evidenciada es sobre las potencias alfa, sin repercutir sobre las potencias relativas de la banda theta.

Basados en las alteraciones de la arquitectura del sueño y los hallazgos cuantitativos de la actividad bioeléctrica cerebral obtenidos en esta tesis, y teniendo en cuenta los mecanismos

moleculares responsables de las mismas, hemos evaluado los efectos neurofisiológicos de posibles intervenciones farmacológicas que podrían ser nuevas alternativas terapéuticas en un futuro para la mejora de la calidad de vida de los pacientes con encefalopatía hepática.

La primera intervención farmacológica se ha realizado con zolpidem, que es un análogo de benzodiazepinas, pero no una benzodiazepina en sí, sino un fármaco hipnótico del grupo de los llamados Fármacos Z, con una estructura imidazopiridínica que lo hace parecido a ellas. La modulación de la subunidad receptor GABA-A, un canal complejo de cloro, es la responsable de las propiedades de los medicamentos sedantes, anticonvulsivos, ansiolíticos, y miorreajantes. El sitio principal de acción del fármaco modulador se encuentra dentro de la subunidad alfa del complejo GABA-receptor que se conoce como el receptor benzodiazepínico u omega. Al menos tres subtipos de receptor de los ácidos grasos omega han sido identificados dentro del sistema nervioso central. Aunque el zolpidem está químicamente relacionado con las benzodiazepinas o barbitúricos, e interactúa con el complejo receptor GABA-benzodiazepina, no comparten algunas características farmacológicas de las benzodiazepinas. En contraste con las benzodiazepinas, que interactúan de manera no selectiva con los tres subtipos de ácidos grasos omega-receptor conocidos, el zolpidem se une preferentemente a los receptores de ácidos grasos omega-1, que se encuentran principalmente en la lámina IV de las regiones corticales sensoriomotoras, la sustancia negra, el cerebelo capa molecular, el bulbo olfatorio, el complejo talámico ventral, la protuberancia, el colículo inferior y el globo pálido. Si bien no es absoluta, la selectividad relativa de zolpidem para el subtipo 1 del receptor omega puede explicar su falta de efectos ansiolíticos, relajantes musculares y anticonvulsivos a las dosis hipnóticas normalmente prescritas. Los estudios sobre el sueño en animales y seres humanos indican que el zolpidem normalmente conserva el sueño NREM (etapas 3 y 4) y que los cambios de menor importancia en el sueño REM se producen de manera inconsistente. El zolpidem se une en un 92% a las proteínas plasmáticas y su metabolismo

hepático produce metabolitos inactivos que se excretan principalmente en la orina. La vida media de eliminación es de aproximadamente 2,2 horas en pacientes con las funciones hepática y renal normales pero sus parámetros farmacocinéticos se alteran con la edad avanzada y con alteraciones de la función hepática, por lo que se desaconseja su uso en enfermos con afectaciones hepáticas severas.

Al analizar el efecto del zolpidem en la arquitectura del sueño de nuestros modelos PCS, evidenciamos una disminución de la somnolencia durante sus tiempos de actividad, asociado a un aumento del tiempo de sueño durante su periodo de descanso y un aumento de la proporción del sueño NREM, lo que indirectamente favorecería su recuperación del gasto energético, recuperación corporal y neurológica.

Sin embargo, al analizar los efectos del zolpidem en la actividad bioeléctrica cerebral cuantitativamente (EEGq), observamos que no solo favorece un aumento de la potencia relativa de la banda theta, sino que también un decremento de la potencia relativa de la banda alfa, empeorando proporcionalmente los efectos de la encefalopatía hepática en la actividad cerebral.

En la actualidad se han descrito múltiples etologías y mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la encefalopatía hepática con diversas hipótesis que comparten el origen metabólico de esta entidad y la ausencia de lesiones neuronales. Una de las diferentes hipótesis formuladas, es la que implica al amoniaco, el cual proviene del metabolismo bacteriano en el tracto digestivo que en condiciones normales es conducido al hígado donde se transforma en urea excretándose a través de la orina y las heces. En los pacientes con encefalopatía hepática, hay un incremento de su concentración plasmática que atraviesa la barrera hematoencefálica provocando

un conjunto de alteraciones estructurales y funcionales a nivel cerebral.

La hipótesis del GABA o de las benzodiazepinas endógenas sostiene que en la encefalopatía hepática existe un aumento de neurotransmisores del sistema neuroinhibidor gabaérgico, ya sea por acción directa del ácido gamma-aminobutírico (GABA) o bien por benzodiazepinas endógenas, reduciendo el nivel de actividad neuronal. El zolpidem es un agonista del receptor de benzodiazepina que actúa sobre los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA-omega), el cual, como otros agonistas de este complejo, potencia las respuestas de los receptores GABA, aumentando los efectos inhibitorios sobre la excitación y actividad neuronal, potenciando así, las alteraciones funcionales a nivel de la actividad cerebral de la encefalopatía hepática.

Hoy por hoy, se ha reconocido que existen diversas alteraciones a nivel de la neurotransmisión glutamatérgica durante la encefalopatía, entre las cuales se encuentra la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc. Esta vía Glu-NO-GMPc modula importantes procesos cerebrales como la comunicación intercelular, la liberación de algunos neurotransmisores en algunas áreas cerebrales, los ritmos circadianos, la potenciación a largo plazo y algunas formas de memoria y aprendizaje (111, 113).

Se ha demostrado mediante estudios de microdiálisis cerebral *in vivo* que la función de la vía Glu-NO-GMPc está disminuida en el cerebelo de ratas con encefalopatía hepática crónica debida a anastomosis porta-cava (111). La función de esta vía también está disminuida *in vivo* en el cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático (112), indicando que la hiperamonemia es la responsable de la disminución de la función de la vía y de la menor formación de GMPc en encefalopatía hepática crónica. La alteración de la función de la vía Glu-NO-GMPc y

la menor formación de GMPc, el cual es un importante segundo mensajero distribuido por todo el organismo que tiene un papel crucial en el cerebro, es responsable de algunas de las alteraciones cognitivas en modelos animales y podría serlo en pacientes con encefalopatía hepática. Los tratamientos farmacológicos que aumentan el GMPc, podrían restaurar los ritmos circadianos y la capacidad de aprendizaje de ratas con encefalopatía hepática o con hiperamonemia (113).

Teniendo en cuenta estas alteraciones en la neurotransmisión durante la encefalopatía, hemos utilizado como segunda alternativa farmacológica en estudio el sildenafil, el cual es un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa tipo 5, enzima que actúa específicamente sobre la degradación del guanosin-monofosfato cíclico (GMPc). La inhibición de esta enzima mantiene los niveles del GMPc elevados a nivel intracelular. El sildenafil se administra por vía oral, absorbiéndose rápidamente siendo su biodisponibilidad absoluta del 40%. La farmacocinética es lineal dentro del rango de dosis recomendadas, siendo las concentraciones plasmáticas máximas alcanzadas a los 30-120 minutos de la administración en ayunas. Una vez en la circulación sistémica, el sildenafil se distribuye ampliamente por todo el organismo. Tanto el sildenafil como su principal metabolito, el N-dimetil-sildenafil, que tiene la misma actividad que el fármaco nativo aunque en menor potencia, se une extensamente a las proteínas del plasma (aproximadamente en un 96%). El sildenafil es metabolizado por las isoenzimas hepáticas del citocromo P450, siendo posteriormente metabolizado a compuestos inactivos que se excretan primariamente en las heces.

Al analizar el efecto del sildenafil sobre nuestros modelos PCS, evidenciamos que producen una disminución de la somnolencia durante sus tiempos de actividad motora, pero no mejora el tiempo total de sueño durante su tiempo de relajación ni la fragmentación del mismo. Por otra parte, hemos evidenciado en nuestros modelos PCS expuestos al sildenafil, una mejoría en la proporción del sueño NREM respecto a las no expuestas, lo que podría favorecer la recuperación

de energía física, como la recuperación corporal y neurológica (atención y vigilia), explicando así indirectamente la mejoría de la somnolencia durante sus tiempos de actividad.

Al analizar cuantitativamente la actividad electroencefalográfica (EEGq) de los modelos PCS tratados con sildenafil, observamos un decremento de la potencia relativa de la banda theta, asociado a un aumento de la potencia relativa de la banda alfa, contrarrestando así en cierta medida los efectos de la encefalopatía sobre la actividad bioeléctrica cerebral descrita en estudio previos (109, 110), convirtiéndolo en una nueva alternativa terapéutica que podría ser útil para mejorar los trastornos del sueño y el deterioro bioeléctrico y la calidad de vida de los pacientes con encefalopatía hepática mínima o clínica.

CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

1. Las ratas con de encefalopatía hepática por derivación porto-cava (PCS), presentan un desplazamiento del ciclo sueño-vigilia, aumentando su somnolencia durante sus tiempos de actividad y disminuyendo el tiempo de sueño durante sus periodos de descanso, de forma similar a las alteraciones del sueño descritas en pacientes cirróticos.
2. Las ratas con encefalopatía por derivación porto-cava presentan una disminución de la proporción del sueño NREM, el cual tiene un importante papel en la recuperación y restauración física y neurológica, lo que contribuye indirectamente a su somnolencia durante los tiempos de actividad.
3. Las ratas PCS presentan un aumento de las potencias relativas de la banda theta tanto en vigilia como en sueño, y un descenso de la potencia alfa en comparación con los controles, reproduciendo las alteraciones descritas en pacientes cirróticos sin encefalopatía hepática clínica evidente.
4. El tratamiento de las ratas PCS con Zolpidem mejora la arquitectura del sueño, recuperando el ciclo sueño-vigila, disminuyendo la somnolencia durante sus tiempos de actividad. Esto va asociado a un aumento del tiempo total de sueño durante su periodo de descanso y un aumento de la proporción de sueño NREM, lo que contribuiría a una mejor recuperación física y neurológica.

5. El Zolpidem favorece el aumento de la potencia relativa de la banda theta, y disminuye la potencia relativa de la banda alfa, empeorando los efectos de la encefalopatía hepática en la actividad cerebral.

6. El tratamiento de las ratas PCS con Sildenafil mejora parcialmente la arquitectura del sueño, disminuyendo la somnolencia durante los tiempos de actividad, pero sin mejorar el tiempo de sueño ni su fragmentación. Sin embargo, mejora la proporción del sueño NREM, lo que podría favorecer la recuperación física y neurológica, explicando así la mejoría de la somnolencia durante sus tiempos de actividad.

7. El Sildenafil disminuye la potencia relativa de la banda theta, y aumenta la potencia relativa de la banda alfa, contrarrestando así en cierta medida los efectos de la encefalopatía sobre la actividad cerebral, convirtiéndolo en una alternativa útil para mejorar los trastornos del sueño y el deterioro bioeléctrico en la encefalopatía hepática mínima o clínica.

BIBLIOGRAFIA

VII. Bibliografía

1. *Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congress of Gastroenterology, in Viena (1998)*. Ferenci AL, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT and member of the working party. 2002, *Hepatology*, Vol. 35, pp. 716-721.
2. *Gastrointestinal bleeding in children*. Yachha SK, K.A., Sharma BC, Kumar M. 1996, *J Gastroenterol Hepatol* 11 (1996) 903–907, Vol. 11, pp. 903-7.
3. *Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests*. Felipo V, Ordoño JF, Urios A, El Mlili N, Giménez-Garzó C, Aguado C, González-Lopez O, Giner-Duran R, Serra MA, Wassel A, Rodrigo JM, Salazar J, Montoliu C. 2, 2012, *Hepatology.*, Vol. 55, pp. 530-39.
4. *Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease*. . Weissenborn K, B.M., Krause J, Ennen J, Ahl B. 2005, *AIDS*, pp. 19 Suppl 3 S93-8.
5. *Attention, Memory, and Cognitive Function in Hepatic Encephalopathy*. Weissenborn K, Heidenreich S, Bokemeyer M, Berding G, Ahl B. 4, 2005a, *Metabolic Brain Disease*, Vol. 20, pp. 359-67.
6. *The hepatic coma syndromes and lactulose*. Conn HO, Livvenham M. 1979, Baltimore: Williams and Wilkins.

7. *Characteristics of minimal hepatic encephalopathy.* Amodio SM, Gatta A, Morgan MY. 2004, *Metabolic Brain Disease*, Vol. 19, pp. 253-267.
8. *Systemic diseases that cause movement disorders.* Alarcón F, Giménez-Roldán S. (1), 2005, *Parkinsonism Relat Disord.*, Vol. 11, pp. 1-18.
9. *Extrapyramidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis.* Compañy L, Zapater P, Pérez-Mateo M, Jover R. 5, 2010, *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, Vol. 22, pp. 519-25.
10. *Portal-systemic encephalopathy;neurological complications of liver disease.* Sherlock S, Summerskills W, White LP, Phear EA. 6836, 1954, *Lancet*, Vol. 267, pp. 454-7.
11. *High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis.* Córdoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT. 1998, *Hepatology*, Vol. 272, pp. 339-345.
12. *Hepatic bromsulphthalein-glutathione conjugating enzyme activity in patients with liver disease with particular reference to effects of enzyme inducer.* Datta DV, Singh S, Nair R, Chhuttani PN, Nair CR. 7, 1976, *Indian J Med Res.*, Vol. 64, pp. 1070-76.
13. *Synthesis and catabolism of nucleotides.* Frisell WR. 1982, *Human biochemistry*, pp. 292-304.
14. *Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy.* Romero-Gómez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, de Terán LC,

- Corpas R, Camacho I Bautista, JD. 1, 2004, J Hepatol., Vol. 41, pp. 49-54.
15. *Diagnóstico de un varón de 72 años con fiebre, alteración del estado de consciencia e hiperamonemia.* Sanz C. 2, 2002, Revista del Hospital Privado de Comunidad, Vol. 5.
16. *Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies.* Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED. 23, 1984, N. Engl. J. Med., Vol. 310, pp. 1500-05.
17. *A nationwide survey on transient hyperammonemia in newborn infants in Japan: prognosis of life and neurological outcome.* Yoshino M, Sakaguchi Y, Kuriya N, Ohtani Y, Yamashita F, Hashimoto T, Oyanagi K, Tada K, Narisawa K, Kitagawa T. 4, 1991, Neuropediatrics, Vol. 22, pp. 198-202.
18. *Transient hyperammonemia of the preterm infant.* Ballard RA, Vinocur B, Reynolds JW, Wennberg RP, Merritt A, Sweetman L, Nyhan WL. 17, 1978, N. Engl. J. Med., Vol. 299, pp. 920-5.
19. *Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients.* Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compañ A, Sáez-Valero J, Erceg S, Felipe V. 2, 2005, Neuroscience., Vol. 130, pp. 435-43.
20. *Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat.* Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. 1984, Br J Exp Pathol, Vol. 65, pp. 305-11.

21. *Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis.* Jover R, Regina R, Felipo V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, Suarez I, Candela A, Compan A, Esteban A, Cauli O, Auso E, Rodriguez E, Gutierrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Perez-Mateo M. 6, 2006, *Hepatology*, Vol. 43, pp. 1257-66.
22. *Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy?* Aronson DC, Chamuleau RA, Frederiks WM, Gooszen HG, Heijmans HS, James J. 1993, *J Hepatol*, Vol. 18, pp. 85-95.
23. *Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats.* Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. 1990, *Gastroenterology*, Vol. 98, pp. 478-85.
24. *Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage.* Roughneen PT, Gouma DJ, Kulkarni AD, Fanslow WF, Rowlands BJ. 1986, *J Surg Res*, Vol. 41, pp. 113-125.
25. *Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy.* Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipo V. 2, 2010, *Gastroenterology*, Vol. 139, pp. 675-84.
26. *Obstructive jaundice in rats: cause of spatial memory deficits with recovery after biliary*

- decompression*. Huang LT, Hsieh CS, Chou MH, Chuang JH, Liou CW, Tiao MM, Lai MC. 3, 2004, *World J Surg.*, Vol. 28, pp. 283-7.
27. *Brain cholinergic impairment in liver failure*. García-Ayllón MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Compañ A, Jover R, Pérez-Mateo M, Martínez S, Felipo V, Sáez-Valero J. 2008, *Brain Res Mol Brain Res*, Vol. 131, pp. 2946-56.
28. *Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis*. Jover R, Compañ L, Gutiérrez A, Zapater P, Pérez-Serra J, Girona E, Aparicio JR, Pérez-Mateo M. 7, 2003, *Am J Gastroenterol*, Vol. 98, pp. 1599-604.
29. *Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain*. Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Llansola M, Montoliu C, Felipo V. 2005, *Brain Res Mol Brain Res*, pp. 115-121.
30. *Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy*. Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, El Mlili N, Boix J, Agustí A, Felipo V. 1, 2009, *Metab Brain Dis*, Vol. 24, pp. 69-80.
31. *Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability*. Monfort P, Erceg S, Piedrafita B, Llansola M, Felipo V. 7, 2007, *Eur J Neurosci*, Vol. 25, pp. 2103-11.
32. *Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy*. Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Cimadevilla JM, Arias JL. 1, 2008, *Behav Brain Res*,

Vol. 188, pp. 32-40.

33. *Minimal hepatic encephalopathy*. Dhiman RK, Chawla YK. 1, 2009, Indian J Gastroenterol, Vol. 28, pp. 5-16.
34. *Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin*. Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B. 1986, Pharmacol Biochem Behav, Vol. 24, pp. 1611-16.
35. *Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication*. Felipo V, Miñana MD, Grisolia S. 1, 1988, Biochem Biophys Res Commun., Vol. 156, pp. 506-10.
36. *A simple animal model of hyperammonemia*. Azorín I, Miñana MD, Felipo V, Grisolia S. 3, 1989, Hepatology, Vol. 10, pp. 311-314.
37. *Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase*. Felipo V, Miñana MD, Grisolia S. 3, 1988b, Eur J Biochem., Vol. 176, pp. 567-71.
38. *Treatment of hyperammonemia with carbamylglutamate in rats*. Grau E, Felipo V, Miñana MD, Grisolia S. 3, 1992, Hepatology, Vol. 15, pp. 446-8.
39. *Induction of rat brain tubulin following ammonium ingestion*. Felipo V, Miñana MD, Azorín I, Grisolia S. 4, 1988c, J Neurochem., Vol. 51, pp. 1041-45.

40. *Ammonium ingestion prevents depletion of hepatic energy metabolites induced by acute ammonium intoxication.* Kosenko E, Felipo V, Miñana MD, Grau E, Grisolía S. 2, 1991, Arch Biochem Biophys., Vol. 290, pp. 484-8.
41. *High ammonia levels in brain induce tubulin in cerebrum but not in cerebellum.* Miñana MD, Felipo V, Wallace R, Grisolía S. 6, 1988, J Neurochem., Vol. 51, pp. 1839-42.
42. *Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication.* Miñana MD, Felipo V, Grisolia S. 3, 1988b, Biochem Biophys Res Commun, Vol. 153, pp. 99-83.
43. *Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase.* Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana MD, Marcaida G, Grisolía S, Felipo V. 6, 1994, J Neurochem., Vol. 63, pp. 2172-78
44. *Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo.* Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Muñoz MD, Gaztelu JM, Miñana MD, Felipo V. 10, 1998, Eur J Neurosci., Vol. 10, pp. 3201-9.
45. *Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro.* Muñoz MD, Monfort P, Gaztelu JM, Felipo V. 4, 2000, Neurochem Res. , Vol. 25, pp. 437-41.

46. *Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats.* Aguilar MA, Miñarro J, Felipo V. 2, 2000, Exp Neurol, Vol. 161, pp. 704-13.
47. *Manual de Electroencefalografía, cap. Bases neurofisiológicas de la electroencefalografía y magnetoencefalografía.* Parra J, Lopes da Silva FH., pag 1-17.
48. *Cerebral state during sleep, as studied by human brain potentials.* Loomis AL, Harvey N, Hobart GA. Journal of experimental psychology. 1937;21:127-144.
49. *A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects.* Rechtschaffen A, Kales A e. Los Angeles, Calif: UCLA Brain Information Service/Brain research Institute. 1968.
50. *Grupo de Trabajo de la Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Insomnio en Atención Primaria.* Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Agencia Laín Entralgo. Comunidad de Madrid. 2009; Guías de Práctica Clínica en el SNS: UETS N.º 2007/5-1.
51. *Use of melatonin in children and adolescents: Clinicians' and parents' perspective.* Banta S. Child and Adolescent Mental Health. 2008;13:82-84.
52. *Guía de práctica clínica sobre Trastornos del sueño en la infancia y adolescencia en atención primaria.* Ministerio de sanidad, política social e igualdad. Anexo 2. Pg 95-97.

53. *Neurobiologia del Sueño*. F. Reinoso-Suárez. Rev Med Univ Navarra/vol 49, Nº 1, 2005, 10-17.
54. *Über das elektrenkephalogramm des Menschen*. Berger H.. Arch f Psychiat 1929;87:527-36.
55. *Die encephalitis lethargica*. Von Economo C. Wien: Deuticke, 1918.
56. *L'activité cérébrale au cours du sommeil et de la narcose*. Bremer F. Contribution à l'étude du mécanisme du sommeil. Bull Acad roy Méd Belg 1937;4:68-86.
57. *Brainstem reticular formation and activation of the EEG*. Moruzzi G, Magoun HW. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1949;1:455-73. 5.
58. *Modifications of the potential evoked by acoustic stimuli by means of diathermo-coagulation in the diencephalon*. Reinoso-Suárez F. J Comp Neurol 1960;114:207-15.
59. *El sistema reticular ascendente de activación. Desarrollo de su escalón diencefálico en el hombre y estudio experimental en el gato*. Reinoso-Suárez F. Madrid: Publicaciones del C.S.I.C., 1961.
60. *Neural mechanisms underlying the enduring EEG and behavioral activation in the midpontine pretrigeminal cat*. Batini C, Magni F, Palestini M, Rossi GF, Zanchetti A. Arch Ital Biol 1959;97:13-25.
61. *Activating and synchronizing centers in cat brain*. Camacho-Evangelista A, Reinoso Suárez

- F. Science 1964;146:268-9.
62. *Projections from the cat posterior lateral hypothalamus to the ventral part of the oral pontine reticular nucleus, contain a GABAergic component.* De la Roza C, Martínez-Mena J, Sánchez-Valle ML, Reinoso-Suárez F. Brain Res (en prensa).
63. *Locus coeruleus control of state-dependent gene expression.* Cirelli C, Tononi G. J Neurosci 2004;24:5410-9.
64. *Neurobiología del despertar y la vigilia.* Reinoso-Suárez F. An R Acad Nac Med (Madr) 1997;114:249-65.
65. *Thalamocortical [correction of Thalamcortical] optimization of tactile processing according to behavioral state.* Nicolelis MA, Fanselow EE. Nat Neurosci 2002;5:517-23.
66. *Contribution à l'étude du mécanisme du sommeil.* Bremer F. L'activité cérébrale au cours du sommeil et de la narcose. Bull Acad roy Méd Belg 1937;4:68-86.
67. *Le sommeil.* Hess WR. C R Soc Biol. Paris, 1931;107:1333-60.
68. *Hypothalamic regulation of sleep in rats.* Nauta WJH. An experimental study. J Neurophysiol 1946;9:285-316.
69. *Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat.* Sterman MB, Clemente CD. Expl Neurol 1962;6:91-102.

70. *Influencia de la región preóptica en la regulación de la actividad eléctrica cerebral*. Madoz P. Tesis Doctoral, Universidad de Navarra, 1968.
71. *Influence of lesions in preoptic region on the states of sleep and wakefulness*. Madoz P, Reinoso-Suárez F. Proc XXIV Int Cong Physio Sci 1968; 7:276.
72. *A study of thalamo-cortical relations*. Morrison RS, Dempsey EW. Am J Physiol 1942;135:282-92.
73. *Role of the thalamus in sleep control: sleep-wakefulness studies in chronic diencephalic and athalamic cats*. Villablanca J. En: O. Petre-Quadens & J. Schlag (eds). Basic sleep mechanisms. Academic, New York, 1974;51-81.
74. *The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity*. Steriade M, Domigh L, Oakson G, Deschenes M. J Neurophysiol 1987;57:260- 73.
75. *The thalamus regulates the sleepwake cycle and autonomic and endocrine functions*. Lugaresi E, Montagna P, Gambetti P. En: Minciacchi D, Molinari M, Macchi G, Jones EG (eds). Thalamic networks for relay and modulation. Oxford: Pergamon Press, 1993. 395-400.
76. *Thalamic nuclei and control of sleep related events*. Marini G, Mancina M. En: Minciacchi D, Molinari M, Macchi G, Jones EG (eds). Thalamic networks for relay and modulation. Oxford: Pergamon Press, 1993. 401- 8.

77. *Telencephalic and rhombencephalic sleep in the cat.* Jouvet M (1961) En: Wolstenholme GEW, O'Connor (eds). *The nature of sleep.* Churchill, London, 1961;188-206.
78. *Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: Cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression.* Steriade M, Curró Dossi R, Núñez A. *J Neurosci* 1991;11:3200-17. / Sillito AM, Jones HE, Gerstein GL, West DC. *Feature-linked synchronization of thalamic relay cell firing induced by feedback from the visual cortex.* *Nature* 1994;369:479-82.
79. *Influencia de la región caudal del puente sobre los mecanismos neurofisiológicos del sueño.* Zarranz JJ. Tesis Doctoral, Universidad de Navarra 1971.
80. *The pontine tegmentum and sleep-wakefulness states.* Zarranz JJ, Reinoso-Suárez F. *Proc XXV Int Cong Physio Sci* 1971;8:618.
81. *Neurobiología del sueño de ondas lentas.* Reinoso-Suárez F. *Acad Nac Med (Madr)* 1999;116:209-26.
82. *Identificación del director de la orquesta neuronal responsable del sueño paradójico.* Reinoso-Suárez F. *An R Acad Nac Med (Madr)* 1998;115:239-59.
83. *Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep.* Sakai K. En: McGinty DJ, Drucker-Colin R, Morrison A, Parmeggiani L (eds). *Brain Mechanisms of Sleep.* New York: Raven Press, 1985:111-37.

84. *Brainstem genesis of reserpine-induced ponto-geniculo-occipital waves. An electrophysiological and morphological investigation.* Paré D, Dossi RC, Datta S, Steriade M. (1990) *Exptl. Brain Res* 1990;81:533-44.
85. *Sitespecific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions.* Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA. *Brain Res* 1984;306:39-52.
86. *Brain structures and mechanisms involved in the generation of rem sleep.* Reinoso-Suárez F, de Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M. *Sleep Med Rev* 2001;5:63-78.
87. *A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs.* Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA. *Brain Res* 1987;414:245-61.
88. *A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: spontaneous and drug-induced neuronal activity.* Yamamoto K, Mamelak AN, Quattrochi JJ, Hobson JA. *Neuroscience* 1990; 39:295-304.
89. *Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat.* Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M. *Arch Ital Biol* 1989;127:133-64.
90. *Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: A microdialysis study.* Iwakiri H, Matsuyama K, Mori S. *Neurosci*

Res 1993;18:157-70.

91. *Substance P in the descending cholinergic projection to REM sleep-induction regions of the rat pontine reticular formation: Anatomical and electrophysiological analyses.* Kohlmeier KA, Burns J, Reiner PB, Semba K. Eur J Neurosci 2002;15:176-96.
92. *Brain oscillatory activity during sleep shows unknown dysfunctions in early encephalopathy.* Martino ME, Fernández-Lorente J, Romero-Vives M, Bárcena R, Gaztelu JM. J Physiol Biochem. 2014 Jul 30.
93. *The Rat as an experimental model for sleep neurophysiology.* Subimal Datta, J. Allan Hobson. Behavioral Neuroscience. 2000. Vol. 114, N. 6, 1239-1244.
94. *Night sleep in porto-caval encephalopathy.* Kurtz D, Zenglein JP, Imler M, Girardel M, Grinspan G, Peter B, Rohmer F (1972) Electroencephalogr Clin Neurophysiol 33(2):167–178.
95. *Abnormalities of circadian rhythmicity in liver disease.* Blei AT, Zee P. J Hepatol. 1998; 29(5):832-5.
96. *Disruption of the diurnal rhythm of plasma melatonin in cirrhosis.* Steindl PE, Finn B, Bendok B, Rothke S, Zee PC, Blei AT Ann Intern Med. 1995;123(4):274-7.
97. *Portacaval anastomosis disrupts circadian locomotor activity and pineal melatonin rhythms in rats.* Zee PC, Mehta R, Turek FW, Blei AT (1991). Brain Res 560:17–22.

98. *Portalsystemic shunting and the disruption of circadian locomotor activity in the rat.* Coy DL, Mehta R, Zee P, Salchli F, Turek FW, Blei AT (1992) *Gastroenterology* 103:222–228.
99. *Is sleep essential?.* Cirelli C, Tononi G. *PLoS Biol* 6 (8): e216. doi:10.1371/journal.Pbio.0060216.
100. *A molecular basis for interactions between sleep and memory.* Pepe J. Hernandez, Ted Abel. *Sleep Med Clin.* 2011 March 1; 6(1): 71–84. doi:10.1016/j.jsmc.2010.12.004.
101. *Is Sleep Essential for Neural Plasticity in Humans, and How Does It Affect Motor and Cognitive Recovery.* Maurizio Gorgoni et al. *Neural Plast.* 2013; 2013: 103949. Published online 2013 Jun 11. doi: 10.1155/2013/103949.
102. *Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration.* Tononi G. , Cirelli C. *Neuron.* 2014 Jan 8;81(1):12-34. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.025.
103. *El debate científico sobre la realidad del sueño infantil.* Berrozpe Martinez M. Apéndice I: La función del Sueño. <http://www.suenoinfantil.net>.
104. *Memory consolidation during sleep: interactive effects of sleep stages and HPA regulation.* Wagner U, Born J. , *Stress.* 2008 Jan;11(1):28-41. Epub 2007 Jul 20.
105. *Pathophysiology of sleep-dependent memory consolidation processes in children.* Urbain

- C, Galer S, Van Bogaert P, Peigneux P. , Int J Psychophysiol. 2013 Aug;89(2):273-83. doi: 10.1016/j.ijpsycho.2013.06.022. Epub 2013 Jun 26.
106. *Sleep microstructure and memory function.* Luigi Ferini-Strambi, Andrea Galbiati and Sara Marelli., *ront. Neurol.* 4:159. doi: 10.3389/fneur.2013.00159.
107. *Control of sleep and wakefulness.* Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW., *Physiol Rev.* 2012 Jul;92(3):1087-187. doi: 10.1152/physrev.00032.2011.
108. *Progressive reduction of sleep time and quality in rats with hepatic encephalopathy caused by portacaval shunts.* Llansola M, Cantero JL, Hita-Yañez E, Mirones-Maldonado MJ, Piedrafita B, Ahabrach H, Errami M, Agusti A, Felipo V. *Neuroscience.* 2012 Jan 10;201:199-208. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.009. Epub 2011 Nov 12.
109. *Subclinical hepatic encephalopathy.* Quero JC, Schalm S. *Semin live Dis.* 1996; 16:321-18.
110. *Brain oscillatory activity during sleep shows unknown dysfunctions in early encephalopathy.* Martino ME, Fernández-Lorente J, Romero-Vives M, Bárcena R, Gaztelu JM. *J Physiol Biochem.* 2014 Sep;70(3):821-35. doi: 10.1007/s13105-014-0351-2. Epub 2014 Jul 30.
111. *Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis.* Monfort P, Corbalán R, Martinez L, López-Talavera J, Córdoba J, Felipo V. 4, 2001, *Neurosci.*, Vol. 104, pp. 1119-25.

112. *Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo.* Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Muñoz MD, Gaztelu JM, Miñana MD, Felipo V. 10, 1998, Eur J Neurosci., Vol. 10, pp. 3201-9.

113. *Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts.* Erceg S, Monfort P, Hernández-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipo V. 2, 2005a, Hepatology, Vol. 41, pp. 299-306.