



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

SUEÑO EN EL ACOCIL: RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA  
CEREBRAL Y LAS VARIABLES AUTONÓMICAS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIREYA OSORIO PALACIOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. JESÚS HERNÁNDEZ FALCÓN  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN  
FACULTAD DE MEDICINA  
DR. PEDRO MIRAMONTES VIDAL  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Con aprecio y admiración a la Dra. Karina Mendoza Ángeles y al Dr. Jesús Hernández Falcón, por todo el apoyo y dedicación que me han brindado. Sin ellos, este proyecto no sería posible.

Al Dr. Pedro Miramontes Vidal y al Dr. Gabriel Roldán Roldán, miembros de mi comité tutorial, por el seguimiento y aportaciones que hicieron al proyecto.

Al Dr. Markus Müller Bender por las sugerencias al análisis matemático.

A mi madre y a mis hermanos por su apoyo y confianza.

A mis amigos y compañeros, los de siempre. Un agradecimiento especial a los miembros del Laboratorio de Redes Neuronales.

En especial a Grettel, Alison, Aurelio, Emilio, Leonardo, Iker, Hobson, Cirelli, Sócrates, Jadu y Olcay.

Finalmente, a la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, mi *alma mater*.

A

***Redes Universitarias***

con  $1 - \cos \theta$

El presente trabajo fue realizado en el  
Laboratorio de Redes Neuronales,  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,  
Parcialmente financiado por el Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN231620

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	1
<b>2. Abstract</b>	3
<b>3. Introducción</b>	5
3.1. Vigilia y sueño	5
3.2. Cambios fisiológicos durante el sueño	10
3.3. Sueño en invertebrados	12
3.4. Sueño en el acocil	13
3.5. Análisis de señales	15
	14
<b>4. Planteamiento del problema</b>	21
<b>5. Objetivo</b>	22
<b>6. Diseño Experimental</b>	
<b>7. Material y Métodos</b>	25
7.1. Material biológico	25
7.2. Registros conductuales	25
7.3. Registros electrofisiológicos	25
7.3.1. Actividad eléctrica cerebral	25
7.3.2. Actividad eléctrica cardiaca	26
7.3.3. Actividad eléctrica respiratoria	26
7.3.4. Adquisición de señales electrofisiológicas	27
7.4. Análisis de datos	28
7.4.1. Análisis conductual	28
7.4.2. Análisis electrofisiológico	29
<b>8. Resultados</b>	31
8.1. ¿Cómo duerme el acocil?	31
8.1.1. Criterios conductuales	32
8.1.2. Criterios electrofisiológicos	32
8.2. ¿Los acociles inmóviles duermen?	33
8.3. Fases de sueño en el acocil	34
8.3.1. Actividad eléctrica cerebral	34
8.3.2. Actividad eléctrica cardiorrespiratoria	37
8.3.3. Actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria	45
8.3.4. Fases de sueño en el acocil: ¿Caso específico o genérico?	48
<b>9. Discusión</b>	49
9.1 Fases de sueño en el acocil	50
9.2 Cambios fisiológicos durante las diferentes fases de sueño	51
<b>10. Conclusión</b>	53

<b>11. Referencias</b>	55
<b>12. Material Suplementario</b>	62
<b>13. Anexos</b>	74
13.1 Anexo 1: Consideraciones éticas	74
13.2 Anexo 2: Anatomía del acocil	75
13.2.1 Sistema Nervioso del acocil	75
13.2.2 Corazón	76
13.2.3 Branquias	77

## 1. RESUMEN

En vertebrados como los mamíferos y aves el sueño es un proceso dinámico que comprende las fases de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y el de ondas lentas o sueño no-MOR. Ambas fases se caracterizan por una actividad eléctrica cerebral específica y se acompañan de cambios en la frecuencia cardiaca y la respiratoria. En algunos invertebrados, como el acocil, se ha descrito el fenómeno del sueño a partir de los mismos criterios que en el vertebrado. Se sabe que durante la vigilia diversos estímulos mecánicos, visuales, de interacciones agonistas, la cópula o perturbaciones en su ambiente, modifican la frecuencia cardiaca y la respiratoria. Los resultados que obtuve a lo largo de este proyecto muestran que estas variables también se modifican durante el sueño del acocil. En los vertebrados estos cambios cardiorrespiratorios son mediados por el Sistema Nervioso Autónomo (SNA); sin embargo, en el acocil no hay descripciones de este tipo de sistema y se desconocen los mecanismos y las vías que median esta regulación. Además, se desconoce cuál es el patrón de la actividad cardiorrespiratoria durante el sueño y tampoco se sabe si este animal tiene fases de sueño.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria de acociles adultos *Procambarus clarkii*, mediante la transformada wavelet continua (TWC), matrices de correlación de Pearson y técnicas de aprendizaje no supervisado con la finalidad de (1) identificar si el acocil presenta fases de sueño y (2) determinar cuál es la relación entre estas variables durante el mismo. Para ello, previa anestesia por frío implanté de manera crónica electrodos en cerebro, el seno cardiaco y en ambas cámaras branquiales. Registré simultáneamente la actividad conductual y electrofisiológica durante 8 horas. En el análisis conductual consideré tres posiciones del animal: deambulando, inmóvil y de lado, así como, la hora de inicio y de término de dicha posición. Con los datos obtenidos elaboré gráficas de posición contra tiempo y posteriormente asocié cada condición conductual con los datos electrofisiológicos. Utilicé la transformada wavelet continua para el análisis tiempo-frecuencia de la actividad electrofisiológica. Los resultados muestran que:



- El acocil puede dormir de lado a nivel de la superficie del agua (como está descrito en la literatura) o cuando está inmóvil.
- La potencia de la actividad eléctrica cerebral durante el sueño no es constante, cambia a través del tiempo. Esto sugiere que la actividad cerebral durante el sueño está compuesta por aparentes microestados con duración y patrones distintos.

Por otra parte, el análisis tiempo-frecuencia de la actividad cardiorrespiratoria muestra que:

- Durante el sueño la actividad cardíaca y respiratoria presenta un progresivo decremento en potencia en la medida que el acocil duerme. Estos cambios ocurren a lo largo de todo el episodio de sueño y muestran diferencias y similitudes con el patrón encontrado durante la vigilia.

Posteriormente determiné la evolución temporal del sueño y la relación entre la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria durante el mismo. Para ello, utilicé matrices de correlación de Pearson y técnicas de aprendizaje no supervisado, como el agrupamiento de datos con *k*-means. Los resultados en conjunto indican que: (1) en el acocil existen por lo menos 3 diferentes fases de sueño y (2) cada una de estas fases se acompaña de cambios en variables fisiológicas como la frecuencia cardíaca y la frecuencia respiratoria.

## 2. ABSTRACT

In vertebrates like mammals and birds, sleep is a dynamic process, which may be divided into rapid eye movement (REM) and non-rapid eye movement (NREM) sleep. Each one has a specific brain electrical activity and is accompanied by variations in cardiac and respiratory frequencies. Sleep has been demonstrated only in a handful of invertebrates and evidence for different sleep stages remains elusive. Previous results show that crayfish sleep fulfills behavioral and electrophysiological criteria defined for vertebrates. It is known that aggressive and submissive social interactions, copulation, and perturbations in its environment induce changes in heartbeat and respiration during wakefulness. The results that I obtained throughout this project show that changes in these variables occur during sleep in crayfish. In vertebrates these changes are mediated by the Autonomic Nervous System; however, there are no descriptions of this kind of system in crayfish. Moreover, we do not know if this animal has sleep phases and what is the relationship between brain and cardiorespiratory electrical activity during sleep.

The main purpose of this work was to analyze physiological time series from adult male crayfish's brain and cardiorespiratory electrical activity by continuous wavelet transform (CWT), Pearson correlation matrix and unsupervised learning techniques, to search for sleep phases and determine the relationship between these activities during sleep. Therefore, in cold anesthetized animals I implanted electrodes on deutocerebrum, both gill chambers, and cardiac sinus. After two days of recovery, I recorded, simultaneously, behavioral and electrophysiological activity during 8 continuous hours (from 12:00 to 20:00 h). For behavioral records, I considered three conditions of the animal: walking, motionless or lying on one side, as well as, the day hour, and the time spent on each condition. Then, I associated each position with the electrophysiological recordings.

The electrophysiological activity's time-frequency analysis by continuous wavelet transform indicates the following:

- Crayfish can sleep lying on one side (as previously reported) or when it is motionless.
- During the same sleeping episode, the power of brain electrical activity is not

constant but changes over time. These findings suggest that brain electrical activity during sleep shows different patterns, which seems to indicate micro-states.

On the other hand, the cardiorespiratory activity's time-frequency analysis shows that:

- Crayfish shows a progressive decrease in power both ECG and respiratory electrical activity, as it is sleeping. These changes occur for a long sleeping episode and show differences and similarities with the pattern encountered during wakefulness.

Finally, I determined the temporal pattern of sleep and the relationship between brain and cardiorespiratory electrical activity during this state. For this purpose, I used Pearson correlation matrix and unsupervised learning techniques, as grouping analysis by *k*-means clustering and principal components analysis (PCA). The results suggest that: (1) in crayfish there are at least three different sleep phases, (2) changes in physiological variables like HR and RF take place during different sleep phases.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Pocas condiciones fisiológicas han recibido tanta atención de filósofos, poetas, novelistas, estudiosos y científicos, como el sueño. Escritores desde Aristóteles y Ovidio, hasta Shakespeare y Dante quedaron fascinados por el sueño y su impacto en nuestras emociones, la conducta y la salud. Dormir, como comer o beber, es esencial para la vida. Casi todo mundo ha experimentado la sensación de desmoronarse después de una noche de mal sueño. Sin embargo, a diferencia de comer o beber, la función esencial del sueño continúa siendo un misterio. A pesar de los múltiples esfuerzos realizados, estos continúan sin responder a preguntas fundamentales acerca del sueño. ¿Por qué dormimos? ¿Todos los animales duermen? ¿Por qué pasamos un tercio de nuestra vida durmiendo? ¿Por qué habitualmente algunas especies duermen mucho más tiempo que los humanos, y otras mucho menos; y cómo las especies que duermen por periodos cortos cumplen las funciones del sueño en menor tiempo? ¿Por qué en las especies de mamíferos terrestres la cantidad de sueño disminuye desde el nacimiento hasta la madurez? y ¿Por qué algunas especies tienen dos tipos de sueño, MOR y no-MOR? En consecuencia, a pesar de la gran profusión de estudios en los últimos años, nadie ha podido responder a estas preguntas. Nadie sabe bien para qué sirve dormir.

#### **3.1 Vigilia y Sueño**

Los dos principales estados cerebrales identificados en prácticamente todos los animales son vigilia y sueño.

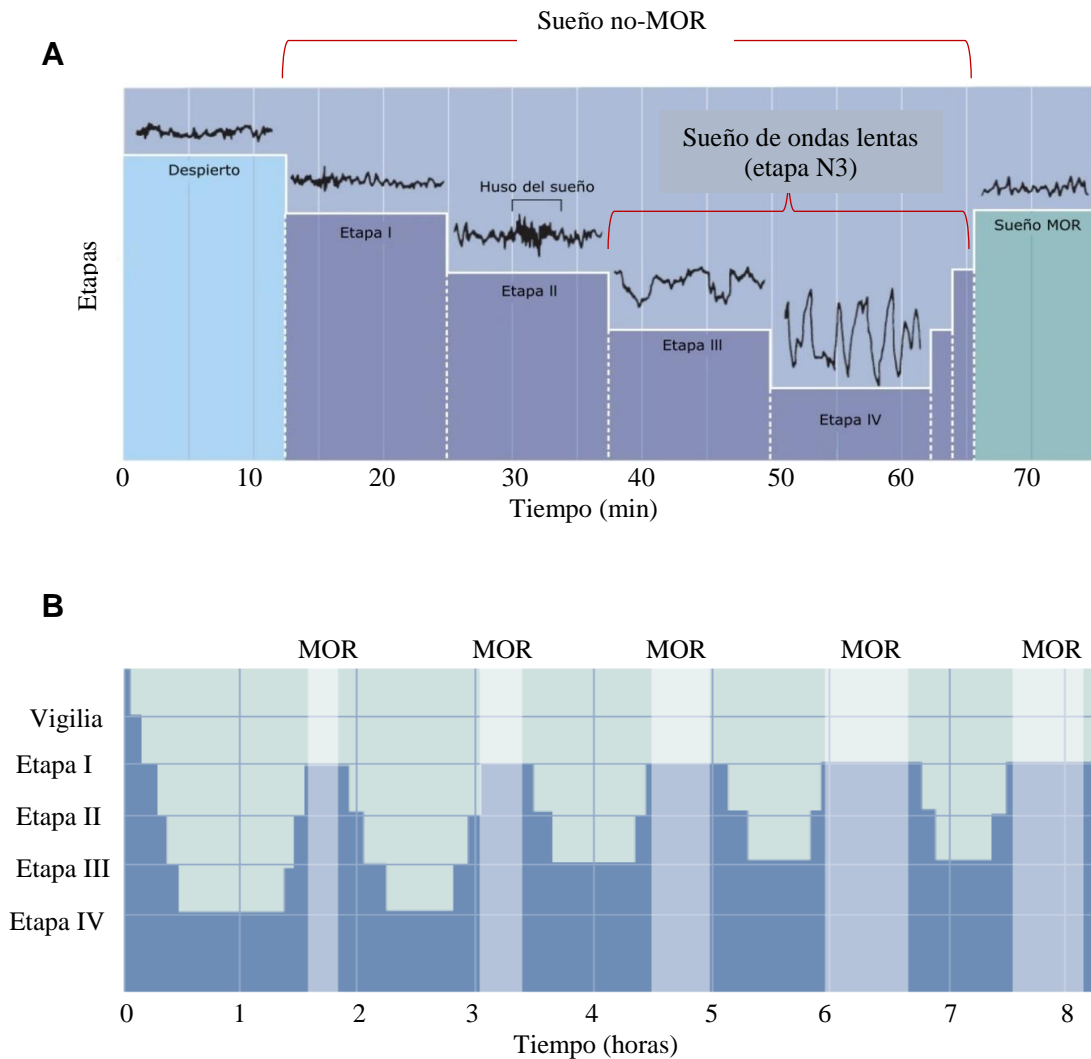
La vigilia es un estado en el que el individuo tiene la capacidad de interactuar con el ambiente que le rodea y de responder a los estímulos que recibe.

Por otra parte, el sueño es definido por cambios conductuales y electrofisiológicos. Conductualmente, el sueño es caracterizado por cinco criterios: (i) una posición especie-específica, (ii) quiescencia conductual prolongada, (iii) misma que es rápidamente reversible tras estimulación moderadamente intensa, lo que diferencia el sueño de la hipotermia, torpor o coma, (iv) incremento en el umbral de respuesta a estímulos externos y (v) rebote homeostático seguido de la privación

de sueño (**Ookawa y Gotoh, 1965; Flanigan y cols., 1974; Campbell y Tobler, 1984; Tobler, 2005**). Electrofisiológicamente, el sueño se caracteriza por cambios en la actividad eléctrica cerebral medidos por el electroencefalograma (EEG) en mamíferos (**Berger y Gloor, 1969; Keenan y Hirshkowitz, 2010**) y por potenciales de campo local en invertebrados (**van Alphen y cols., 2013**).

En mamíferos y aves el sueño es dividido en dos etapas principales, sueño con movimientos oculares rápidos (sueño MOR) y sueño sin movimientos oculares rápidos (no-MOR). Cada una de las etapas de sueño puede ser distinguida por el registro de la actividad eléctrica derivada de la superficie cerebral (electroencefalograma, EEG). En el caso de los humanos, cuando la persona se encuentra despierta, el EEG muestra principalmente actividad alfa y beta (oscilaciones neuronales en un rango de 7.5-12.5 Hz y de 12.5-30 Hz, respectivamente). Durante la vigilia, la actividad beta aparece cuando se realiza una actividad que requiere de atención. Mientras que, la actividad alfa aparece cuando el sujeto se encuentra en un estado relajado y quieto. Durante la primera hora después de acostarse, los seres humanos discurren por sucesivas etapas de sueño (**Figura 3.1 A**). Después del inicio de sueño, atravesamos por el sueño no-MOR, el cual puede ser diferenciado en tres etapas N1-N3, previamente denominadas etapa 1, 2, 3 y 4; sin embargo, actualmente la nomenclatura acerca de las fases del sueño ha sido modificada por la Academia Americana de Medicina del Sueño (**Iber y cols., 2007**). En la etapa N1 (anteriormente etapa 1), la actividad alfa decremente gradualmente y la actividad theta (4-8 Hz) aparece. Durante la etapa N2 (anteriormente etapa 2), el EEG está caracterizado por la aparición de husos de sueño (descargas periódicas de actividad aproximadamente de 10-12 Hz que por lo general duran de 1-2 segundos) y complejos K (oscilación lenta). En la etapa N3 (conjunta las etapas 3 y 4), la actividad delta (1-4 Hz, también denominada actividad de ondas lentas), comienza a dominar el EEG. La etapa N3 ha sido dividida en 2 etapas basándose en la cantidad de ondas lentas. Esta etapa es típicamente denominada sueño de ondas lentas y está caracteriza por ondas de gran amplitud. Es la etapa en la que es más difícil de despertar y es considerada la etapa más profunda del sueño. Sin embargo, tras un periodo de sueño de ondas lentas, los

registros del EEG muestran que las etapas del sueño se invierten, es decir, se presentan frecuencias rápidas de baja amplitud y se entra en la etapa de sueño MOR (también denominado sueño paradójico). En el sueño MOR, los patrones del EEG son notablemente similares a los de la vigilia; hacia el final de esta etapa es el momento en el que el sujeto puede ser despertado fácilmente con un pequeño disturbio. Después de unos 10 minutos en sueño MOR, transitamos de nuevo a las



**Figura 3.1.** (A) Registros de EEG durante la primera hora de sueño (Modificada de **Hobson, 1989**) y (B) hipnograma que muestra cómo las 8 horas típicas de sueño que se experimentan cada noche, están conformadas por diferentes ciclos que alternan entre sueño no-MOR y MOR (**Modificada de Foulkes y Schmidt, 1983**).

etapas del sueño no-MOR. En general, el sueño de ondas lentas se desarrolla otra vez en la segunda ronda de este ciclo continuo, pero habitualmente no se produce durante el resto de la noche (ver **Figura 3.1 B**). En promedio, se desarrollan otros 4 o 5 periodos de sueño MOR, y cada uno de ellos tiene una duración mayor. En resumen, las 8 horas típicas de sueño que se experimentan cada noche comprenden en realidad varios ciclos que alternan entre sueño no-MOR y MOR; en promedio la duración de cada ciclo de sueño es de alrededor de 90 minutos. La cantidad de sueño MOR diario disminuye desde unas 8 horas al nacimiento hasta 2 horas a los 20 años y solo unos 45 minutos a los 70 años.

Aunque la distribución y la cantidad de sueño MOR y no-MOR varían ampliamente entre mamíferos y aves (**Zeplin y cols., 2005**), la electrofisiología de estos dos estados está bien establecida excepto en cetáceos (ballenas y delfines), y en un monotremata, el equidna, un mamífero primitivo que pone huevos (**Mukhametov, 1987; Siegel y cols., 1996; Lyamin y cols., 2002, 2004, 2005**).

En el caso de las aves, como previamente mencioné, se sabe que estas presentan tanto sueño de ondas lentas como sueño paradójico, aunque el sueño paradójico difiere del sueño MOR de los mamíferos en el sentido en que, en las aves ocurre en episodios cortos que duran desde unos segundos hasta unos pocos minutos. Se sabe además que, a diferencia de la mayoría de los mamíferos, con algunas excepciones, las aves presentan sueño unihemisférico, es decir, la actividad cerebral de un hemisferio presenta patrones de sueño de ondas lentas, aunados a patrones de vigilia en el otro hemisferio cerebral, en el que permanece abierto el ojo contralateral al hemisferio despierto. Se ha propuesto que el sueño unihemisférico pudo haber evolucionado en respuesta al riesgo de depredación, permitiendo que partes del cerebro permanezcan en alerta de manera diferencial (**Rattenborg y cols., 2000; Lima y cols., 2005**). Esta particularidad puede ayudar a las aves, especialmente a las aves migratorias, a conservar cierta capacidad de alerta durante un periodo largo de vuelo, aunque a la fecha no existe una evidencia directa de sueño unihemisférico durante el vuelo (**Rattenborg, 2006b; Rattenborg y Martínez-González, 2014**).

En el caso de los cetáceos (mamíferos acuáticos), uno podría imaginar que

las ballenas y los delfines, quienes permanecen toda su vida en el agua, de alguna manera necesitan adoptar una forma especial de sueño, de lo contrario se ahogarían o permanecerían bajo una gran amenaza de ser atacados por depredadores mientras duermen. Curiosamente, los delfines eluden tales riesgos al presentar, al igual que las aves, sueño unihemisférico. Los registros correspondientes al EEG, claramente demuestran que las ondas lentas son generadas en un solo hemisferio a la vez (**Mukhametov y cols., 1977**). De manera que, un hemisferio cerebral mantiene un bajo nivel de alerta, mientras que los delfines permanecen nadando. Sin embargo, a la fecha no hay reportes publicados que documenten la existencia de sueño MOR en cetáceos, por lo que estos animales son los únicos mamíferos en los que aún no se ha observado este estado.

Por otro lado, el sueño unihemisférico es también observado en otros mamíferos marinos, como en los lobos marinos y otros otáridos (focas con orejas externas), que presentan otra diferencia con respecto al sueño de los mamíferos terrestres (**Mukhametov y cols., 1985**). Cuando están en el agua, los lobos marinos muestran un patrón de sueño unihemisférico similar al de los cetáceos. Sin embargo, el sueño de los lobos marinos, a diferencia del de los cetáceos, es acompañado de sorprendentes asimetrías motoras. La aleta contralateral al hemisferio de ondas lentas permanece inmóvil, la aleta contralateral al hemisferio con actividad de bajo voltaje rema para mantener la posición del animal, y el bigote contralateral al hemisferio con actividad de bajo voltaje es usado para monitorear la posición del lobo marino en el agua. Cuando la actividad de ondas lentas se invierte al hemisferio opuesto, también se invierten las asimetrías motoras. En el agua, el lobo marino presenta una cantidad extremadamente pequeña de sueño MOR, e inclusive puede permanecer sin presentar sueño MOR durante una o dos semanas. Sorprendentemente, cuando el lobo marino se traslada a la tierra después de permanecer semanas en el agua, inmediatamente ocurre un cambio en su estructura del sueño. Las ondas lentas unihemisféricas desaparecen en gran medida, y se presenta de manera bilateral el sueño MOR y no-MOR, similar en cantidad y forma a los patrones presentados por mamíferos terrestres de estatura comparable. Una característica notable de la transición del agua a la tierra es que,



los lobos marinos inmediatamente adoptan cierta cantidad de sueño en la tierra sin ninguna evidencia de recuperación de sueño MOR, a pesar de la ausencia o casi ausencia de sueño MOR mientras permanecen en el agua (**Lyamin y cols., 1996**). Sin embargo, aún queda por resolver cómo el cerebro alterna entre estos dos modos de sueño. De acuerdo con diversos investigadores, los estudios en mamíferos marinos y en aves sugieren fuertemente que, durante la evolución, los vertebrados han adoptado en múltiples ocasiones el sueño unihemisférico (evolución convergente). Este resultado puede implicar que la naturaleza innata del sueño en los vertebrados es localmente regulada. En ese sentido, el sueño unihemisférico podría ser una forma de sueño local (**Vyazovski y cols., 2011**).

### **3.2 Cambios fisiológicos durante el sueño**

Se sabe que diversas variables fisiológicas son controladas durante la vigilia a niveles óptimos para el funcionamiento del cuerpo. Por ejemplo, la temperatura, la presión sanguínea, los niveles de oxígeno, el dióxido de carbono y la glucosa en sangre permanecen bastante constantes durante la vigilia. Sin embargo, durante el sueño, las demandas fisiológicas son reducidas y, la temperatura y la presión sanguínea decrecen.

Los periodos de sueño no-MOR se caracterizan por una disminución del tono muscular, los movimientos corporales, la frecuencia cardiaca (FC), la respiración (FR), la presión sanguínea, el índice metabólico y la temperatura. Todos estos parámetros alcanzan sus valores mínimos durante el sueño de ondas lentas. Por el contrario, los periodos de sueño MOR se acompañan por aumento de la presión sanguínea, la FC, la FR, y el metabolismo hasta niveles casi tan altos como los observados en el estado de vigilia (**Foulkes y Schmidt, 1983; Trinder y cols., 2001**).

En general, muchas de nuestras funciones, como la frecuencia cardiaca (FC) y la respiratoria (FR) son altamente variables durante la vigilia o durante el sueño MOR, pero son extremadamente regulares cuando nos encontramos en el sueño no-MOR (**Trinder y cols., 2001; Somers y cols., 1993**).

En este contexto, los cambios en la FR, la FC y en la presión sanguínea están mediados primariamente por el Sistema Nervioso Autónomo (SNA). Se ha postulado que, estas fluctuaciones hemodinámicas son expresiones de la modulación cardiovascular autonómica de la FC y la presión sanguínea, debido a oscilaciones simpáticas y parasimpáticas del equilibrio simpático-vagal. Durante el sueño no-MOR se observa una modulación predominantemente vagal, y un control simpático significativo durante el sueño MOR, a niveles más altos de los observados durante la vigilia (**Trinder y cols., 2001; Somers y cols., 1993**). Estos datos han sido confirmados mediante el análisis espectral, por los registros directos de las fibras simpáticas utilizando técnicas microneurográficas (**Somers y cols., 1993**) y por el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (heart rate variability, HRV), que es una herramienta no invasiva y capaz de detectar oscilaciones rítmicas en las series de tiempo de la actividad cardiaca y la presión sanguínea (**Montano y cols., 2009**). Mediante el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca, se han identificado tres principales componentes oscilatorios: un componente de muy baja frecuencia (VLF, very low frequency), marcador de oscilaciones circadianas y hormonales; un componente de baja frecuencia (LF, low frequency), marcador de la modulación simpática; y un componente de alta frecuencia (HF, high frequency), marcador de la modulación vagal y sincronización con la respiración (**Montano y cols., 2009**). La HRV ha sido ampliamente utilizada para evaluar el control autonómico durante el sueño, mostrando un progresivo decremento del componente LF, marcador de la modulación simpática, y un predominante control vagal, a medida que el sueño se vuelve más profundo (desde la vigilia al sueño profundo no-MOR). Por el contrario, el sueño MOR se caracteriza por una modulación simpática con picos de actividad simpática a niveles incluso más altos que durante la vigilia (**Brandenberger y cols., 2003; Legramante y cols., 2003; Trinder y cols., 2001; Tobaldini y cols., 2014**).

A pesar de la riqueza de la información descriptiva acerca de las etapas del sueño y de un esfuerzo de investigación intenso en los últimos años, los propósitos funcionales de las etapas del sueño aún se conocen poco. Aunque la mayor parte de la evidencia sugiere que el sueño está relacionado con diversos procesos como

la consolidación del aprendizaje y la memoria, la estabilidad emocional y el mantenimiento de la homeostasis cerebral, los mecanismos mediante los cuales el sueño cumple estas funciones son poco claros (**Rechtschaffen, 1998; Maquet, 2001; Siegel, 2003, 2005; Frank, 2006; Cirelli y Tononi, 2008; Walker, 2009, 2010; Diekelmann y Born, 2010; Schmidt, 2014; Yamazaki y cols., 2020**). La mayoría de los investigadores aceptan la idea de que la función del sueño no-MOR es, al menos en parte, reparadora y que el sueño de ondas lentas está implicado específicamente en el mantenimiento de la homeostasis sináptica en mamíferos (**Tononi y Cirelli, 2003, 2006**). Sin embargo, aún no se ha encontrado una respuesta definitiva a la pregunta principal acerca de ¿cuál es la función del sueño?

### **3.3 Sueño en invertebrados**

Un enfoque diferente para descubrir los orígenes y las funciones del sueño puede ser a través del estudio de organismos no mamíferos, quienes han permanecido relativamente sin cambios desde sus ancestros fósiles y que podrían proporcionar evidencia acerca del origen del sueño. Un comportamiento como el sueño, desde luego, no deja un registro fósil, lo que limita fuertemente la información obtenida con respecto al origen de este. Sin embargo, los organismos filogenéticamente antiguos como los insectos, peces, anfibios, reptiles y mamíferos primitivos podrían arrojar información acerca de la función del sueño (**Hartse, 2011**).

Este enfoque filogenético para investigar el origen del sueño ha generado cierta controversia, y existe desacuerdo en la literatura acerca de la presencia o ausencia del sueño en organismos no mamíferos. En general, existe un consenso con respecto a que los organismos no mamíferos presentan sueño conductual o descanso. Sin embargo, la electrofisiología del sueño puede ser muy diferente a la de los mamíferos (**Walker y Berger, 1973**).

En ese sentido, los invertebrados representan un grupo de gran variedad de organismos, con planes corporales mucho más diversos que los de los vertebrados, pero con tamaños, por lo regular, pequeños. En este grupo se han descrito muchas conductas de reposo, que se han analizado más en la óptica de los ritmos circadianos que en la de sueño. En los invertebrados en los que se ha estudiado el

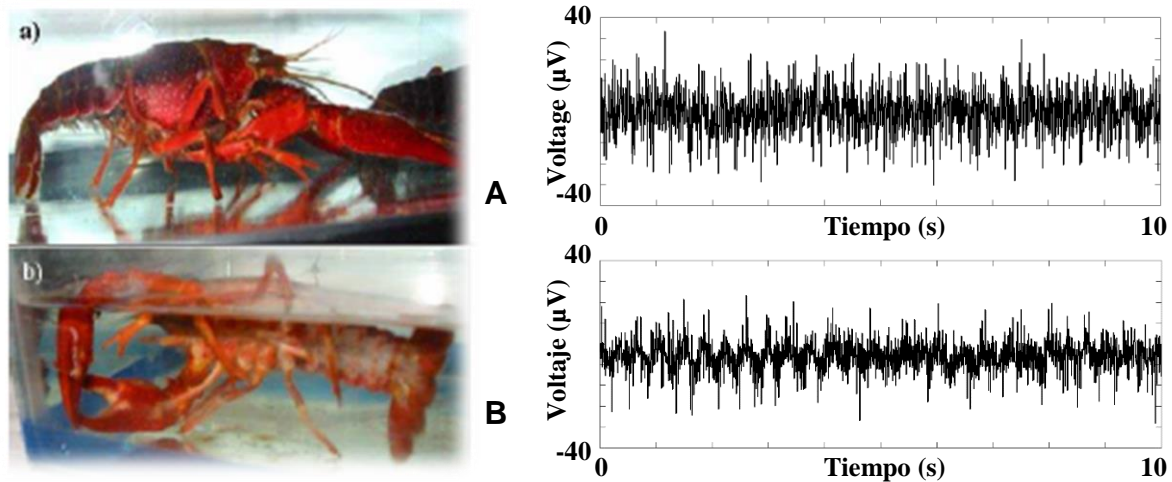
sueño (escorpiones, **Tobler y Stadler, 1988**; abejas, **Kaiser, 1988**; cucaracha, **Tobler y Neuner-Jehle, 1992**; moscas, **Hendricks y cols., 2000**), la descripción es fundamentalmente conductual debido a que es difícil registrar la actividad eléctrica del cerebro de estos animales, aunque en algunos casos se han demostrado modificaciones en la actividad eléctrica cardíaca (**Tobler, 1984**), y cerebral (**van Alphen y cols., 2013**). Durante las últimas décadas, los modelos genéticos del tipo de los gusanos nemátodos *Caenorhabditis elegans* (**Raizen y cols., 2008**), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (**Hendricks y cols., 2000a**; **Shaw y cols., 2000**) y el pez cebra *Danio rerio* (**Zhdanova y cols., 2001**; **Prober y cols., 2006**; **Yokogawa y cols., 2007**) han sido particularmente estudiados con la finalidad de dilucidar los componentes genéticos y moleculares que subyacen el sueño. Hasta el momento, el acocil es el único invertebrado en el que se ha descrito el sueño a partir de criterios conductuales y electrofisiológicos utilizando una preparación de animal completo y deambulante (**Ramón y cols., 2004**).

### **3.4 Sueño en el acocil**

El acocil es un invertebrado con un número relativamente pequeño de neuronas en su cerebro. Se ha usado como modelo de estudio de algunas de las funciones cerebrales de las llamadas ‘complejas’, debido a que en este decápodo es posible colocar crónicamente electrodos extracelulares sobre la superficie del cerebro y mantenerlos durante periodos prolongados (**Hernández y cols., 1996**). De esta manera se han registrado potenciales evocados de tipo visual, respuestas a estímulos omitidos y señales asociadas con el procesamiento de información visual en el animal deambulante (**Hernández-Falcón y cols., 1999**). Usando esta preparación se caracterizó el sueño en el acocil (**Ramón y cols., 2004**).

El sueño en el acocil está caracterizado por una posición especie-específica (de lado a nivel de la superficie del agua, **Figura 3.1 B**), por un incremento en el umbral de respuesta a estímulos externos, ausencia de señales eléctricas de procesos cognitivos, una actividad eléctrica cerebral única para este estado, y un fuerte decremento en potencia en la banda de frecuencia de los 30-45 Hz. Durante la vigilia, el acocil deambula alrededor del acuario y registros de la superficie

cerebral muestran numerosas espigas de diversos tamaños superpuestas sobre una línea base plana (**Figura 3.1 A**). En el animal dormido (**Figura 3.1 B**), las espigas son sustituidas por ondas lentas con frecuencias en el rango de 10 a 20 Hz (**Ramón y cols., 2004; Mendoza-Ángeles y cols., 2010**). Sin embargo, aún no se han descrito fases de sueño en este u otro invertebrado. Aunque, se ha postulado que en *Drosophila* existen etapas de sueño (**van Alphen y cols., 2013**).



**Figura 3.1.** Posiciones del acocil y su actividad eléctrica cerebral. (**A**) animal deambulante, (**B**) animal dormido. (**Modificada de Mendoza-Ángeles, 2005**).

Por otra parte, en crustáceos, como el acocil, se sabe que durante la vigilia la interacción social, la cópula e inclusive perturbaciones en el ambiente inducen cambios en la frecuencia cardíaca y en la respiratoria (**Schapker y cols., 2002; Shuranova y cols., 2006; Cooper y cols., 2011; Canero y Hermitte, 2014**). Los resultados que obtuve a lo largo de este proyecto muestran que cambios en estas variables ocurren también durante el sueño (**Osorio-Palacios y cols., 2021**). Sin embargo, aún no hay descripciones de la existencia de un Sistema Nervioso Autónomo y se desconocen los mecanismos y las vías que median esta regulación.

El propósito principal de este trabajo fue analizar series de tiempo de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria del acocil, mediante la transformada wavelet, matrices de correlación de Pearson y técnicas de aprendizaje no supervisado, con la finalidad de buscar fases de sueño y determinar la relación entre estas actividades durante el sueño.

A continuación, hago una descripción breve de las técnicas de análisis implementadas y del análisis estadístico aplicado:

### 3.5 Análisis de señales

Las señales son representaciones de una variable física a través de una función y contienen la información del comportamiento de cualquier proceso que involucre a esa variable. Para una aplicación práctica, un proceso físico puede ser descrito en el dominio del tiempo ( $t$ ) mediante valores representados por una función  $f(t)$ , o alternativamente, en el dominio de la frecuencia ( $w$ ), mediante una serie de amplitudes representadas por  $F(w)$ .

En el caso de los vertebrados, la actividad eléctrica cerebral (electroencefalograma, EEG) se ha analizado mediante la transformada rápida de Fourier (**Thakor y Tong, 2004**). Es decir, a través de un procedimiento matemático que descompone una función en las frecuencias que le forman. Sin embargo, el análisis de Fourier fue diseñado para señales estacionarias y periódicas, por lo que presenta un problema al pretender determinar el instante en que ocurre un evento en particular. En los mamíferos, éste análisis funciona debido a que, en la mayoría de los casos, ya sea en un individuo dormido o despierto, las señales del EEG son estacionarias o cuasi-estacionarias. Sin embargo, comparada con el EEG del vertebrado, la actividad eléctrica del cerebro del acocil es mucho menos homogénea y el cálculo de sus parámetros estadísticos (media y desviación estándar móviles) muestra que la señal es no estacionaria tanto en animales alerta como en animales dormidos (**Mendoza-Ángeles y cols., 2005, 2007**). Por lo que, para determinar la dinámica de la actividad electrofisiológica del acocil tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia, ha sido necesaria la utilización de una herramienta distinta, diseñada para el análisis de señales no estacionarias, como la transformada wavelet.

#### 3.5.2 Transformada Wavelet

La transformada wavelet continua (TWC) es un análisis lineal

multirresolución a través de ventanas de longitudes variables. Es un método que proporciona buena resolución en el tiempo y en la frecuencia, y resulta apropiado para la detección de transitorios en señales no estacionarias. Para la aplicación de la TWC, utilicé una forma de onda localizada, conocida como wavelet madre. Matemáticamente, la TWC puede ser interpretada como la convolución entre una señal y versiones desplazadas y escaladas de la wavelet madre, es decir, tenemos una ventana de longitud variable que decrece en el tiempo mientras analizamos los componentes de alta frecuencia e incrementa en el tiempo para analizar los componentes de baja frecuencia de la señal (**Addison, 2005**).

Utilicé la TWC para el análisis de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria correspondiente a cada episodio completo de sueño. Para ello, dividí cada uno de los episodios en ventanas de 30 s. Para el análisis de la actividad cerebral, utilicé un software desarrollado en el laboratorio mediante MATLAB. En el caso de la actividad cardiorrespiratoria, usé el toolbox wavelet. En ambos análisis seleccioné la función Morlet como la wavelet madre.

Posteriormente, por cada episodio completo de sueño determiné el patrón temporal de sueño y la relación entre la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria durante el mismo, para este fin, utilicé matrices de correlación de Pearson y análisis de agrupamiento de datos con *k*-means.

### ***Matrices de Correlación de Pearson***

El cálculo del coeficiente de correlación entre cada par de elementos o entre variables pertenecientes a un conjunto de datos, se conoce como matrices de correlación. Es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de datos, procesamiento de señales, reconocimiento de patrones, procesamiento de imágenes y en bioinformática (**Pratt, 1974; Brown, 1991; González y Woods, 2002; Chang y cols., 2009**). De manera general, las matrices de correlación de Pearson son una técnica de análisis multivariable, en la que es posible estudiar la relación temporal (por ejemplo, la evolución temporal del sueño) y la relación espacial (relación entre variables). Utilicé esta técnica con la finalidad de determinar la evolución temporal del sueño en cada uno de los episodios. A través

de este análisis identifiqué de manera cualitativa que durante el sueño los datos provenientes del cerebro, el corazón y las cámaras branquiales del acicil se agrupan en diferentes conjuntos (interrelación temporal). Posteriormente, apliqué un análisis de agrupamiento de datos mediante *k*-means a cada episodio de sueño, esto con la finalidad de confirmar de manera cuantitativa el número de conjuntos encontrados con las matrices de correlación de Pearson.

### ***Análisis de Agrupamiento de Datos (k-means)***

*k*-means es una técnica de aprendizaje no supervisado; este tipo de aprendizaje infiere patrones de un conjunto de datos sin referencia a resultados conocidos o etiquetados, es decir, sólo conocemos los datos de entrada, pero no existen datos de salida que correspondan a una determinada entrada. Los algoritmos de aprendizaje no supervisados como *k*-means se utilizan para agrupar los datos no estructurados según sus similitudes y patrones distintos en el conjunto de datos. De manera que, *k*-means consiste en agrupar datos en ***k*** particiones, esto en función de la suma de las distancias entre cada objeto y el centroide de su grupo o clúster, de manera que se minimiza la varianza de los datos intracluster.

El algoritmo inicia particionando los datos de entrada ( $x_j$ ) en ***k*** conjuntos determinados inicialmente de manera aleatoria o a través de datos heurísticos. Después, calcula el centroide de cada grupo y determina la distancia entre cada uno de los datos y los centroides de los grupos con la finalidad de asignar cada  $x_j$  al grupo con el centroide más cercano. Finalmente, se actualiza la posición del centroide de cada grupo, este proceso es iterado hasta que el algoritmo converge, mismo que se obtiene cuando la asignación de los datos no cambia de conjunto (**Wittek, 2014**).

Para este proyecto, el objetivo del análisis con *k*-means fue determinar de manera clara el agrupamiento *natural* de los datos provenientes de las variables electrofisiológicas durante el sueño dentro de ***k*** grupos.

Finalmente, utilicé el análisis de componentes principales con la finalidad de graficar en el espacio bidimensional los resultados del agrupamiento de los datos.



## ***Análisis de Componentes Principales***

El análisis de componentes principales (PCA), al igual que el de *k*-means, es una técnica de aprendizaje no supervisado. Resulta particularmente útil en el análisis exploratorio de “grandes conjuntos de datos”, en donde se cuenta con múltiples variables para cada muestra (**Abdi y Williams, 2010**). En particular, el objetivo del análisis con PCA fue reducir el número de dimensiones originales a un número menor de variables (conocidas como componentes principales), con la finalidad de visualizar en el espacio de dos dimensiones los resultados obtenidos del análisis multivariable con *k*-means. Estas componentes principales resultantes, son una combinación lineal de las variables electrofisiológicas originales y preservan la mayor cantidad de información o varianza posible.

## ***Análisis Estadístico***

Por último, determiné si en cada uno de los episodios de sueño existen diferencias significativas entre los datos obtenidos antes (1 minuto), durante el episodio y después (1 minuto) de este. Para ello analicé de manera individual cada variable registrada (cerebro, corazón, cámara branquial 1 y cámara branquial 2, en cada una de estas condiciones. Debido a que el número de datos es diferente, antes y después del episodio se cuenta con un minuto de datos, y durante el episodio completo de sueño la cantidad de datos obtenidos depende de la duración del episodio analizado (los episodios más cortos constan de una duración de 5 minutos), construí ensambles aleatorios con la finalidad de evitar problemas con respecto al tamaño de los datos.

Por otra parte, una vez que llevé a cabo el análisis multivariado con *k*-means, determiné si existen diferencias significativas entre el número de conjuntos resultantes, para ello apliqué la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones *post hoc* de Wilcoxon. Consideré las diferencias estadísticamente significativas con un *p*-valor < 0.05. Finalmente, calculé el tamaño de efecto para la prueba de Kruskal-Wallis mediante el valor de épsilon cuadrado ( $\epsilon^2$ ) con lo que cuantifiqué posibles discrepancias entre los conjuntos.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los diferentes modelos biológicos usados hasta ahora muestran que el sueño es indispensable no solo para tener una buena calidad de vida, sino para el mantenimiento de la vida misma.

En los vertebrados, como mamíferos y aves, el sueño es un proceso dinámico que comprende las fases de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y sueño no-MOR. Ambas caracterizadas por una actividad eléctrica cerebral específica y acompañadas de cambios en la frecuencia cardíaca (FC) y respiratoria (FR).

En algunos invertebrados como el acocil se ha descrito el fenómeno del sueño a partir de los mismos criterios que en el vertebrado. El sueño en el acocil está caracterizado por una posición estereotípica (de lado a nivel de la superficie del agua), incremento en el umbral de respuesta a estímulos externos, una actividad eléctrica cerebral única para este estado y un fuerte decremento en potencia en la banda de frecuencia de los 30-45 Hz. En el animal dormido, las espigas presentes durante la vigilia son sustituidas por ondas lentas con frecuencias de 10-20 Hz.

A pesar de que en este crustáceo aún no se han descrito estructuras anatómicas autonómicas, se sabe que durante la vigilia diversos estímulos mecánicos, visuales, de interacción agonista, la cópula o perturbaciones en su ambiente, generan cambios en la actividad cardiorrespiratoria y que, variaciones en estas variables ocurren también durante el sueño. Sin embargo, se desconoce cuál es el patrón de la actividad cardiorrespiratoria durante el sueño y tampoco se sabe si en este invertebrado existen fases de sueño.

Considerando que el acocil puede usarse como modelo de estudio del sueño, en la medida que cumple con los criterios conductuales y electrofisiológicos que definen esta actividad en el vertebrado, y puesto que durante la vigilia y el sueño existen diversas variaciones cardiorrespiratorias que mantienen la homeostasis en este animal, es posible postular que, el análisis en conjunto de la actividad eléctrica cerebral y la actividad cardiorrespiratoria permitirá determinar si el acocil presenta fases de sueño. Lo que arrojaría mayor evidencia sobre la

existencia de un mecanismo de regulación autonómica en este invertebrado, aunque se desconozcan las estructuras anatómicas implicadas.

## **5. OBJETIVO**

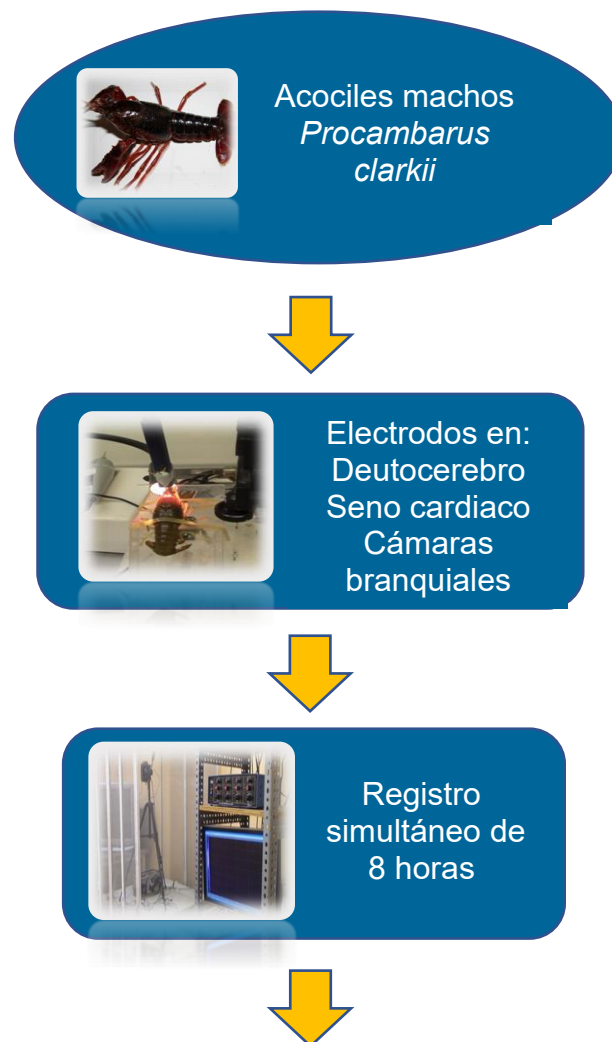
El objetivo principal de este trabajo fue analizar la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria de acociles adultos *Procambarus clarkii* mediante la transformada wavelet (TW), matrices de correlación de Pearson y técnicas de aprendizaje no supervisado con la finalidad de identificar si el acocil presenta fases de sueño y determinar cuál es la relación que existe entre estas variables durante el mismo.

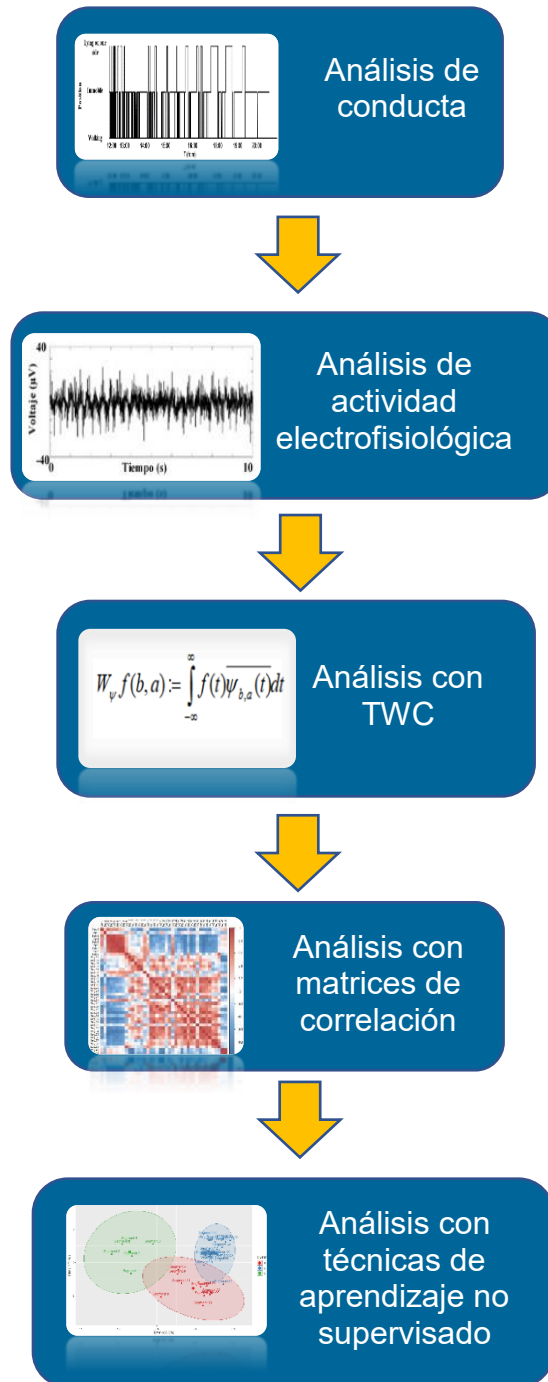
## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de cumplir con los objetivos propuestos, llevé a cabo el siguiente diseño experimental (**Figura 6.1.**):

Utilicé acociles adultos machos para la realización de todo el trabajo. Implanté de manera crónica electrodos en las siguientes estructuras: deutocerebro, seno cardiaco y en ambas cámaras branquiales.

Después de dos días de recuperación, registré de manera simultánea la conducta y la actividad electrofisiológica. Los registros de cada acocil tuvieron una duración de 8 horas continuas.





**Figura 6.1.** Diseño experimental

Para evaluar los aspectos conductuales y electrofisiológicos, consideré tres posiciones que muestra el acocil a lo largo del tiempo: de lado, inmóvil o caminando, y asocié cada una de estas posiciones con el tiempo de registro, la hora de inicio y

el tiempo que permaneció en cada una de estas.

Con los datos obtenidos construí gráficas de posición contra tiempo y posteriormente relacioné cada una de estas posiciones con la actividad electrofisiológica adquirida.

Utilicé la TWC para el análisis de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. Mediante esta técnica determiné las principales bandas de frecuencia presentes en la actividad cardiaca y respiratoria, así como, los valores de potencia promedio a lo largo del tiempo.

Con los valores de potencia promedio obtenidos para cada variable, llevé a cabo un análisis multivariado mediante matrices de correlación de Pearson con la finalidad de determinar la evolución temporal del sueño. Este análisis me permitió obtener de manera cualitativa el número de conjuntos en los que se agrupan los datos provenientes de cerebro, de corazón y de las cámaras branquiales durante el sueño.

Posteriormente, utilice un análisis de agrupamiento de datos mediante *k*-means con el objetivo de confirmar cuantitativamente los resultados obtenidos con las matrices de correlación. Mediante el análisis de componentes principales visualicé gráficamente en el espacio de dos dimensiones los resultados del análisis con *k*-means.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material Biológico

Para la realización de este proyecto utilicé acociles machos adultos, *Procambarus clarkii* (7-10 cm de *rostrum* a telson) en intermuda, con un peso de 20-30 g (n = 3). Desde su llegada al laboratorio los animales se colocaron en acuarios individuales de 30x15x10 cm, bajo ciclos de luz-oscuridad 12:12 (encendido a las 7:00, apagado a las 19:00 h) a temperatura ambiente (20 °C), y fueron alimentados una vez a la semana con croquetas para gato.

### 7.2 Registros Conductuales

Para determinar los cambios de posición de un acocil a lo largo del día, obtuve videos ininterrumpidos durante periodos de 8 horas continuas y simultáneamente registré la actividad electrofisiológica. Los experimentos fueron realizados entre las 12:00 h y las 20:00 h.

### 7.3 Registros Electrofisiológicos

Con la finalidad de determinar la relación entre los estados cerebrales del acocil y la actividad cardiorrespiratoria, implanté electrodos en las siguientes estructuras: cerebro, seno cardiaco y en ambas cámaras branquiales (ver **Anexo 2**).

A continuación, hago una breve descripción de la elaboración de los electrodos utilizados y de la preparación biológica.

#### 7.3.1 Actividad Eléctrica Cerebral

Para registrar la actividad eléctrica cerebral, llevé a cabo el procedimiento descrito en **Ramón y cols., 2004**. En acociles previamente anestesiados con frío (ver **Anexo 1**) realicé un hueco en el caparazón dorsal, llevé a cabo una disección roma de los músculos del cefalotórax, desplacé las vísceras hacia atrás (principalmente el estómago), y las mantuve en esa posición mediante un separador de plástico, de tal manera que quedó expuesto el fondo de la cavidad cefálica y el cerebro. Retiré la



hemolinfa y coloqué la preparación bajo el microscopio estereoscópico. Con ayuda de un micromanipulador, descendí el electrodo hasta colocarlo específicamente en el deutocerebro (**Mendoza-Ángeles y cols., 2010**), procurando formar un sello eléctrico en el momento en que todo el borde de la cánula estuviera asentado sobre el cerebro. Utilicé la cánula como electrodo de referencia y lo fijé al exoesqueleto con cemento dental (**Figura 7.1.**).

Utilicé electrodos como los reportados por **Hernández y cols., (1996)**, que consisten en cánulas de acero inoxidable (1 mm de diámetro externo) que en su interior portan dos alambres de platino-iridio (Pt-Ir) de 127µm de diámetro recubiertos de teflón y por fuera porta otro alambre igualmente de Pt-Ir soldado a la propia cánula. Las puntas de alambre sobresalen cerca de 0.5 mm de la cánula y penetran en la vaina de tejido conectivo que recubre el cerebro. Este diseño permite obtener un registro de campo en la vecindad delimitada por la cánula.

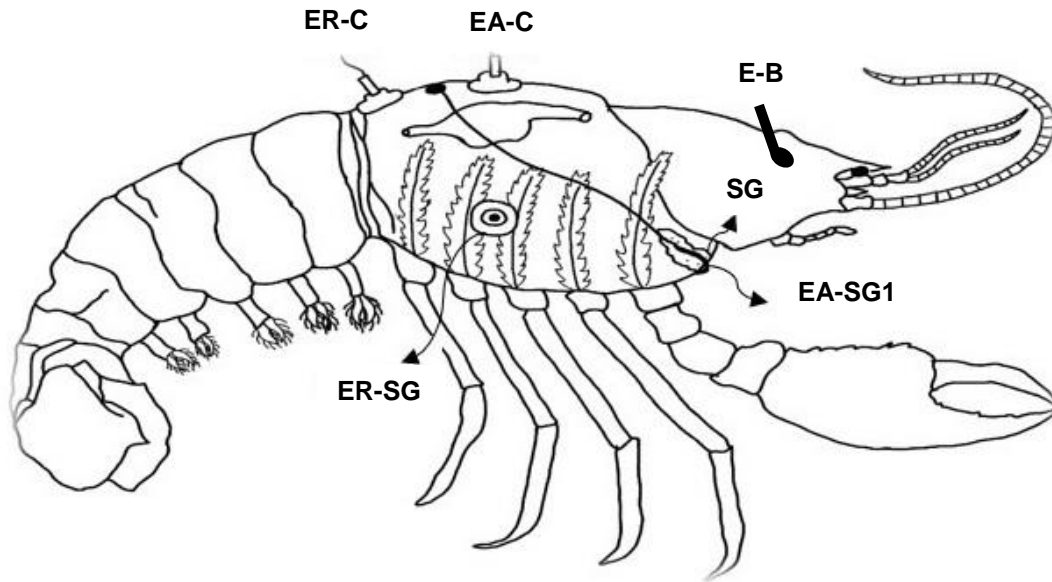
### **7.3.2 Actividad Eléctrica Cardíaca**

Para obtener la actividad eléctrica del corazón, en acociles previamente anestesiados con frío realicé una perforación circular a la altura del seno cardíaco en el dorso del cefalotórax (ver **Anexo 2**). A través de este orificio, introduje un tubo de PVC que en su interior porta un alambre de Pt-Ir (127µm de diámetro y 2 mm de largo) recubierto de teflón, excepto en la punta y procuré que ésta no sobresaliera del tubo de PVC. Posteriormente, fijé el electrodo al exoesqueleto con cemento dental. Utilicé este conjunto como electrodo activo. Como referencia introduje otro electrodo a 5 mm de distancia del activo, en dirección de *rostrum* a telson (**Figura 7.1.**).

### **7.3.3 Actividad Eléctrica Respiratoria**

Para registrar la actividad eléctrica generada por los músculos de la respiración, en acociles previamente anestesiados por frío, coloqué un electrodo en forma de gancho (electrodo activo) dentro de cada una de las cámaras branquiales e introduje un tercer electrodo (electrodo de referencia) en la región lateral del exoesqueleto. Posteriormente, fijé cada uno de los electrodos al caparazón utilizando cemento dental (ver **Figura 7.1.**). Para construir los electrodos utilicé alambres de

platino-iridio (127  $\mu\text{m}$  de diámetro y 3 mm de largo), soldé una punta del alambre a un cable flexible, doblé el alambre a la altura de la soldadura formando una especie de gancho, lo que me permitió colocar y fijar fácilmente el electrodo dentro de la cámara branquial.



**Figura 7.1.** Representación esquemática de la ubicación de los electrodos que registran la actividad electrofisiológica. En el caparazón dorsal dos electrodos en posición dorsal-caudal monitorizan la actividad eléctrica cardíaca. Dos electrodos en forma de gancho (uno en cada cámara branquial) registran la actividad eléctrica generada por los escafognatitos (SG); un tercer electrodo (ER-SG) ubicado en la porción lateral del caparazón funciona como electrodo de referencia de estas estructuras. EA-SG1 (electrodo activo-escafognatitos lado1); ER-C (electrodo de referencia-corazón), EA-C (electrodo activo-corazón). Para el registro de la actividad eléctrica cerebral, implanté electrodos de Pt-Ir recubiertos de teflón (127 $\mu\text{m}$  de diámetro) en deutocerebro (ver **Hernández y cols., 1996**). E-B (electrodo de cerebro).

#### 7.3.4 Adquisición de Señales Electrofisiológicas

Una vez implantados los acociles, los coloqué en acuarios individuales y dejé que se recuperaran de la cirugía por al menos 48 horas.

Posteriormente, obtuve el registro simultáneo de conducta y de actividad electrofisiológica correspondientes a acociles individuales. Como previamente mencioné, los registros tuvieron una duración de 8 horas continuas.

Para el registro electrofisiológico, envié la actividad eléctrica cerebral y

cardiorrespiratoria recogida por los electrodos a amplificadores AC (CWE, BM400). Filtré la actividad eléctrica cerebral con un pasabanda entre 3 Hz y 3 kHz y digitalicé la señal mediante un convertidor A/D (National Instrument, NI-USB-6211) utilizando una frecuencia de muestro de 2 kHz.

En el caso de la actividad cardiorrespiratoria, filtré la señal entre 1 Hz y 1 kHz usando una frecuencia de muestreo de 100 Hz.

Adquirí todos los datos usando el software Matlab (MathWorks) mediante un algoritmo desarrollado en el laboratorio. Por último, almacené los datos en una computadora para su posterior análisis.

Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina UNAM 023/2018.

## **7.4 Análisis de Datos**

### **7.4.1 Análisis Conductual**

Para el análisis de la actividad conductual definí tres condiciones del acocil: deambulante, de lado e inmóvil, y posteriormente asocié cada una de estas con el tiempo de registro. En la primera condición, el acocil camina alrededor del acuario, toca las paredes con las antenas y eventualmente permanece inmóvil o de lado a nivel de la superficie del agua. Esta última posición ha sido ampliamente descrita en trabajos previos (**Ramón y cols., 2004; Mendoza-Ángeles y cols., 2007, 2010**). Brevemente, ésta consiste en un animal descansando las patas de uno de los lados sobre el fondo del acuario soportando todo el peso del acocil, mientras que, las patas contralaterales se encuentran recargadas sobre una de las paredes, de esta manera ambas quelas quedan suspendidas en el fondo. Finalmente, la última posición consiste en un acocil inmóvil con ambas quelas descansando en la base del acuario; ver las distintas posiciones en la **Figura 7.2**.

Con los datos obtenidos elaboré gráficas de tiempo contra posición en las que consideré los registros completos de 8 horas continuas. Marqué la duración de cada condición, así como, el instante en el que ocurrió una transición de una condición a otra. Posteriormente, asocié cada posición identificada con los registros electrofisiológicos.



**Figura 7.2.** Representación esquemática del acocil en diversas posiciones: deambulante (panel izquierdo), inmóvil (panel intermedio) y de lado (panel derecho).

#### 7.4.2 Análisis Electrofisiológico

Una vez que identifiqué las diferentes posiciones que el acocil adoptó a lo largo de los registros conductuales, seleccioné únicamente aquellos segmentos en los que el animal permaneció de lado o inmóvil al menos durante 5 minutos continuos. Consideré cada uno de estos segmentos de lado como episodios completos de sueño.

Analiqué al menos 25 episodios completos de sueño correspondientes a los 3 acociles. La duración de cada uno de estos varía entre 5 y 20 minutos.

De manera general, llevé a cabo el siguiente procedimiento: dividí la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria en ventanas de 30 s, posteriormente analicé cada una de estas mediante la transformada wavelet continua (TWC).

De la aplicación de la TWC obtuve gráficas que incluyen tiempo, frecuencia y potencia codificada en color usando el espectro de luz visible (tonos rojos-potencias altas y tonos azules-potencias bajas).

A partir de la TW obtuve las principales bandas de frecuencias que componen la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria, así como, los valores de potencia presentes.

En el caso de la actividad eléctrica cerebral, únicamente analicé la banda de frecuencia de 0-60 Hz (**Ramón y cols., 2004; Mendoza-Ángeles y cols., 2005**). Para el análisis de la actividad cardíaca y respiratoria, la TWC mostró que la potencia de estas señales cambia a través del tiempo y lo hace principalmente en las bandas de frecuencia de 0-45 y de 0-12 Hz, respectivamente.

De manera concreta, del análisis con la TWC, obtuve la potencia promedio total de las señales electrofisiológicas dentro de las siguientes bandas de frecuencia: actividad cerebral (30-60 Hz) (**Ramón y cols., 2004; Mendoza-Ángeles y cols., 2010**), cardíaca (0-2, 3-12 y 13-45 Hz) y respiratoria (para cada cámara branquial: 0.5-3 y de 3-12 Hz). Como previamente mencioné, seleccioné las bandas de frecuencia de la actividad cardiorrespiratoria a partir de los gráficos de la TWC.

Utilicé los valores de la potencia promedio obtenidos para identificar el comportamiento individual de las variables electrofisiológicas a lo largo de cada episodio completo de sueño. Para ello, elaboré gráficas de densidad de datos en las que incluí la potencia promedio antes (1 minuto), durante el episodio completo de sueño y después (1 minuto) de este.

Asimismo, con la finalidad de determinar la evolución temporal del sueño llevé a cabo un análisis multivariado mediante matrices de correlación de Pearson, en el que incluí la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. Con estos valores obtenidos construí una matriz de datos  $\mathbf{X}$ ,  $n$ -por- $p$ . En donde las  $n$  filas corresponden a cada uno de los segmentos de 30 s que conforman el episodio completo de sueño y las columnas corresponden a cada una de las variables (8 variables teniendo en cuenta la división en las bandas de frecuencia). Lo primero que hice fue normalizar la matriz  $\mathbf{X}$ , es decir, la matriz en conjunto tiene media cero y varianza unitaria, posteriormente con estos datos, determiné la matriz de correlación temporal del sueño  $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$ . Cada matriz construida contiene información antes (1 minuto), durante el episodio completo de sueño y después (1 minuto) de este.

. Finalmente, desarrollé un análisis de agrupamiento de datos con  $k$ -means con la finalidad de separar los segmentos que conforman la matriz  $\mathbf{X}$  en  $k$  grupos, y así determinar la relación entre la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria durante el sueño. Para determinar el número de grupos en los que los datos se distribuyen, utilicé la biblioteca NbClust, perteneciente al software R, que computariza 30 diferentes índices variando todas las combinaciones posibles del número de grupos, las medidas de distancia y los métodos de agrupamiento (**Charrad y cols., 2014**), y de los diferentes resultados obtenidos propone el mejor esquema de agrupamiento. Para la manipulación de los datos y el desarrollo del algoritmo con  $k$ -means utilicé las librerías tidyverse y

cluster (Wickham y cols., 2019; Maechler y cols., 2021).

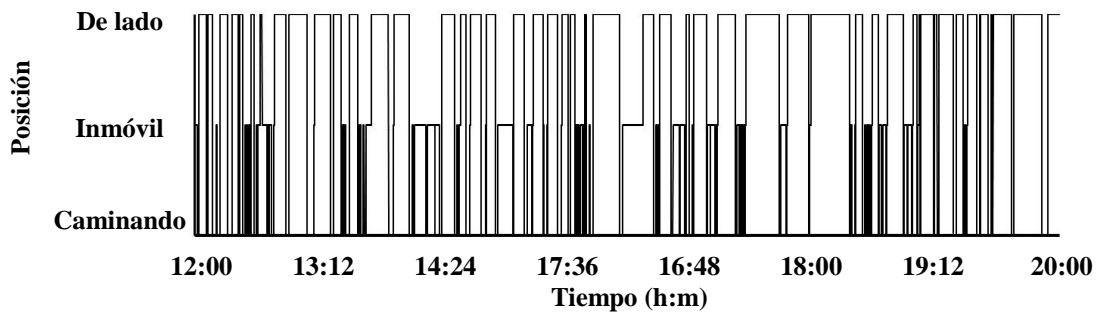
## 8. RESULTADOS

### 8.1 ¿Cómo Duerme el Acocil?

Como previamente se ha reportado (Ramón y cols., 2004), la caracterización del sueño en el acocil está basada en los mismos criterios conductuales y electrofisiológicos definidos para los vertebrados.

#### 8.1.1 Criterios Conductuales

El acocil moviéndose libremente en el acuario, puede caminar o colocarse de lado a nivel de la superficie del agua (Figura 7.2) y permanece en estas posiciones por periodos variables que no parecen depender de la hora del día (Figura 8.1).



**Figura 8.1.** Posición de un acocil durante un periodo de 8 horas continuas.

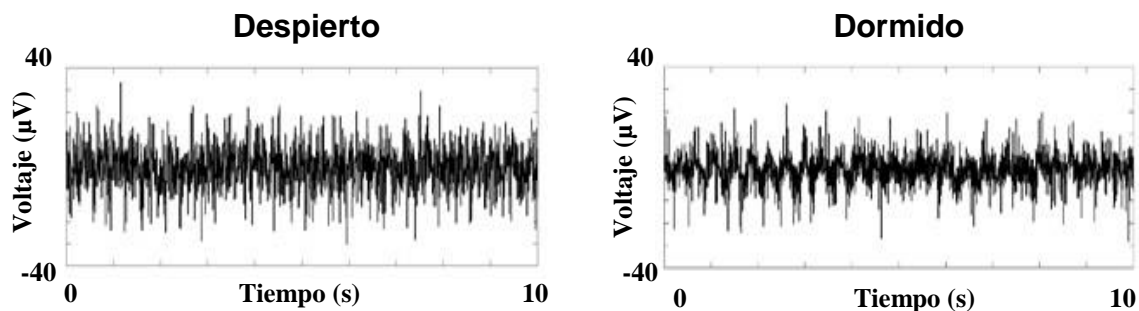
Esta última ha sido descrita como la posición estereotípica de sueño en el acocil, mientras que el animal caminando está asociado con la vigilia (Figura 7.2). Sin embargo, el análisis conductual muestra que en un registro típico de 8 horas los acociles permanecen inmóviles durante un tiempo considerable, comúnmente con las quelas descansando en el fondo del acuario, y en algunas ocasiones con las antenas y las anténulas descendidas (descansando sobre la base) (Figura 7.2).

Del análisis conductual correspondiente a cada uno de los acociles determiné que, las probabilidades de que el acocil esté caminando, inmóvil o de lado

son  $0.4 < p < 0.5$ ;  $0.3 < p < 0.4$  y  $p \approx 0.2$ , respectivamente. Aunque, existen diferencias con respecto a la duración en cada posición. Por otra parte, hasta la fecha se desconoce cuál es el patrón de la actividad eléctrica cerebral presente en los acociles inmóviles (**ver abajo**).

### 8.1.2 Criterios Electrofisiológicos

La actividad eléctrica cerebral de un animal alerta (acocil despierto) está conformada por numerosas espigas montadas sobre una línea base plana; cuando el acocil se coloca de lado a nivel de la superficie del agua (acocil dormido), estas espigas son reemplazadas por ondas lentas entre 15 y 20 Hz (**Figura 8.2**). Estos resultados se ajustan a los descritos previamente (**Ramón y cols., 2004; Mendoza-Ángeles y cols., 2010**).

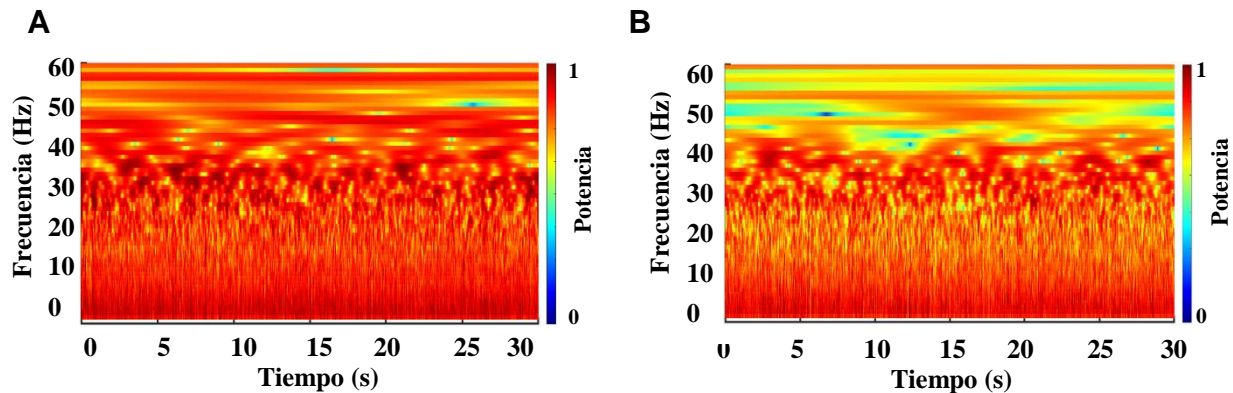


**Figura 8.2.** Actividad eléctrica cerebral del acocil (Modificada de **Osorio-Palacios, 2021**).

El análisis mediante la TWC de la actividad eléctrica cerebral de los acociles dormidos (de lado) mostró claras diferencias en la mayoría de las frecuencias analizadas en comparación con los acociles despiertos. Como previamente se ha reportado (**Ramón y cols., 2004; Mendoza-Ángeles y cols., 2010**), cuando el acocil duerme el principal cambio es un decremento en potencia, principalmente en la banda de los 30-45 Hz; mientras que el acocil despierto presenta potencias altas en toda la banda de frecuencias (**Figura 8.3**, tonos rojos-potencias altas y tonos azules-potencias bajas).

Sin embargo, los resultados que obtuve muestran que este decremento

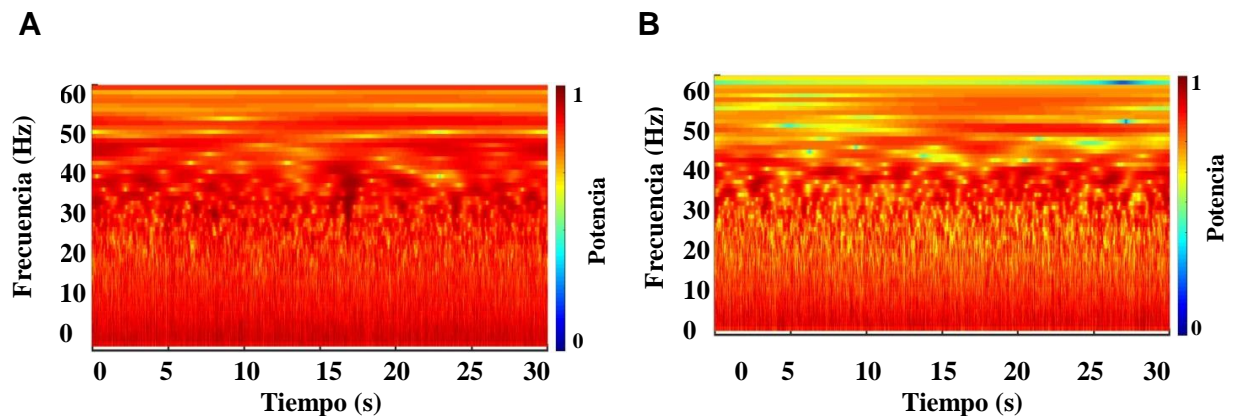
en potencia puede extenderse hasta los 60 Hz (**Figura 8.3. B**).



**Figura 8.3.** Representación codificada en color de la TWC obtenida de la actividad eléctrica cerebral de un acocil despierto (**A**) y dormido (**B**).

## 8.2 ¿Los Acociles Inmóviles Duermen?

Como se observa en la **Figura 8.1**, los registros continuos de la actividad conductual muestran que el acocil permanece inmóvil por periodos prolongados de tiempo. Con la finalidad de determinar cuál es el patrón de la actividad eléctrica cerebral durante esta posición procedí a analizar esta señal mediante la TW. Los resultados correspondientes son mostrados en la **Figura 8.4**.



**Figura 8.4.** Representación codificada en color de la TW obtenida de la actividad eléctrica cerebral de un acocil en inmovilidad: al minuto (**A**) y a los 2 minutos (**B**).

La TW mostró al menos dos patrones diferentes cuando el acocil está inmóvil: 1) potencias altas en toda la banda de frecuencias analizada (0-60 Hz), similar al patrón



presente en los acociles despiertos (compare **Figuras 8.3. A y 8.4. A**); y 2) un notable decremento en potencia, principalmente dentro de la banda de frecuencia de 30-60 Hz, similar al de un acocil dormido (compare **Figuras 8.3. B y 8.4. B**). Estos dos patrones los observé en todos los segmentos de acocil inmóvil que analicé.

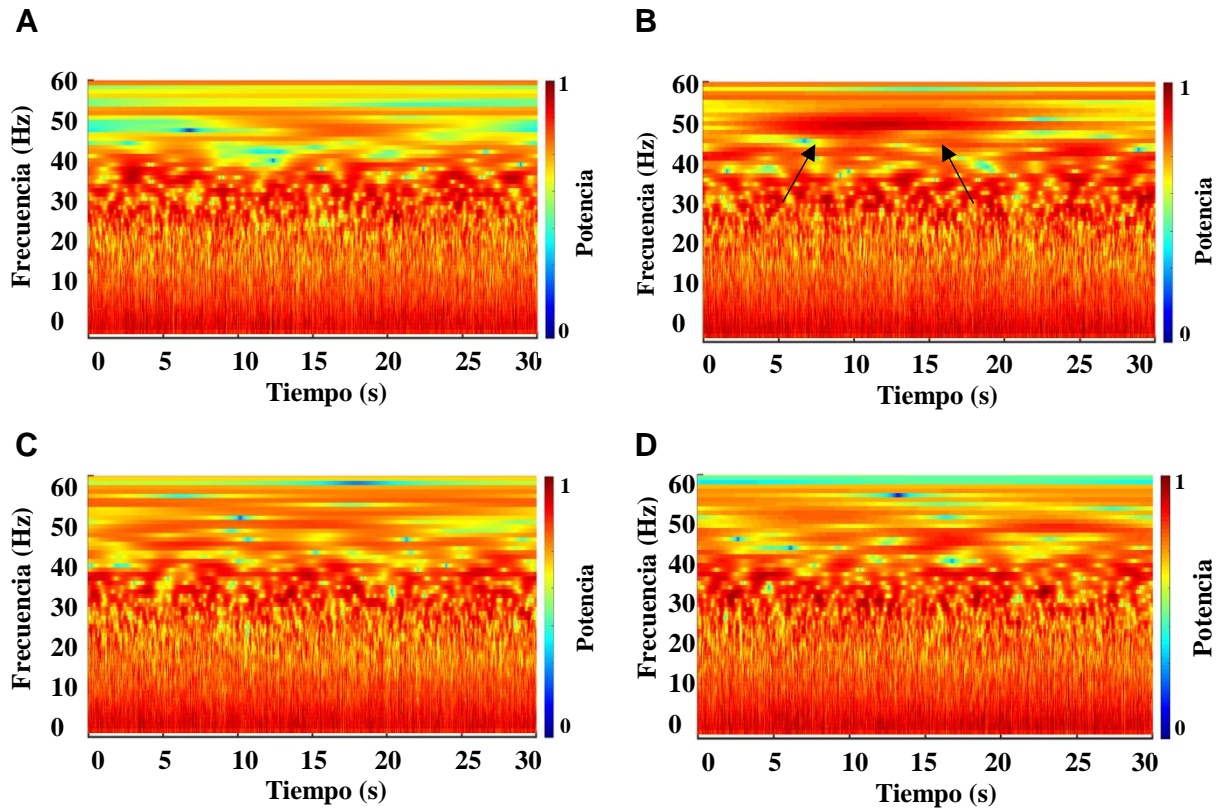
### **8.3 Fases de Sueño en el Acocil**

#### **8.3.1 Actividad Eléctrica Cerebral**

La **Figura 8.5** representa los resultados de la TWC correspondientes a un acocil dormido (de lado). Cada ventana forma parte del mismo episodio de sueño de larga duración. El análisis mostró que, a lo largo del episodio de sueño, la potencia de la actividad eléctrica cerebral no es constante, cambia a través del tiempo. Note que la potencia decrementa (**Figura 8.5 A**) o incrementa (evento señalado con flechas en la **Figura 8.5 B**), particularmente en la banda de los 30-60 Hz y en intervalos de diferente duración. Estos incrementos son similares a los encontrados en los acociles despiertos que muestran potencias altas en toda la banda de frecuencias analizada (compare **Figuras 8.3 A y 8.5 B**).

Estos hallazgos sugieren que la actividad eléctrica cerebral durante el sueño presenta diferentes patrones que parecen indicar microestados. En la **Figura 8.5**, un aparente microestado está marcado con flechas en el panel **B**. Estos microestados con distinta magnitud y duración están presentes a lo largo de todo el episodio de sueño (**Figura 8.6**). Con la finalidad de determinar si el acocil presenta fases de sueño, únicamente analicé aquellos segmentos en los que el animal estuvo dormido de lado a nivel de la superficie del agua.

La **Figura 8.6** muestra cómo es la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral en la banda de los 30-60 Hz (ver **Ramón y cols., 2004; Mendoza Ángeles y cols., 2010**), durante un episodio completo de sueño (segmento 1 al segmento 37), así como, un minuto antes y un minuto después del periodo de sueño.

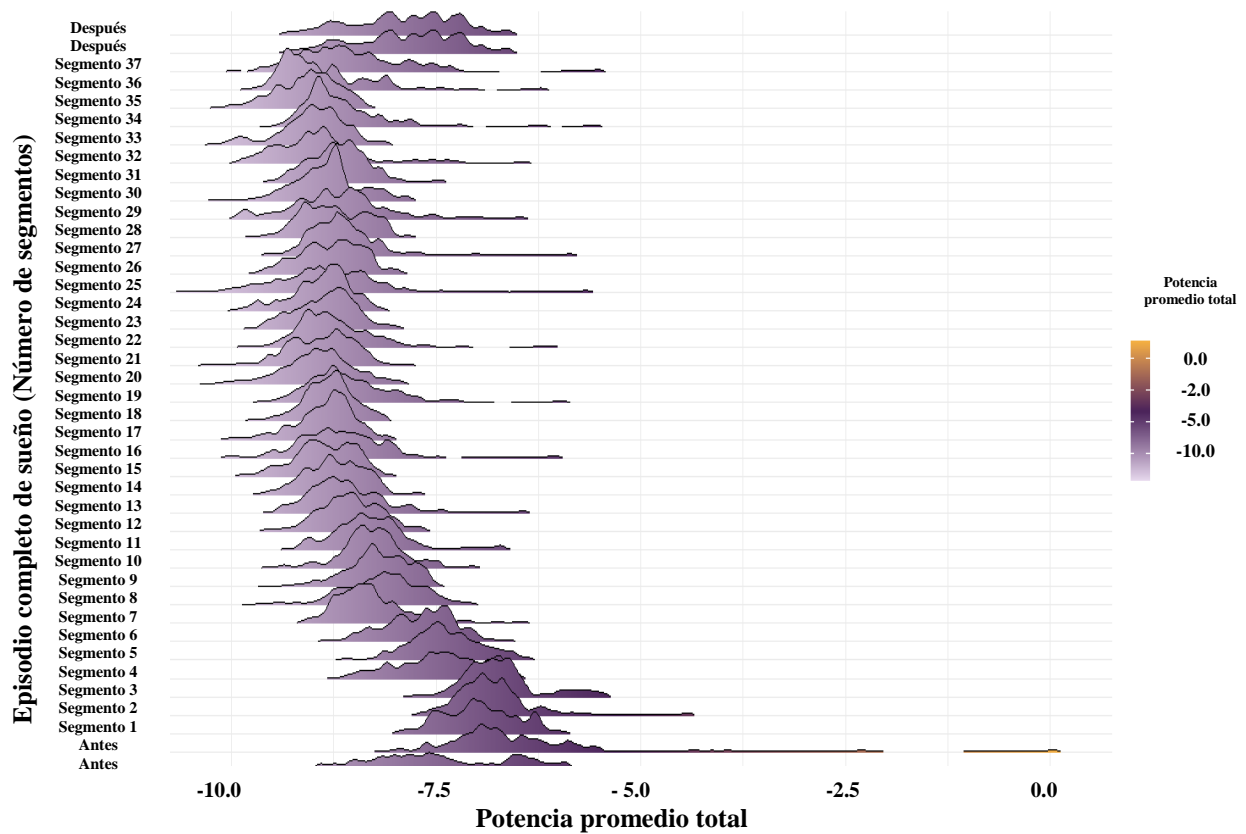


**Figura 8.5.** Representación codificada en color de la TW obtenida de la actividad eléctrica cerebral en cuatro segmentos diferentes no consecutivos (paneles **A-D**), pertenecientes a un solo episodio de sueño de larga duración en un acocil de lado. Las flechas en el panel (**B**) indican un microestado con alta potencia.

Cada segmento muestra cómo se distribuyen los valores de la potencia promedio total durante periodos de 30 s. La potencia es codificada en color utilizando el espectro de luz visible (potencias altas-tonos oscuros y potencias bajas-tonos claros).

Los resultados muestran que antes del episodio de sueño, la distribución de los datos de la potencia promedio total es notablemente ancha y presenta colas largas. Sin embargo, al inicio del episodio de sueño (segmento 1), el ancho de la distribución disminuye. En la medida en la que el acocil duerme, la potencia promedio decreciente aún más (note como después del segmento 7 la potencia tiende a alinearse aproximadamente al valor 7.5). Posteriormente, la dispersión de la potencia promedio disminuye y la media de las distribuciones se mantienen constantes hasta llegar al segmento 34. Ocasionalmente algunas distribuciones presentan fluctuaciones e

incrementan nuevamente el ancho, presentando un patrón similar al obtenido antes del episodio de sueño (por ejemplo, segmentos 19 y 25). De manera general, la potencia promedio total, la media y el ancho de la distribución incrementan hacia la parte final del episodio de sueño (note como después del segmento 34 hay un quiebre y reinicia lentamente la dispersión de la potencia promedio, sin alcanzar los valores previos al periodo de sueño). Estos resultados parecen indicar que el sueño del acocil es ligero al inicio y poco a poco se va haciendo más profundo.



**Figura 8.6.** Gráfica de densidad de la potencia promedio total correspondiente a la actividad eléctrica cerebral en la banda de los 30-45 Hz. La gráfica despliega la distribución de los datos a lo largo de un episodio completo de sueño de alrededor de 20 minutos. Cada segmento representa la densidad de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño corresponde con el segmento número 1 y su final está marcado en el segmento número 37. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de potencia fueron obtenidos mediante la TWC y son codificados en color (potencias altas-tonos oscuros y potencias bajas-tonos claros).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre cómo es la potencia promedio de la actividad eléctrica cerebral antes (1 minuto), durante el episodio de sueño y después (1 minuto) del episodio. Sin embargo, las diferencias encontradas durante el episodio de sueño en comparación con un minuto después de este fueron marginales, una posible explicación es que se requiere de un mayor tiempo para que el acocil se encuentre completamente despierto.

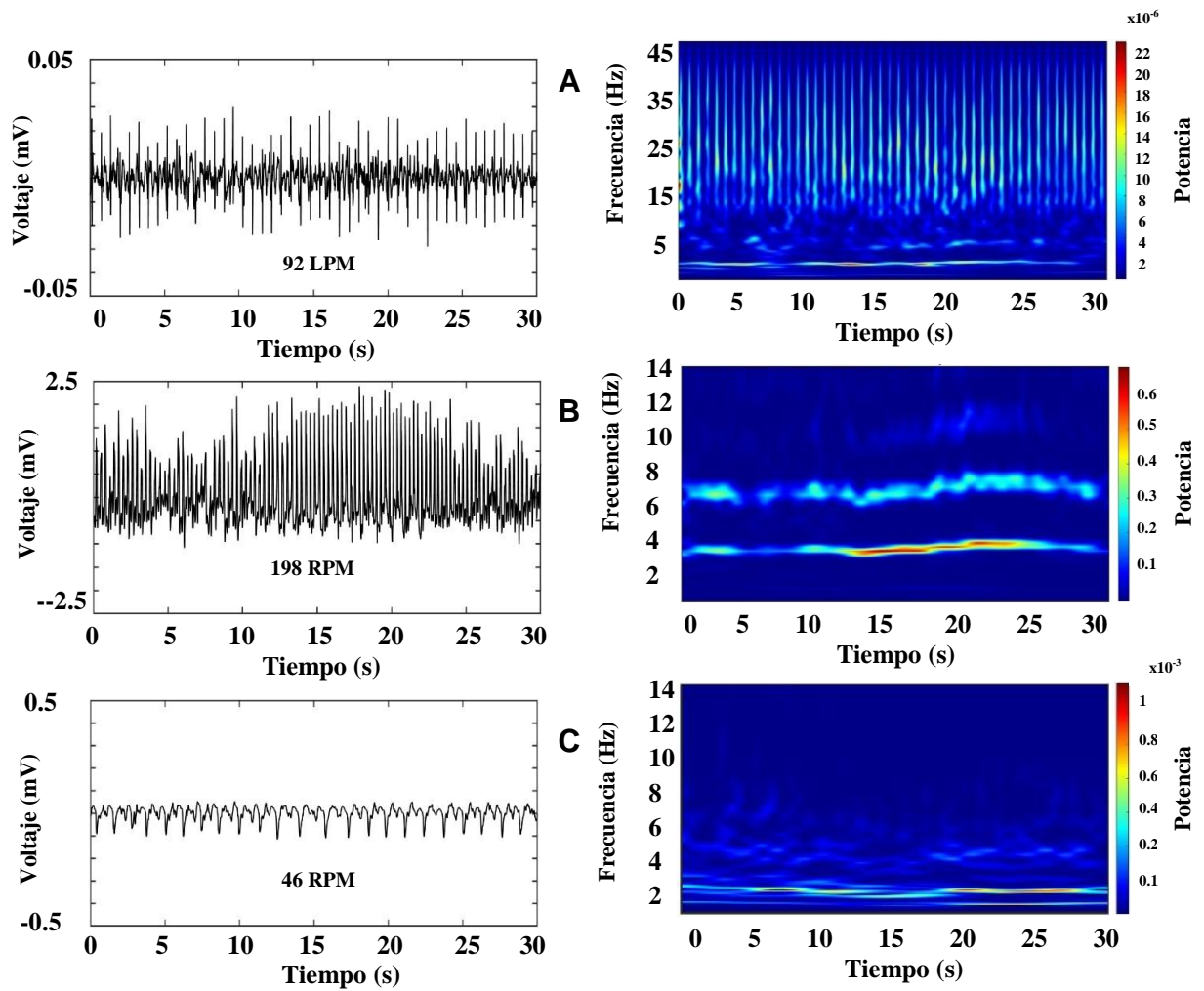
### 8.3.2 Actividad Eléctrica Cardiorrespiratoria

Con la finalidad de obtener un panorama más completo de los cambios dinámicos que suceden durante el sueño del acocil, analicé la actividad eléctrica cardíaca y respiratoria. Para ello, primero determiné cómo es el patrón de esta actividad durante la vigilia y posteriormente lo comparé con el obtenido durante el sueño. A continuación, describo el análisis correspondiente a los segmentos discutidos en la sección anterior.

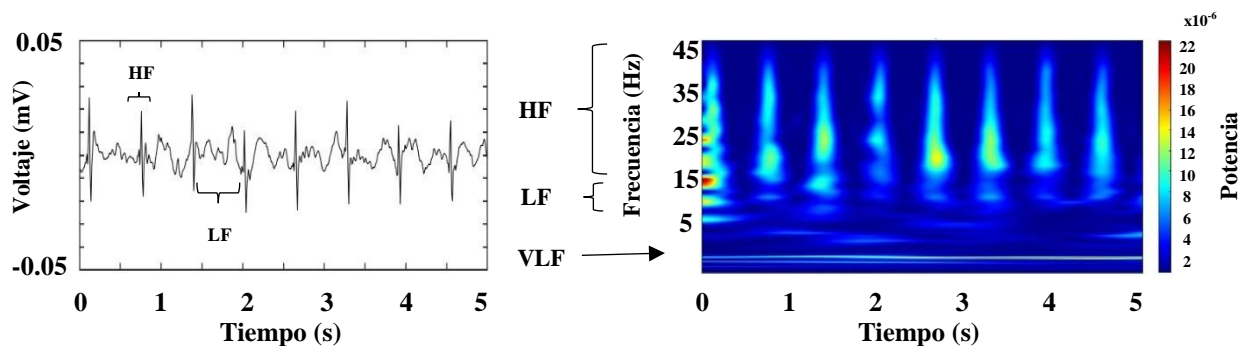
La **Figura 8.7** (columna izquierda) muestra un registro crudo característico de la actividad eléctrica del **(A)** corazón (electrocardiograma, ECG) y de ambas cámaras branquiales (paneles **B** y **C**) correspondientes a un acocil despierto. La columna derecha representa los resultados del análisis tiempo-frecuencia (TWC) de estas señales.

El análisis mostró que la actividad eléctrica cardíaca está conformada por componentes lentos (entre 1.5 y 12 Hz) puntuados por transitorios de alta frecuencia (de hasta 45 Hz) que ocurren casi periódicamente. Durante la vigilia, cuando el acocil se encuentra activo (deambulando), la frecuencia cardíaca (FC) está alrededor de los 100 LPM (latidos por minuto) y la amplitud del ECG cambia ligeramente dependiendo de la actividad del acocil.

La TWC revela que el perfil espectral del ECG del acocil está conformado por tres componentes principales: 1) un componente correspondiente a la FC, centrada en frecuencias muy bajas (VLF), alrededor de 2 Hz; 2) un componente de baja frecuencia (LF) localizado entre 3 y 12 Hz y 3) uno de alta frecuencia (HF) entre 13 y 45 Hz.

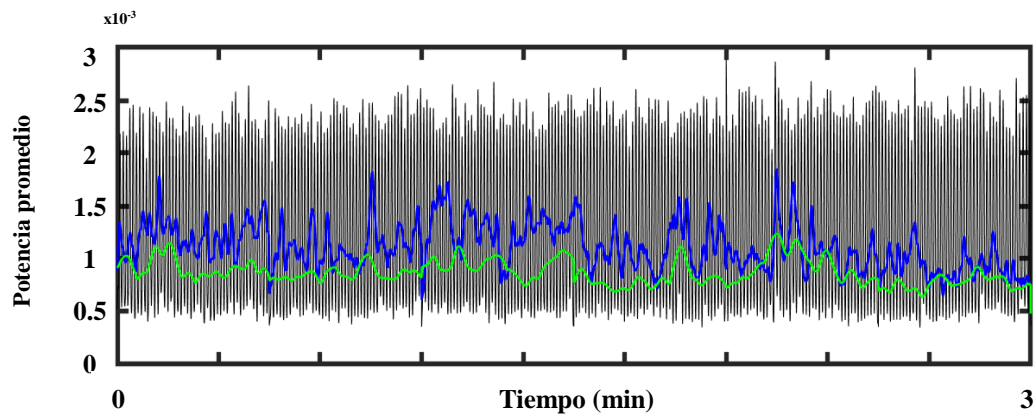


**Figura 8.7.** Registro crudo representativo de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria correspondiente a un acocil despierto (columna izquierda) y la representación codificada en color del análisis tiempo-frecuencia de estas señales (columna derecha). Cada panel representa 30 s de actividad. **(A)** corazón (electrocardiograma, ECG), **(B)** y **(C)** ambas cámaras branquiales.



**Figura 8.8.** Registro crudo representativo de la actividad eléctrica cardiaca correspondiente a un acocil despierto (panel izquierdo); la gráfica indica los principales componentes en frecuencia. Representación codificada en color del análisis tiempo-frecuencia de esta actividad (panel derecho), la gráfica señala el perfil espectral del registro crudo. VLF (frecuencias muy bajas), LF (frecuencias bajas), y HF (frecuencias altas).

La **Figura 8.8** representa los primeros 5 s de la actividad eléctrica cardiaca mostrada en la **Figura 8.7** e indica las bandas de frecuencias arriba mencionadas.



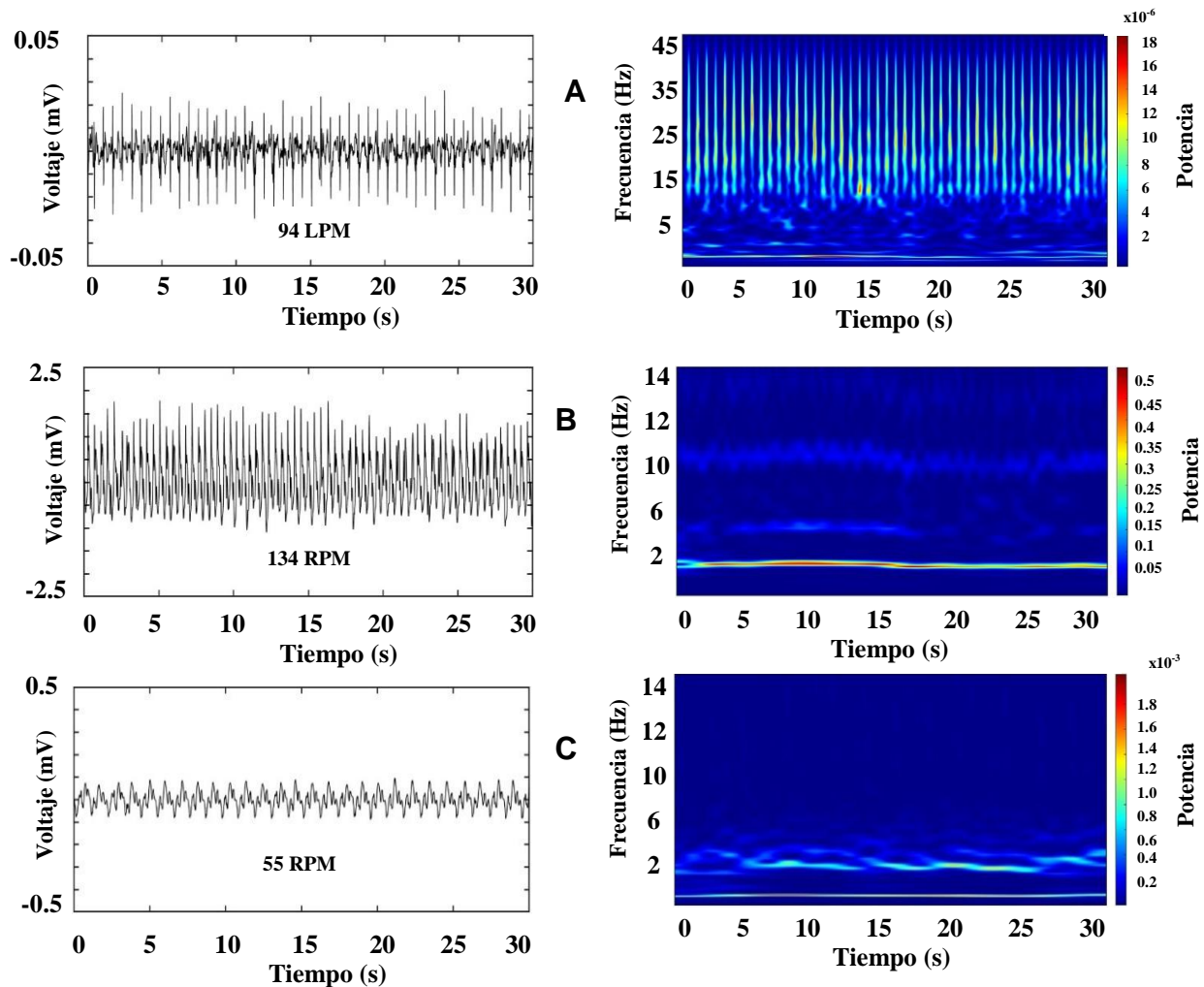
**Figura 8.9.** Potencia promedio total del ECG dentro de las tres principales bandas de frecuencias. Línea verde indica los resultados obtenidos para la banda 1: 0.5-3 Hz, línea azul corresponde con la banda 2: 3-12 Hz y la línea negra muestra la potencia promedio total para la banda 3: 13-45 Hz.

La **Figura 8.9** representa la potencia promedio total del ECG dentro del perfil espectral mencionado. La prueba estadística con Kruskal-Wallis indicó que existe una diferencia significativa ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) entre las bandas de frecuencia. Por lo que, estos resultados sugieren que tres principales componentes oscilatorios están presentes en el ECG del acocil.

Con respecto a la actividad respiratoria, el análisis mostró que ésta oscila en dos diferentes bandas de frecuencia: 1) 0.5-3 Hz y 2) 3 a 12 Hz, y la frecuencia central varía de 0.5 a 4.0 Hz [frecuencia respiratoria, respiraciones por minuto (RPM)]. La potencia y la amplitud de la señal son altamente irregulares y aparentemente no existe una sincronización entre ambas cámaras branquiales (compare **Figuras 8.7 B, C**, note la escala en la potencia).

Una vez que determiné el patrón de la actividad cardiorrespiratoria durante la vigilia procedí a su caracterización durante el sueño.

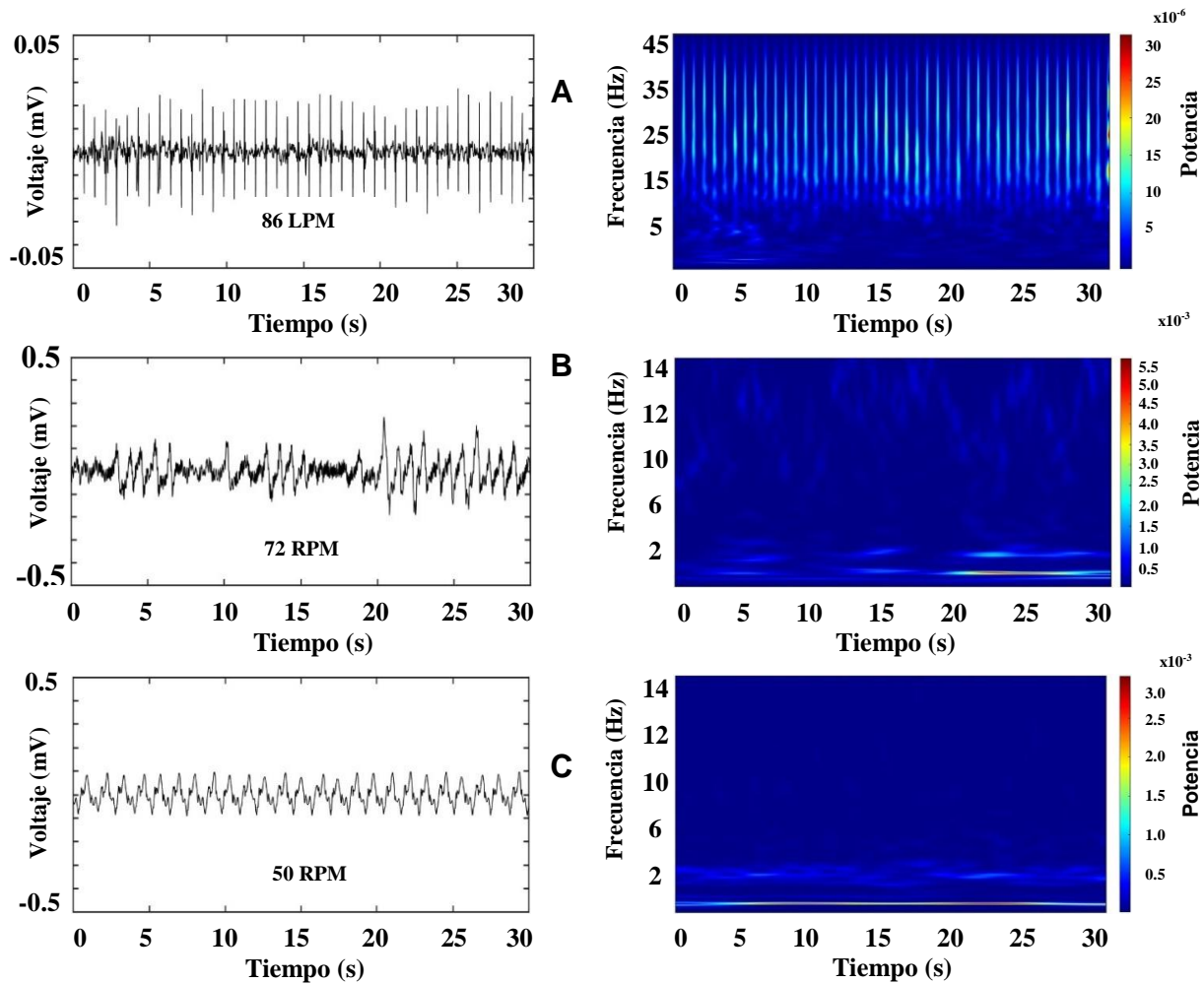
La **Figura 8.10** fue obtenida 2 minutos después del inicio de sueño (marqué el inicio de sueño una vez que el acocil estaba claramente de lado y sin movimientos bruscos). La **Figura 8.11** pertenece al mismo episodio de sueño, pero 10 minutos después del inicio.



**Figura 8.10.** Registro representativo de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria a los 2 minutos del inicio del episodio de sueño. La columna izquierda muestra el registro crudo del (A) ECG (panel superior), (B) y (C) ambas cámaras branquiales (panel de en medio e inferior). La columna derecha muestra la representación codificada en color del análisis tiempo-frecuencia de estas señales (columna derecha). Cada panel representa 30 s de actividad.



El análisis mostró que, a pesar de que el acocil estaba de lado a nivel de la superficie del agua, a los dos minutos de haber iniciado el episodio de sueño (**Figura 8.10**) la actividad respiratoria fue similar a la encontrada en los acociles despiertos, con cambios ligeros en la potencia y en la frecuencia, mientras que, el perfil espectral del ECG presentó decrementos en potencia (compare **Figuras 8.7** y **8.10**).

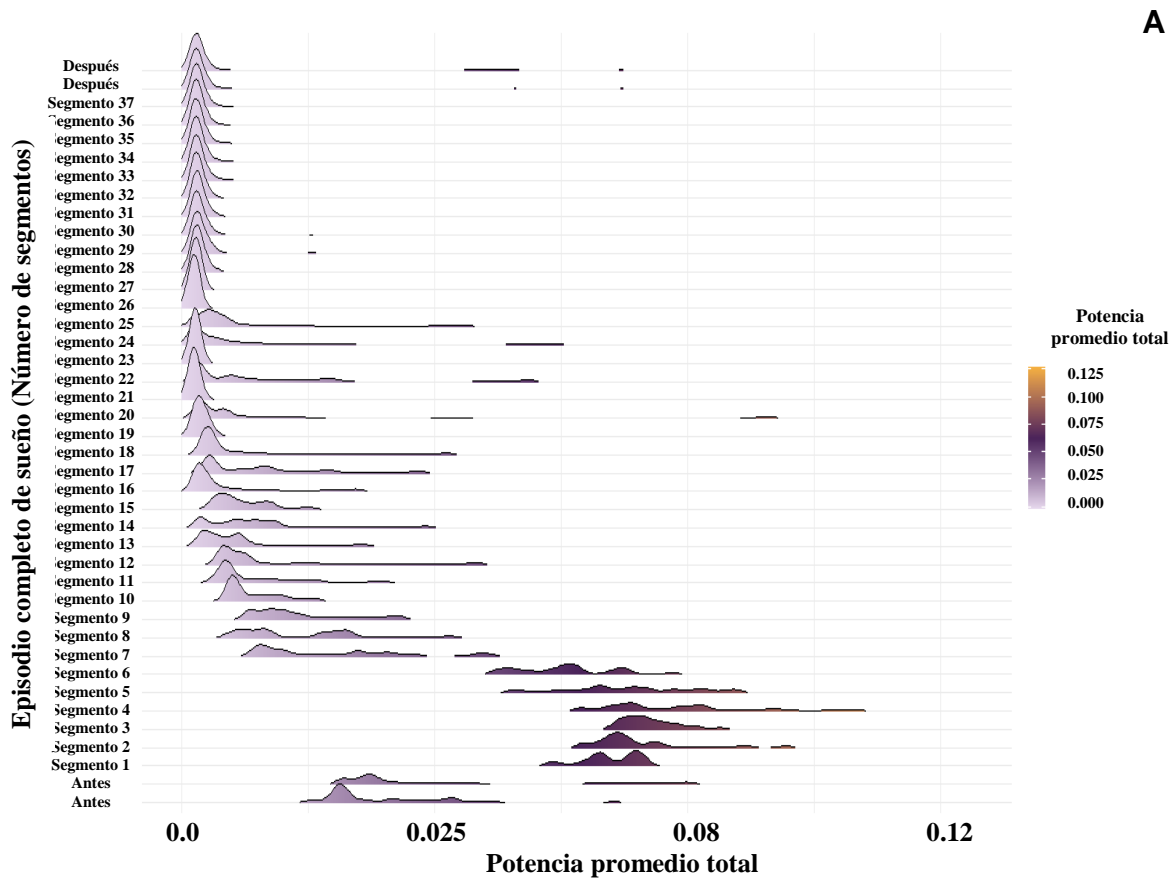


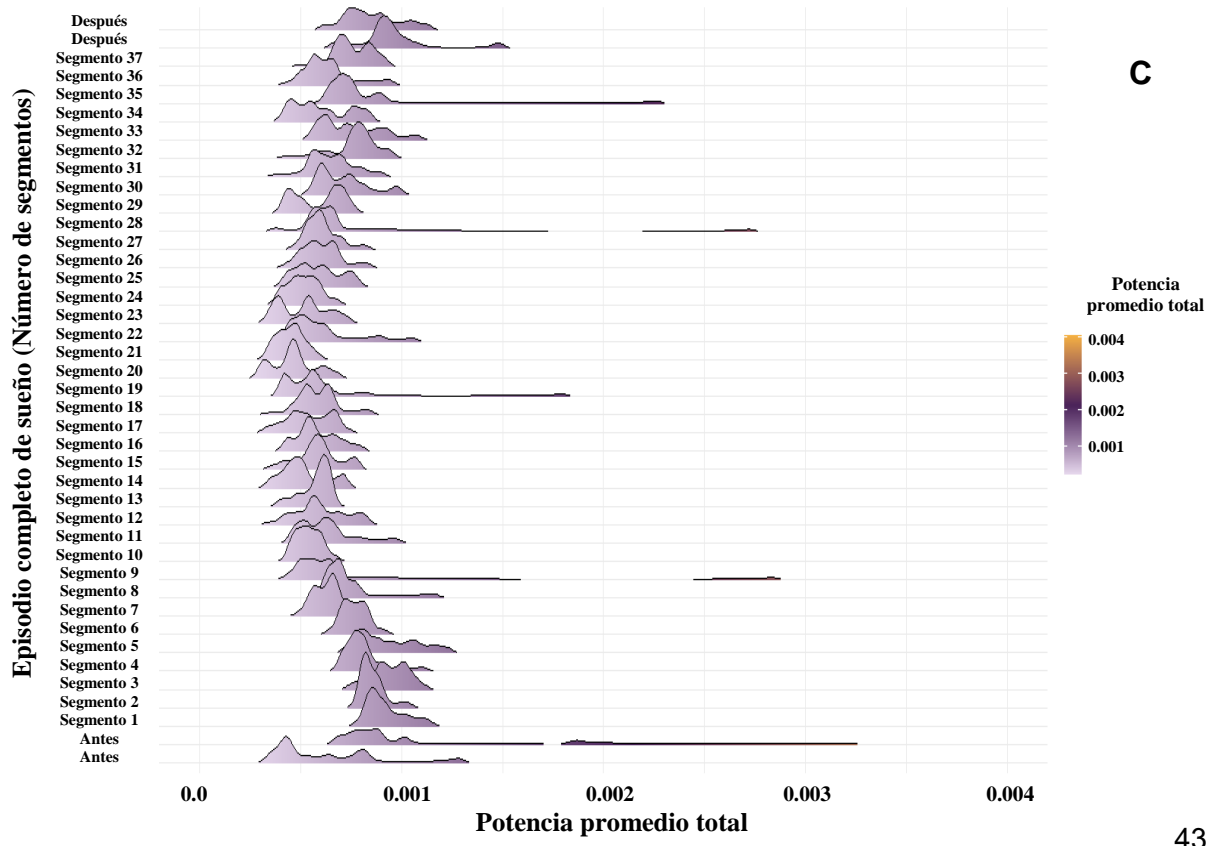
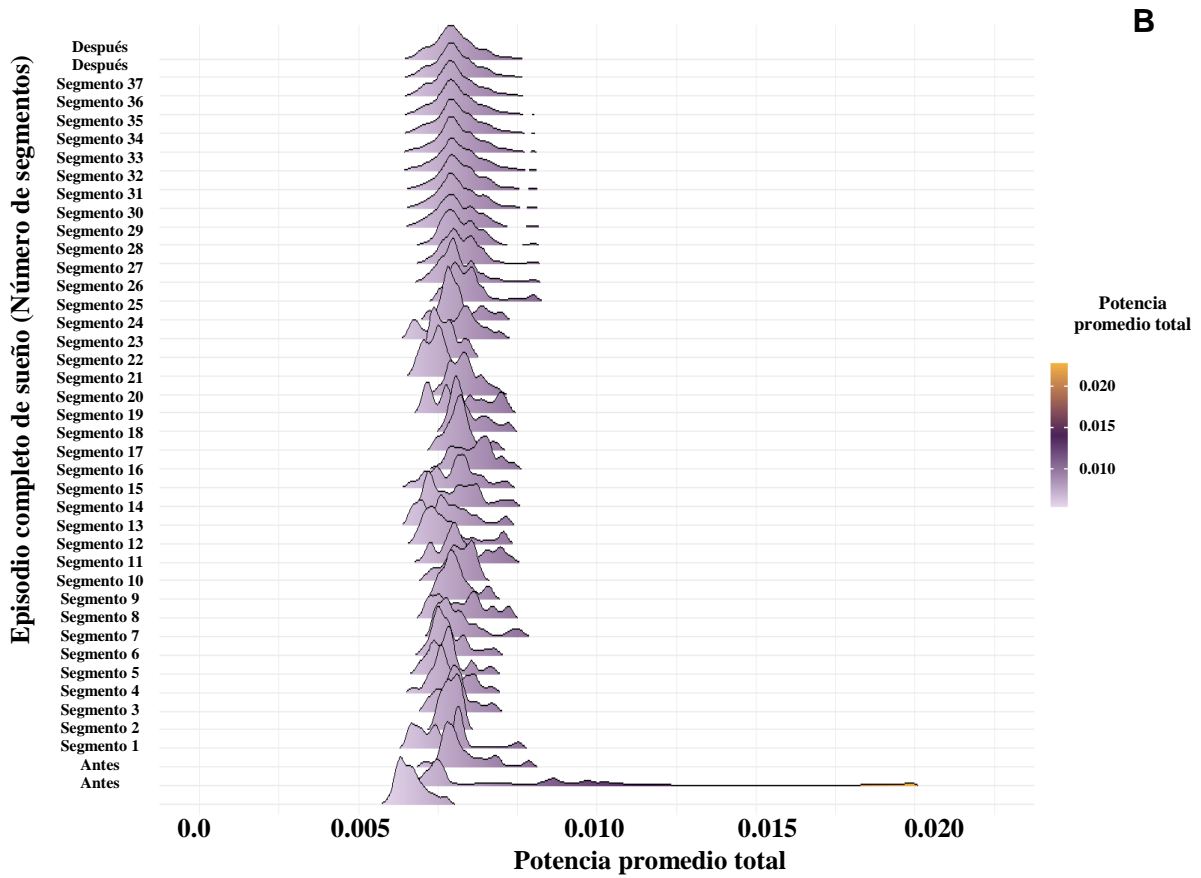
**Figura 8.11.** Registro representativo de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria a los 10 minutos del inicio del episodio de sueño. La columna izquierda muestra el registro crudo del (A) ECG (panel superior), (B) y (C) ambas cámaras branquiales (panel de en medio e inferior). La columna derecha muestra la representación codificada en color del análisis tiempo-frecuencia de estas señales (columna derecha). Cada panel representa 30 s de actividad.



Sin embargo, en la medida en la que el acocil duerme, la potencia disminuye progresivamente tanto en los componentes de VLF, LF y HF correspondientes al ECG, como en las dos bandas de frecuencia de la actividad respiratoria (compare **Figuras 8.10 y 8.11**, note la escala en la potencia). Estos cambios ocurren a lo largo de todo el episodio de sueño y, presenta diferencias y similitudes con el patrón encontrado durante la vigilia.

En la **Figura 8.12** muestro cómo es la dinámica de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria durante un episodio largo de sueño; aproximadamente 20 minutos continuos. La figura incluye también un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Utilicé los valores de la potencia promedio en las bandas de frecuencia previamente descritas (corazón 0-45 Hz y de 0-12 Hz para ambas cámaras branquiales) para la realización de estas gráficas.





**Figura 8.12.** Gráficas de densidad de la potencia promedio total de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria dentro de las siguientes bandas de frecuencia: actividad cardíaca 0-45 Hz y respiratoria 0-12 Hz. La gráfica despliega la evolución temporal de la potencia promedio total a través de un episodio completo de sueño de cerca de 20 minutos. Cada segmento muestra la distribución de los valores de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño está marcado con el segmento 1 y termina en el segmento 37. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de la potencia fueron obtenidos mediante la TW y son codificados en color (potencias altas-tonos oscuros y potencias bajas-tonos claros). **(A)** cámara branquial 1, **(B)** cámara branquial 2 y **(C)** corazón.

En general, encontré que, en ambos casos: antes de y al inicio del episodio de sueño, la distribución de la potencia promedio es ancha, mientras que, hacia la parte final del evento de sueño la media de la potencia promedio total decremente y la distribución es más estrecha. Esto parece indicar que, la potencia promedio total disminuye en función del tiempo. Note cómo en la medida en la que el acocil duerme, la potencia disminuye aún más (**Figura 8.12**, compare los patrones al inicio del episodio de sueño [segmento 1] con el que presenta después del segmento 7. Observe la escala.). Posteriormente, la potencia promedio y la media de las distribuciones se mantienen constantes. Sin embargo, ocasionalmente la potencia promedio fluctúa, de manera que, nuevamente algunas distribuciones de se vuelven más anchas, tal como sucede antes de y al inicio del episodio de sueño.

Como se observa en la **Figura 8.6**, este patrón general en la actividad eléctrica cardiorrespiratoria está también presente en la actividad eléctrica cerebral. Estas transiciones, entre una fase con baja actividad cardíaca y respiratoria, y otra más con características similares a las del acocil despierto (a pesar de encontrarse de lado a nivel de la superficie del agua), se presentaron principalmente en los episodios prolongados de sueño. En el caso de los episodios de sueño más cortos, aunque la potencia promedio también decrementó, las distribuciones correspondientes a la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria presentaron colas largas y fueron notablemente más anchas a lo largo de todo el evento (ver **Material Suplementario** para revisar más episodios de sueño).

Por otra parte, en todos los segmentos que analicé, los resultados muestran que, sin importar el estado cerebral del acocil, sueño o vigilia, existe una

aparente desincronización entre ambas cámaras branquiales (por ejemplo, compare panel **B** y **C** en las **Figuras 8.7, 8.10 y 8.11**). En todos los episodios de sueño correspondientes a los 3 acociles, las cámaras branquiales muestran patrones de actividad diferentes entre ellas.

Finalmente, para concluir con el análisis de la actividad cardiorrespiratoria, determiné cómo es la potencia promedio de la actividad eléctrica cardíaca y respiratoria (cámara 1 y 2) antes (1 minuto), durante el episodio completo de sueño y después (1 minuto) del episodio. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos antes del episodio de sueño y durante el evento. En la mayoría de los periodos de sueño analizados también encontré diferencias significativas entre el periodo de sueño y los datos obtenidos un minuto después.

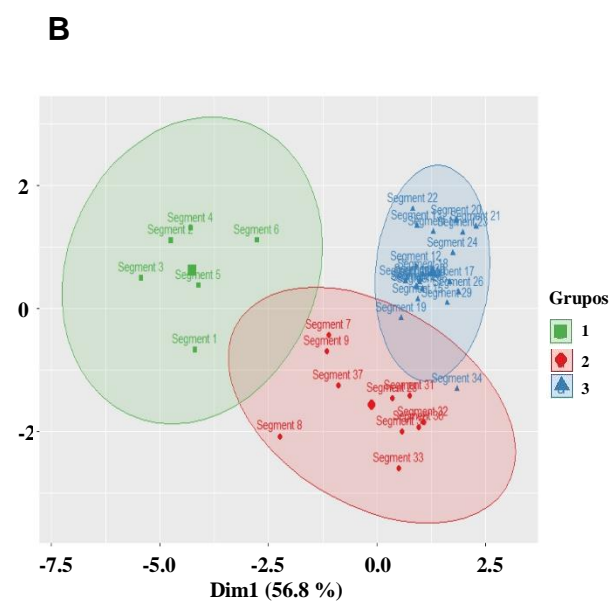
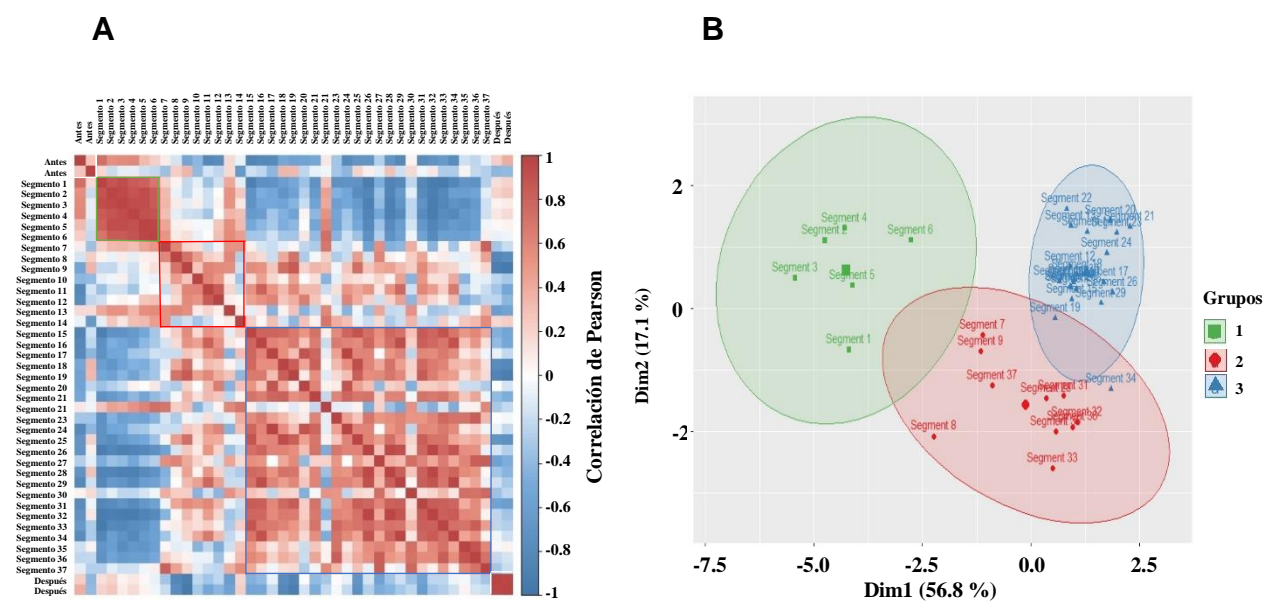
### **8.3.3 Actividad Eléctrica Cerebral y Cardiorrespiratoria**

Con la finalidad de determinar la evolución temporal del sueño llevé a cabo un análisis multivariado en el que incluí la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. Para ello, por cada episodio de sueño construí una matriz de datos; analicé por lo menos 25 episodios. Dividí cada uno de los episodios en segmentos de 30 s y obtuve la potencia promedio total tomando en consideración las siguientes bandas de frecuencia: cerebro, 30-60 Hz; corazón, 0-2 Hz, 3-12 Hz y de 13-45 Hz. Finalmente, para el análisis de la actividad respiratoria, consideré las siguientes bandas de frecuencia por cada cámara branquial: 0.5-3 Hz y de 3-12 Hz. Con estos valores obtenidos construí una matriz de datos  $X$ ,  $n$ -por- $p$ . En donde las  $n$  filas corresponden a cada uno de los segmentos de 30 s que conforman el episodio completo de sueño y las columnas corresponden a cada una de las variables (8 variables teniendo en cuenta la división en las bandas de frecuencia). Con estos datos, determiné la matriz de correlación temporal del sueño  $X^T.X$ .

La **Figura 8.13 A** muestra la matriz de correlación correspondiente al mismo episodio completo de sueño presentado en la **Figura 8.12**. Asimismo, la matriz incluye la correlación un minuto antes y después del episodio de sueño. La correlación es codificada en color (correlación positiva-tonos rojos y correlación negativa-tonos azules). Como se observa, el análisis multivariado, diferencia claramente los datos

obtenidos antes, durante el episodio de sueño (segmento 1 al segmento 37), y después del episodio; tal como lo mostró el análisis individual de la actividad cerebral, cardiaca y respiratoria mediante las gráficas de densidad. De igual forma, el análisis muestra cómo durante el episodio de sueño existe una interrelación temporal. Note como, la matriz de correlación presenta por lo menos tres patrones distintos cuando el acocil está dormido. Cada patrón está enmarcado con cuadrados de color y representa un grupo identificado cualitativamente. Un primer grupo con valores altos de correlación y conformado por los primeros seis segmentos (cuadrado verde) es seguido por otro grupo con un patrón de correlación altamente inestable (cuadrado rojo) y, finalmente, un tercer grupo (cuadrado azul), menos homogéneo que el grupo 1, está presente al final del episodio. Note como el grupo 2 conecta el conjunto 1 y 3, y su patrón de correlación parece ser similar al del grupo 3. De manera general, los patrones de correlación de la matriz presentes al inicio del episodio cambian a través del tiempo, esto sugiere que las características y los patrones de sueño derivados de la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria cambian también.

Una vez que identifiqué que durante el sueño existe una interrelación temporal, apliqué un análisis de agrupamiento de datos mediante *k*-means a cada episodio de sueño. Para este propósito, computaricé 30 índices distintos para determinar el número de *k* conjuntos en los que los datos se distribuyen.



**Figura 8.13. (A)** Matriz de correlación de Pearson correspondiente a la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. La matriz despliega la evolución temporal del sueño a lo largo de un evento de cerca de 20 minutos. Cada segmento muestra el coeficiente de correlación de Pearson de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. La figura incluye también un minuto antes y uno después del episodio de sueño (cuadrados blancos). La correlación es codificada en color (correlación positiva-tonos rojos y correlación negativa-tonos azules). Cada grupo identificado cualitativamente es enmarcado con cuadrados de color: grupo 1 (cuadrado verde), grupo 2 (cuadrado rojo) y grupo 3 (cuadrado azul). **(B)** Análisis de agrupamiento con *k*-means correspondiente al mismo episodio de sueño mostrado en **A**; cada conjunto representa un patrón diferente durante el sueño y están delimitados por elipses de color. Cuadrados verdes-grupo 1, diamantes rojos-grupo 2 y triángulos azules-grupo 3. La visualización de los datos en el plano bidimensional es a través del análisis de componentes principales; PCA1 explica el 56.8 % de la varianza total y PCA2 el 17.1 %. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con un efecto tamaño medio ( $p < 0.05$ ;  $\epsilon^2 = 0.25$ ).

Los resultados obtenidos con *k*-means son mostrados en la **Figura 8.13 B**. *k*-means agrupó los valores de la potencia promedio total derivados de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria en tres grupos diferentes. Las observaciones (ver sección **7.5 Análisis Electrofisiológico**) están representadas por puntos usando el análisis de componentes principales; cada conjunto es delimitado por elipses de color. El primer grupo está conformado por pocos segmentos (elipse verde), estos valores corresponden con el inicio del episodio de sueño (alrededor de 3 minutos) y es el grupo más pequeño. El segundo grupo está delimitado por una elipse roja; este conjunto está relacionado principalmente con las distribuciones de probabilidad más anchas y con colas largas. Mientras que, el último grupo (elipse azul) concentra la mayoría de las observaciones. Los resultados son consistentes con el patrón mostrado en la matriz de correlación (compare **Figuras 8.13 A y B**).

Finalmente, determiné si existen diferencias significativas entre los tres grupos identificados. Para este fin, llevé a cabo la prueba de Kruskal-Wallis y Wilcoxon *post hoc*. Además, calculé el efecto tamaño mediante épsilon cuadrado ( $\epsilon^2$ ), de esta forma cuantifiqué el tamaño de la diferencia entre los conjuntos. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres conjuntos con un

efecto tamaño medio ( $p < 0.05$ ;  $\varepsilon^2 = 0.25$ ). Sin embargo, la prueba *post hoc* encontró principalmente diferencias entre el conjunto 1 y el 3. Esto sugiere fuertemente que, el conjunto 2 puede compartir características con los otros dos conjuntos, y este conjunto puede ser una fase de transición en la que los patrones del conjunto 1 y 3 coexisten. Analicé cada uno de los episodios de sueño (ver **Material Suplementario** para revisar más episodios de sueño) siguiendo el mismo procedimiento y los resultados son consistentes.

#### 8.3.4 Fases de Sueño en el Acocil: ¿Caso Específico o Genérico?

Hasta aquí, he demostrado que existen diversos patrones de correlación entre la actividad cerebral y cardiorrespiratoria durante el sueño. Identifiqué que a lo largo de cada episodio se presentan al menos 3 patrones distintos (cada uno es representado mediante un grupo). En las secciones previas presenté detalladamente los resultados correspondientes únicamente a un episodio de sueño. Queda por demostrar si estos patrones reflejan características de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria propias de un acocil o si representan características más generales, o un patrón genérico presente a través de los acociles. Para este propósito, llevé a cabo un análisis de agrupamiento de datos a nivel de grupo, en el que analicé de manera conjunta todos los episodios de sueño por acocil mediante *k*-means. Los resultados son mostrados en la **Figura 8.14**.

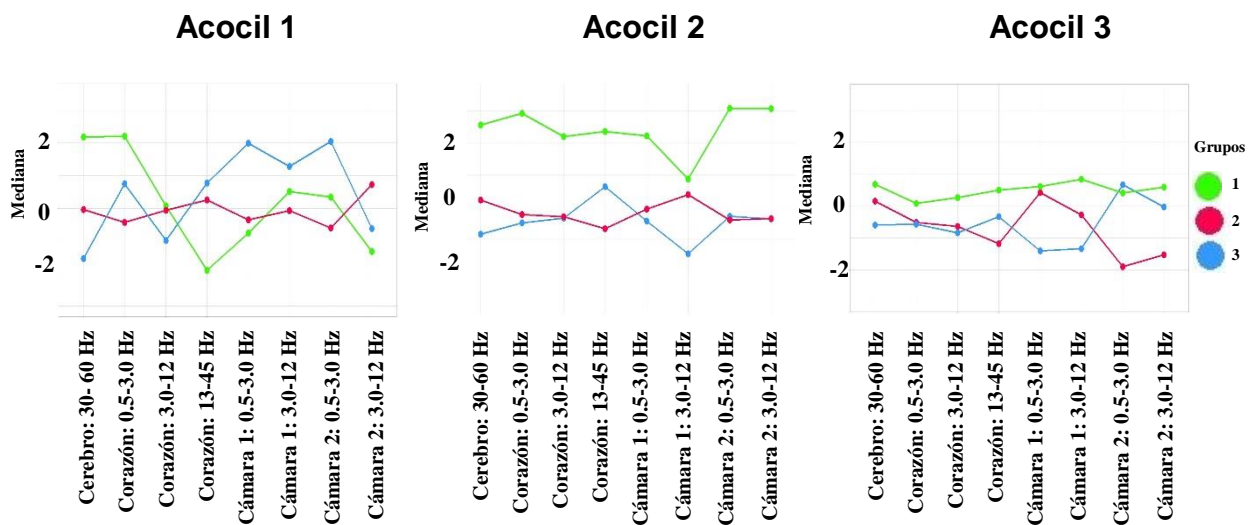
El análisis a nivel de grupo derivado de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria por acocil muestra similitudes entre el sueño de los acociles. Note cómo todos los acociles analizados presentan 3 grupos distintos durante el sueño. El grupo 1 (línea verde) no muestra una tendencia clara, aunque en algunas variables presenta valores de la mediana más altos en comparación con el resto de los grupos. Los grupos 2 y 3 muestran un patrón aparentemente anticorrelacionado, aunque parecen compartir algunas características. De acuerdo con el análisis de agrupamiento de datos, cada grupo presenta características específicas derivadas de la actividad cerebral, cardíaca y respiratoria. Note cómo estos tres grupos identificados durante el sueño del acocil están presentes en los 3 animales estudiados. Esto sugiere fuertemente que los patrones generales del sueño están conservados entre acociles.

Finalmente, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tres grupos encontrados ( $p < 0.05$ ,  $\epsilon^2 = 0.23$ ) con un tamaño de efecto medio. Sin embargo, como se observa en la **Figura 8.14**, en el caso del acocil 1, las diferencias entre los grupos 1 y 2 son marginales, tal como lo mostré en la **Figura 8.13**, el grupo 2 preserva características comunes al resto de los grupos. Los resultados obtenidos son consistentes entre los 3 acociles.

## 9. DISCUSIÓN

En general, los resultados son consistentes con la descripción acerca del sueño en el acocil (**Ramón y cols., 2004; Mendoza-Ángeles y cols., 2007, 2010**). Sin embargo, el análisis muestra que la disminución en potencia en la banda de los 30-45 Hz se extiende hasta los 60 Hz (**Figuras 8.3 y 8.4**). Queda por explorar si este decremento en potencia se presenta también por arriba de los 60 Hz, así como, la relevancia fisiológica de este comportamiento.

De acuerdo con el análisis conductual (**Figura 8.1**), el acocil muestra una tercera posición en la que permanece inmóvil durante un tiempo considerable, con las quelas descansando en el fondo del acuario y en algunas ocasiones con las antenas y anténulas descendidas (descansando en el fondo).



**Figura 8.14.** Análisis de agrupamiento de datos (*k*-means) a nivel de grupo. El análisis corresponde a los valores de la potencia promedio total derivados de la actividad



eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. Cada panel incluye todos los episodios de sueño por acocil. Para cada conjunto, la mediana correspondiente a cada variable es representada. Grupo 1 (línea verde), grupo 2 (línea roja) y grupo 3 (línea azul).

El análisis de la actividad eléctrica cerebral *via* la TWC muestra que, el acocil inmóvil presenta tanto características similares a las del animal caminando como a las del acocil de lado a nivel de la superficie del agua (**Figuras 8.3 y 8.4**). Es decir, en algunos casos la actividad eléctrica cerebral del acocil inmóvil muestra decrementos en potencia en la banda de frecuencia de los 30-60 Hz; y en algunos otros, la potencia es cercana a la que presentan los animales despiertos. Estos resultados indican que el acocil probablemente presenta otro estado de sueño.

### 9.1 Fases de Sueño en el Acocil

El análisis tiempo-frecuencia del EEG mostró que, el sueño de ondas lentas en el acocil no es un estado continuo (**Figuras 8.5 y 8.6**). La profundidad de sueño, medida como la potencia de la actividad del EEG, cambia a través del tiempo, la potencia disminuye en la medida en la que el acocil duerme (ver **Figura 8.6**); estos hallazgos sugieren fuertemente que el acocil tiene fases de sueño. De manera general, el estudio de la actividad eléctrica cerebral en conjunto con la actividad cardiorrespiratoria me permitió determinar que el sueño en el acocil está conformado por fases de distinta duración que no parecen tener un patrón cíclico (**Figuras 8.6, 8.12 y 8.13**). Al menos tres fases de sueño están presentes en el acocil: fase (1), periodo de somnolencia: se presenta al inicio del episodio de sueño, el EEG y la actividad cardiorrespiratoria presentan potencias altas; el acocil no duerme inmediatamente después de colocarse de lado; como en los vertebrados, el acocil concilia el sueño después de cierto tiempo. Generalmente, este patrón cambia después de transcurridos 3 minutos (**Figuras 8.6, 8.12 y 8.13**) y eventualmente da paso a la fase (2), fase de transición: este periodo representa el sueño de moderado a profundo y puede presentar características de las fases 1 y 3; después de iniciado el evento de sueño, la potencia decremента con el tiempo (segmentos 7 a 14, **Figuras 8.6, 8.12 y 8.13**). La fase (3) es el nivel más profundo de sueño, está caracterizada por un mayor decremento en potencia, tanto en el EEG

como en la actividad cardiorrespiratoria y se acompaña de segmentos de corta duración y de alta potencia (segmento 9 al 37, **Figuras 8.6 y 8.12**). El análisis global mostró que, cada una de estas fases se conserva en los acociles (**Figura 8.14**).

Aunque los resultados muestran que, el acocil al igual que los vertebrados presenta fases de sueño es importante enfatizar que estas son muy diferentes y que no se pretende igualarlas o sugerir mecanismos similares de generación. Una posible razón de las diferencias existentes entre el sueño y las fases de sueño de los acociles y de los animales vertebrados es debido a que, la estructura cerebral y la arquitectura son completamente diferentes. El acocil no presenta corteza o alguna estructura similar, núcleos o una organización que se asemeje al cerebro de los vertebrados. Sin embargo, a pesar de las diferencias anatómicas, fisiológicas y farmacológicas entre vertebrados e invertebrados, así como, del número relativamente pequeño de neuronas en el cerebro del acocil, esta especie despliega conductas complejas, como el sueño.

Este trabajo demuestra conductual y electrofisiológicamente que, el sueño en el acocil, como en los mamíferos y aves, es un estado dinámico y heterogéneo. Esto sugiere que: 1) el sueño es una función conservada y 2) las distintas fases son una característica fundamental del sueño, quizá en cualquier animal.

## **9.2 Cambios Fisiológicos Durante las Fases de Sueño en el Acocil**

En mamíferos el sueño está bien caracterizado y se sabe que una variedad de cambios fisiológicos adicionales tienen lugar durante las diferentes fases. En el caso de los vertebrados, estos cambios son mediados por el sistema nervioso autónomo (SNA) a través del sistema nervioso simpático y parasimpático. La actividad del SNA cambia durante el sueño; la frecuencia cardíaca, la respiración, la presión sanguínea, el índice metabólico y la temperatura alcanzan sus valores mínimos durante la fase de sueño no-MOR. Por el contrario, los periodos de sueño MOR se acompañan por un aumento de la presión sanguínea, la frecuencia cardiorrespiratoria y el metabolismo a niveles casi tan altos como los observados en el estado de vigilia e inclusive la alta variabilidad de estos parámetros puede exceder los valores presentes durante la vigilia quieta (**Zemaityte y cols., 1986**).

En el caso de los invertebrados, particularmente en los crustáceos, se conocen solamente algunos detalles de una regulación de tipo autonómico, pero no relacionados con el sueño (**Shuranova y cols., 2006**). En este grupo de animales, se sabe que las interacciones sociales, la cópula y perturbaciones en el ambiente inducen modificaciones en la FC y en la FR (**Schapker y cols., 2002; Shuranova y cols., 2006; Cooper y cols., 2011; Canero y Hermitte, 2014**). Sin embargo, no se han descrito estructuras anatómicas autonómicas similares a las de un SNA. Recientemente reportamos que cambios en estas variables ocurren también durante el sueño (**Osorio-Palacios y cols., 2021**). Parte del objetivo del estudio fue determinar si estos cambios fisiológicos ocurren durante las diferentes etapas de sueño.

Los resultados muestran que en el acocil la frecuencia cardíaca y la respiratoria están reguladas durante la vigilia (**Figuras 8.7 y 8.8**) y durante las diferentes fases de sueño (**Figura 8.12**), tal como ocurre en los vertebrados. Mediante las matrices de correlación de Pearson y el análisis de agrupamiento de datos con *k*-means, encontré que en efecto, la actividad cerebral y cardiorrespiratoria están relacionadas durante el sueño. *k*-means confirma que los datos pueden ser distribuidos en tres grupos distintos (**Figuras 8.13 B y 8.14**), mismos que respaldan la idea de que en el acocil existen por lo menos tres fases de sueño; cada una de estas determinada a partir de la actividad cerebral en conjunción con la cardiorrespiratoria. De acuerdo con estos resultados, estas fases de sueño se acompañan de cambios en variables autonómicas.

En los vertebrados se han estudiado ampliamente las variaciones en la frecuencia del ECG. A partir de éste análisis, se sabe que tres principales componentes oscilatorios están presentes en la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC): 1) frecuencias muy bajas (VLF), marcador de los ciclos hormonales y circadianos; 2) un componente de baja frecuencia (LF), marcador de la modulación simpática y 3) un componente de alta frecuencia (HF), marcador de la modulación vagal y sincronización con la respiración (**Montano y cols., 2009**). El análisis de la VFC ha permitido evaluar el control autonómico cardiovascular durante el sueño, mostrando un progresivo decremento del componente LF (marcador de la modulación simpática) y un control vagal predominante en la medida en la que el sueño se hace más profundo (de la vigilia al sueño profundo no-MOR). Mientras que el sueño MOR está caracterizado por una predominante

modulación simpática con picos de actividad inclusive más altos que los correspondientes a la vigilia (**Trinder y cols., 2001; Brandenberger y cols., 2003; Legramante y cols., 2003; Tobaldini y cols., 2014**).

En el caso del acocil, el análisis de la variabilidad del ECG me permitió identificar tres principales componentes oscilatorios: 1) un componente VLF alrededor de 2 Hz; 2) un componente LF de 3 a 12 Hz y 3) un componente HF entre 13 y 45 Hz (**Figura 8.9**) y estos resultados fueron suficientes para cumplir con el objetivo propuesto, sin embargo, estos hallazgos sugieren que un estudio detallado de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) en el acocil puede proporcionar mayor evidencia acerca de la existencia de un SNA funcional.

Como previamente mencioné, en el acocil aún no se han descrito estructuras similares a un SNA y se desconocen los mecanismos o las vías que median la regulación de la actividad cardiorrespiratoria durante la vigilia y el sueño. Una posibilidad es que los circuitos excitatorios (de tipo simpático) y los de tipo parasimpático estén ubicados en una región cerebral denominada tritocerebro en donde oscilaciones de potenciales de campo asociadas con el latido cardiaco han sido descritas previamente (**Ramón y cols., 2004; Arellano-Tirado, 2016**). Otra posibilidad está relacionada con el ganglio subesofágico, en donde desde hace tiempo se han reportado neuronas comando (**Wiersma y Novitski, 1942; Maynard, 1960; Taylor, 1970; Field y Larimer, 1975 a, b**). Por otra parte, no hay evidencia de un mecanismo equivalente encargado de la regulación de la respiración. Por lo tanto, es posible postular que al menos dos circuitos alojados en el tritocerebro y/o el ganglio subesofágico que presenta actividad excitatoria (de tipo simpático) e inhibitoria (de tipo parasimpática), regulan tanto la actividad cardiaca como la respiratoria, y reciben fuertes entradas del deutocerebro y protocerebro durante la vigilia; esta entrada puede disminuir durante el sueño; y puede ser la razón de la dispersión y la disminución de la actividad cardiaca y respiratoria.

## **10. CONCLUSIÓN**

En este estudio, analicé series de tiempo de variables fisiológicas, como la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria del acocil mediante la TWC, matrices de correlación de Pearson y técnicas de aprendizaje no supervisado (*k*-means), con la

finalidad de identificar si el acocil presenta fases de sueño y determinar cuál es la relación entre estas variables durante el mismo. Estas técnicas me permiten concluir que:

1. En el acocil hay más de una posición para dormir: de lado y parado inmóvil
2. La actividad eléctrica cerebral durante el sueño es la misma independientemente de la posición que adopte el animal
3. El sueño en el acocil es un proceso dinámico y heterogéneo
4. A mayor tiempo dormido, mayor profundidad del sueño
5. En el acocil existen por lo menos 3 fases de sueño y cada una se acompaña de cambios en variables fisiológicas como la actividad cardíaca y respiratoria por lo que es posible postular que
6. Existe un control de tipo autonómico de la función cardíaca y respiratoria

Todas estas conclusiones apoyan la idea de que las características del acocil desde una perspectiva evolutiva pueden ser útiles para determinar cómo se originó y evolucionó el sueño hasta alcanzar la complejidad vista en los vertebrados. El propósito principal en estudios futuros es caracterizar las diferentes fases de sueño en el acocil.

## 11. REFERENCIAS

- Abdi, H., and Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 2, 433–459. doi: 10.1002/wics.101
- Addison, P. S. (2005). Wavelet transforms and the ECG: a review. *Physiol. Meas.* 26, R155–R199. doi: 10.1088/0967-3334/26/5/r01
- Arellano-Tirado, S. A. (2016). Modelado de la Actividad Eléctrica del Acocil. (Licenciatura). Mexico: Instituto Politécnico Nacional.
- Berger, H. and Gloor, P. (1969). *Hans Berger on the Electroencephalogram of Man: The Fourteen Original Reports on the Human Electroencephalogram* (ed. P. Gloor), 350pp. Amsterdam: Elsevier.
- Brandenberger, G., Viola, A. U., Ehrhart, J., Charloux, A., Geny, B., Piquard, F. C., et al. (2003). Age-related changes in cardiac autonomic control during sleep. *J. Sleep Res.* 12, 173–180. doi: 10.1046/j.1365-2869.2003.00353.x
- Brown, L. G. (1991). A survey of image registration techniques. *ACM Comput. Surv.* 24, 325–376.
- Campbell, S. S. and Tobler, I. (1984). Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8, 269-300.
- Canero, E. M., and Hermitte, G. (2014). New evidence on an old question: is the “fight or flight” stage present in the cardiac and respiratory regulation of decapod crustaceans? *J. Physiol. Paris* 108, 174–186. doi: 10.1016/j.jphysparis.2014.07.001
- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., and Niknafs, A. (2014). NbClust: an R Package for determining the relevant number of clusters in a data set. *J. Stat. Softw.* 61, 1–36.
- Chang, D. J., Desoky, A. H., Ouyang, M., and Rouchka, E. C. (2009). “Compute pairwise manhattan distance and pearson correlation coefficient of data points with GPU,” in *Proceedings of the 10th ACIS International Conference on Software Engineering, Artificial Intelligences, Networking and Parallel/Distributed Computing (SNPD)*.
- Cirelli, C., and Tononi, G. (2008). Is Sleep Essential? *PLoS Biol.* 6:e216. doi: 10.1371/journal.pbio.0060216
- Cooper, R. M., Finucane, H. S., Adami, M., and Cooper, R. L. (2011). Heart and

ventilatory measures in crayfish during copulation. *Open J. Mol. Integr. Physiol.* 01, 36–42. doi: 10.4236/ojmip.2011.13006

Diekelmann, S., and Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 114–126. doi: 10.1038/nrn2762

Field, L. H., and Larimer, J. L. (1975a). The cardiorespiratory system of crayfish: neuroanatomy and physiology. *J. Exp. Biol.* 62, 519–530.

Field, L. H., and Larimer, J. L. (1975b). The cardiorespiratory system of crayfish: the role of circumoesophageal interneurons. *J. Exp. Biol.* 62, 531–543.

Flanigan, W. F. Jr., Knight, C. P., Hartse, K. M., and Rechtschaffen, A. (1974). Sleep and wakefulness in chelonian reptiles. 1. The box turtle, *Terrapene carolina*. *Arch. Ital. Biol.* 112, 227–252.

Foulkes, D., and Schmidt, M. (1983). Temporal Sequence and Unit Composition in Dream Reports from Different Stages of Sleep. *Sleep* 6, 265–280. doi: 10.1093/sleep/6.3.265

Frank, M. G. (2006). The mystery of sleep function: current perspectives and future directions. *Rev. Neurosci.* 17, 375–392. doi: 10.1515/revneuro.2006.17.4.375

Gonzalez, R. C., and Woods, R. E. (2002). *Digital Image Processing. 2nd Edn.* Prentice Hall. 701–703

Hartse, K. M. (2011). The phylogeny of sleep. *Handb. Clin. Neurol.* 98, 97–109. doi: 10.1016/b978-0-444-52006-7.00007-1

Hendricks, J. C., Finn, S. M., Panckeri, K. A., Chavkin, J., Williams, J. A., Sehgal, A. and Pack, A. I. (2000a). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* 25, 129–138.

Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA y cols. (2000). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* 25:129–38.

Hernández, O. H., Serrato, J., and Ramón, F. (1996). Chronic recording of electrical activity from the brain of unrestrained crayfish: the basal, unstimulated activity. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 114, 219–226. doi: 10.1016/0300-9629(95) 02129-9

Hobson, J.A. (1990). Sleep and dreaming. *J. Neurosci.* 10: 371–382.

Iber, C., Ancoli-Israel, S., Chesson, A. y cols. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, first ed. American Academy of Sleep Medicine, Westchester, 2007.

- Kaiser W. (1988). Busy bees need rest too. *J Comp Physiol A* **163**:565- 584.
- Keenan, S. and Hirshkowitz, M. (2010). Monitoring and staging human sleep. *In Principles and Practice of Sleep Medicine*, 5th edn (ed. M. Kryger, T. Roth and W. Dement), pp. 1602-1609. Amsterdam: Elsevier.
- Legramante, J. M., Marciani, M. G., Placidi, F., Aquilani, S., Romigi, A., Tombini, M., et al. (2003). Sleep-related changes in baroreflex sensitivity and cardiovascular autonomic modulation. *J. Hypertens.* 21, 1555–1561. doi: 10.1097/00004872-200308000-00021
- Lima SL, Rattenborg NC, Lesku JA, Amlaner CJ. 2005, Sleeping under the risk of predation. *Anim Behav*, **70**(4):723-736.
- Lyamin, O. I., Oleksenko, A. I., Polyakova, I. G. and Mukhametov, L. M. (1996). Paradoxical sleep in northern fur seals in water and on land. *J. Sleep. Res.* 5 (suppl.), 130–130
- Lyamin OI, Mukhametov IM, Siegel JM y cols. 2002, Unihemispheric slow wave sleep and the state of the eyes in a white whale. *Behav Brain Res* **129**:125–129.
- Lyamin OI, Mukhametov IM, Siegel JM (2004). Relationship between sleep and eye state in cetaceans and pinnipeds. *Arch Ital Biol* 142: 557–568.
- Lyamin OI, Pryaslova J, Lance V, Siegel J. 2005, Animal behaviour: Continuous activity in cetaceans after birth. *Nature*, **435**(7046):1177.
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., and Hornik, K. (2021). *Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.1.2*
- Maquet, P. (2001). The Role of Sleep in Learning and Memory. *Science* 294, 1048–1052. doi: 10.1126/science.1062856
- Maynard, D. M. (1960). "Circulation and heart function," in *The Physiology of Crustacea*, ed. T. H. Waterman (New York: Academic Press), 161–225
- Mendoza-Ángeles, K., Hernández-Falcon, J., Cabrera, A., and Ramon, F. (2005). "Crayfish brain states characterization with wavelet transform," in *2005 2nd International Conference on Electrical and Electronics Engineering*. (Manhattan: IEEE), 160–163



Mendoza-Ángeles, K., Cabrera, A., Hernández-Falcón, J., and Ramón, F. (2007). Slow waves during sleep in crayfish: a time–frequency analysis. *J. Neurosci. Methods* 162, 264–271. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.01.025

Mendoza-Ángeles, K., Hernández-Falcon, J., and Ramon, F. (2010). Slow waves during sleep in crayfish, origin and spread. *J. Exp. Biol.* 213, 2154–2164. doi: 10.1242/jeb.038240

Montano, N., Porta, A., Cogliati, C., Costantino, G., Tobaldini, E., Casali, K. R., et al. (2009). Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 71–80. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.07.006

Mukhametov LM, Supin AY, Polyakova IG. (1977). Interhemispheric asymmetry of the electroencephalographic sleep patterns in dolphins. *Brain Res* 134:581–584

Mukhametov LM, Lyamin OI, Polyakova IG. (1985). Interhemispheric asynchrony of the sleep EEG in northern fur seals. *Experientia* 41:1034–1035

Mukhametov LM. (1987). Unihemispheric slow-wave sleep in the Amazonian dolphin, *Inia geoffrensis*. *Neurosci Lett* 79(1-2):128-132.

Ookawa, T. and Gotoh, J. (1965). Electroencephalogram of the chicken recorded from the skull under various conditions. *J. Comp. Neurol.* 124, 1-14.

Osorio-Palacios, M., Oliver-Domínguez, I., Montiel-Trejo, L., Hernández-Falcón, J., and Mendoza-Ángeles, K. (2021). Sleep in crayfish: relationship between brain electrical activity and autonomic variables. *AIP Conference Proc.* 2348:050024. doi: 10.1063/5.0051480

Pratt, W. (1974). Correlation techniques of image registration. *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst.* AES-10, 353–358

Prober, D. A., Rihel, J., Onah, A. A., Sung, R.-J. and Schier, A. F. (2006). Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. *J. Neurosci.* 26, 13400-13410.

Ramón, F., Hernández-Falcon, J., Nguyen, B., and Bullock, T. H. (2004). Slow wave sleep in crayfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11857–11861. doi: 10.1073/pnas.0402015101

Rattenborg NC, Amlaner CJ, Lima SL. (2000). Behavioral, neurophysiological, and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 24:817–842

Rattenborg NC. (2006b). Do birds sleep in flight? *Naturwissenschaften* 93: 413–425.

Rattenborg NC, Martinez-Gonzalez D. (2014). Avian versus mammalian sleep: the fruits of comparing apples and oranges. *Curr Sleep Med Rep* 1:55–63

Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock, M. H., Ta, U. D., You, Y., Sundaram, M. V. and Pack, A. I. (2008). Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature* 451, 569-572.

Rechtschaffen, A. (1998). Current Perspectives on the Function of Sleep. *Pers. Biol. Med.* 41, 359–390. doi: 10.1353/pbm.1998.0051

Schapker, H., Breithaupt, T., Shuranova, Z., Burmistrov, Y., and Cooper, R. L. (2002). Heart and ventilatory measures in crayfish during environmental disturbances and social interactions. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131, 397–407. doi: 10.1016/s1095-6433(01)00492-5

Schmidt, M. H. (2014). The energy allocation function of sleep: a unifying theory of sleep, torpor, and continuous wakefulness. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 47,122–153. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.08.001

Shaw, P. J., Cirelli, C., Greenspan, R. J. and Tononi, G. (2000). Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 1834-1837.

Shuranova, Z. P., Burmistrov, Y. M., Strawn, J. R., and Cooper, R. L. (2006). Evidence for an Autonomic Nervous System in Decapod Crustaceans. *Int. J. Zool. Res.* 2, 242–283. doi: 10.3923/ijzr.2006.242.283

Siegel JM, Manger PR, Nienhuis R, Fahringer HM, Pettigrew JD. 1996, The echidna *Tachyglossus aculeatus* combines REM and non-REM aspects in a single sleep state: Implications for the evolution of sleep. *J Neurosci* 16(10): 3500-3506.

Siegel, J. M. (2003). Why We Sleep. *Sci. Am.* 289, 92–97. doi: 10.1038/scientificamerican1103-92

Siegel, J. M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437, 1264–1271. doi: 10.1038/nature04285

Somers VK, Dyken ME, Mark AL, Abboud FM. (1993). Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *N. Engl J Med.* 328(5), 303-7.

Taylor, E. W. (1970). Spontaneous activity in the cardioaccelerator nerves of the crayfish, *Astacus pallipes lereboullet*. *Comp. Biochem. Physiol.* 33, 859–869. doi: 10.1016/0010-406x(70)90034-4

Tobaldini, E., Pecis, M., and Montano, N. (2014). Effects of acute and chronic sleep deprivation on cardiovascular regulation. *Arch. Ital. Biol.* 152, 103–110. doi: 10.12871/000298292014235

Tobler I. (1984). Evolution of the sleep process: A phylogenetic approach. *Exp Brain Res* 54(8):207-226.

Tobler I, Stadler J. (1988). Rest in the scorpion – a sleep like state? *J Comp Physiol A* 163:227-235

Tobler I, Neuner-Jehle M. (1992). 24-h variation in vigilance in the cockroach. *J Sleep Res* (4):231-239.

Tobler, I. (2005). “Phylogeny of sleep regulation,” in *Principles and Practice of Sleep Medicine*, eds M.H. Kryger, T. Roth, and W. C. Dement (Philadelphia: Elsevier Saunders), 77–90

Tononi, G., and Cirelli, C. (2003). Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res. Bull.* 62, 143–150. doi: 10.1016/j.brainresbull.2003.09.004

Tononi, G., and Cirelli, C. (2006). Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med. Rev.* 10, 49–62. doi: 10.1016/j.smrv.2005.05.002

Trinder, J., Kleiman, J., Carrington, M., Smith, S., Breen, S., Tan, N., et al. (2001). Autonomic activity during human sleep as a function of time and sleep stage. *J. Sleep Res.* 10, 253–264. doi: 10.1046/j.1365-2869.2001. 00263.x

van Alphen, B., Yap, M. H. W., Kirszenblat, L., Kottler, B., van Swinderen, B. (2013). A dynamic deep sleep stage in drosophila. *J Neurosci* 33(16), 6917- 6937.

Vyazovskiy VV, Olcese U, Hanlon EC, Nir Y, Cirelli C, Tononi G. (2011). Local sleep in awake rats. *Nature* 472:443–447

Walker JM, Berger RJ. (1973). A polygraphic study of the tortoise (*Testudo denticulata*): absence of electrophysiological signs of sleep. *Brain Behav Evol* 8: 453–467.

Walker, M. P. (2009). The role of sleep in cognition and emotion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1156, 168–197. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04416.x

Walker, M. P. (2010). Sleep, memory and emotion. *Progr. Brain Res.* 185, 49–68. doi: 10.1016/b978-0-444-53702-7.00004-x

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., et al. (2019). Welcome to the tidyverse. *J. Open Source Softw.* 4:1686. doi: 10.21105/joss.01686

Wiersma, C. A., and Novitski, E. (1942). The mechanism of nervous regulation of the crayfish. *J. Exp. Biol.* 19, 255–265

Wittek, P. (ed.). (2014). “Unsupervised learning,” in *Quantum Machine Learning* (Boston, MA; Academic Press), 57–62. doi: 10.1016/B978-0-12-800953-6.00005-0

Yamazaki, R., Toda, H., Libourel, P. A., Hayashi, Y., Vogt, K. E., and Sakurai, T. (2020). Evolutionary Origin of Distinct NREM and REM Sleep. *Front. Psychol.* 11:567618. doi: 10.3389/fpsyg.2020.567618

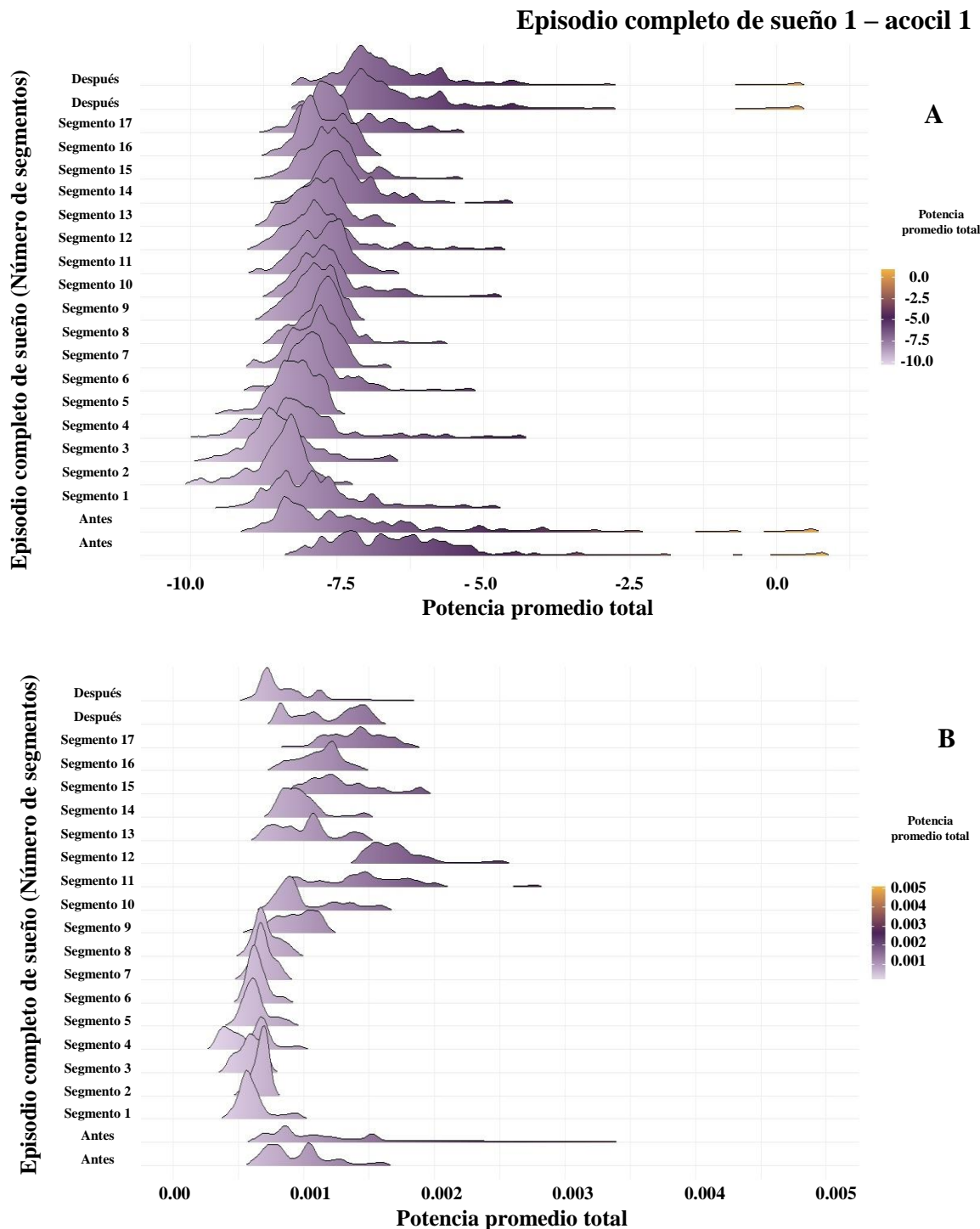
Yokogawa, T., Marin, W., Faraco, J., Pézeron, G., Appelbaum, L., Zhang, J., Rosa, F., Mourrain, P. and Mignot, E. (2007). Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants. *PLoS Biol.* 5, 2379-2397.

Zemaityte, D., Varoneckas, G., Plauska, K., and Kaukenas, J. (1986). Components of the heart rhythm power spectrum in wakefulness and in individual sleep stages. *Int. J. Psychophysiol.* 4, 129–141. doi: 10.1016/0167-8760(86) 90006-1

Zeplin H, Siegel JM, Tobler I. (2005). Mammalian sleep. In: MH Kryger, T Roth, WC Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 91–100

Zhdanova, I. V., Wang, S. Y., Leclair, O. U. and Danilova, N. P. (2001). Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903, 263-268.

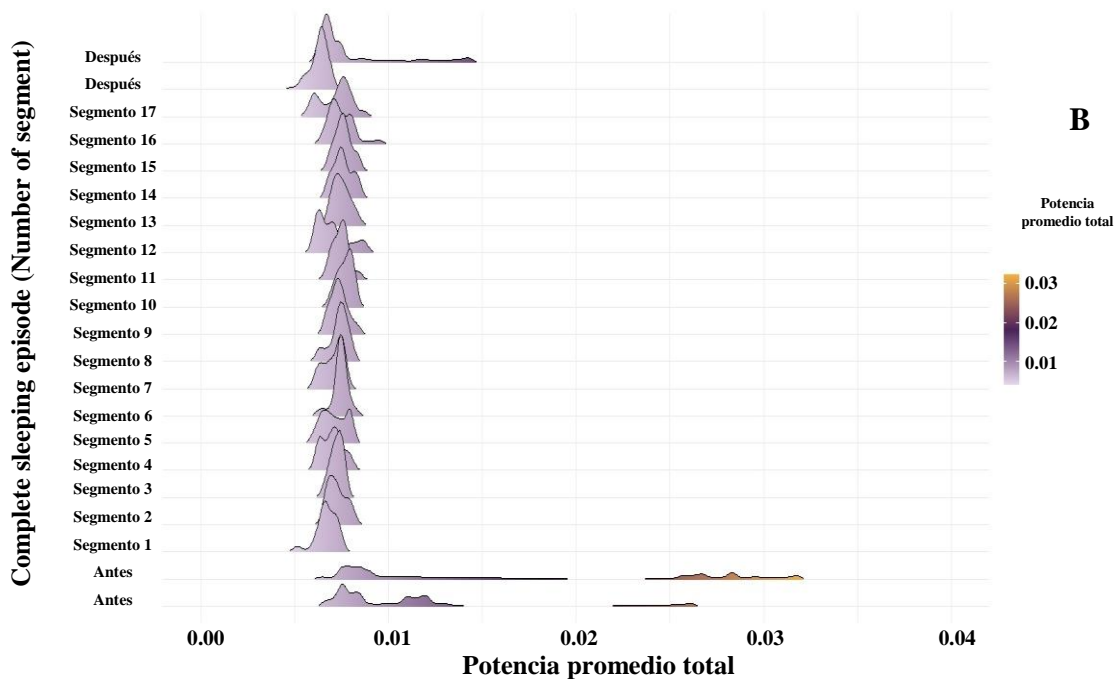
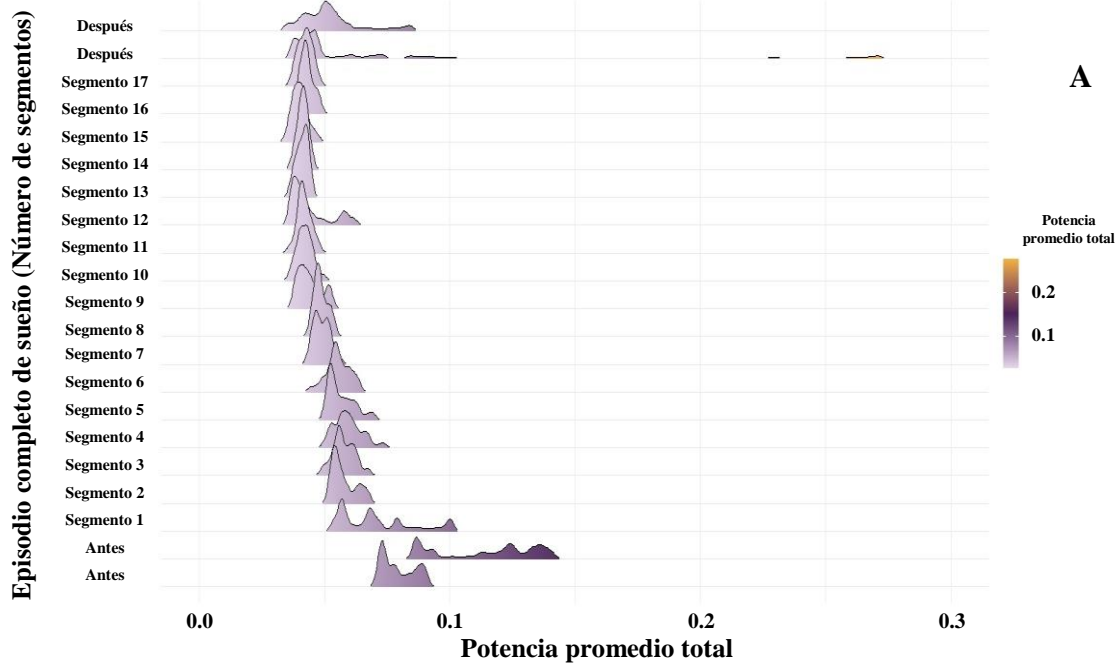
## 12. MATERIAL SUPLEMENTARIO



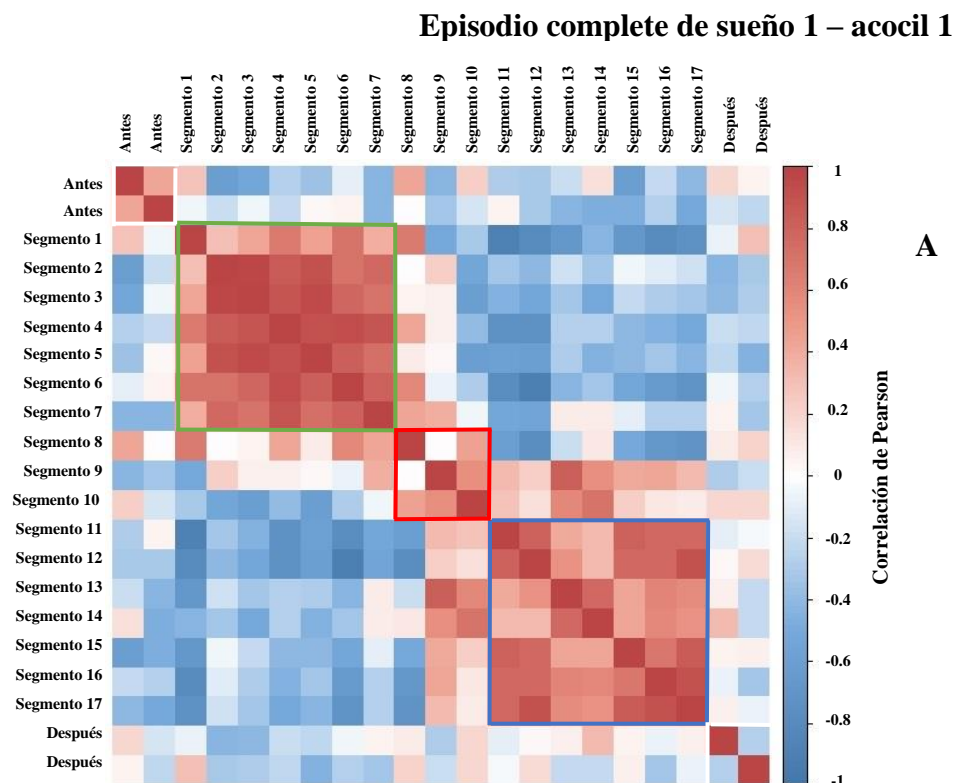
**Suplementario.** Gráfica de densidad de la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardíaca dentro de las bandas de frecuencia de 30-60 Hz y de 0-45 Hz, respectivamente. La gráfica despliega la evolución temporal de la potencia promedio

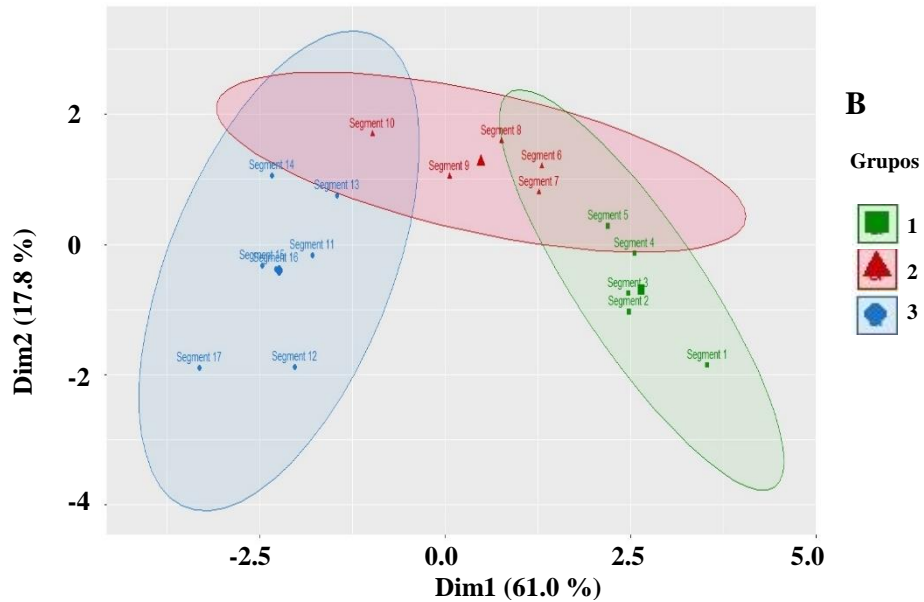
total a través de un episodio completo de sueño de cerca de 8.5 minutos. Cada segmento muestra cómo se distribuyen los valores de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño está marcado con el segmento 1 y termina en el segmento 17. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de la potencia fueron obtenidos mediante la TW y son codificados en color (potencias altas-tonos claros y potencias bajas-tonos oscuros). **(A)** cerebro y **(B)** corazón.

### Episodio completo de sueño 1 – acil 1



**Suplementario.** Gráfica de densidad de la potencia promedio total de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria dentro de las siguientes bandas de frecuencia: actividad cardiaca 0-45 Hz y respiratoria 0-12 Hz. La gráfica despliega la evolución temporal de la potencia promedio total a través de un episodio completo de sueño de cerca de 8.5 minutos. Cada segmento muestra cómo se distribuyen los valores de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño está marcado con el segmento 1 y termina en el segmento 17. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de la potencia fueron obtenidos mediante la TW y son codificados en color (potencias altas-tonos claros y potencias bajas-tonos oscuros). **(A)** cámara branquial 1 y **(B)** cámara branquial 2.

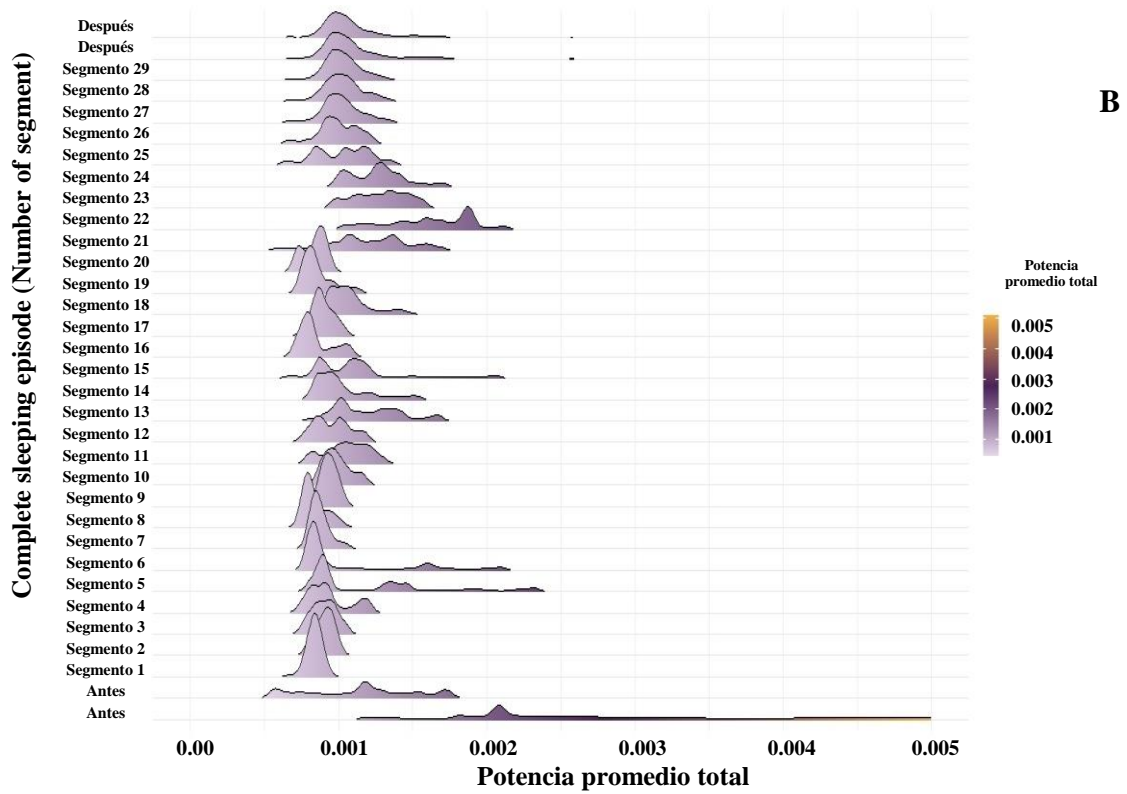
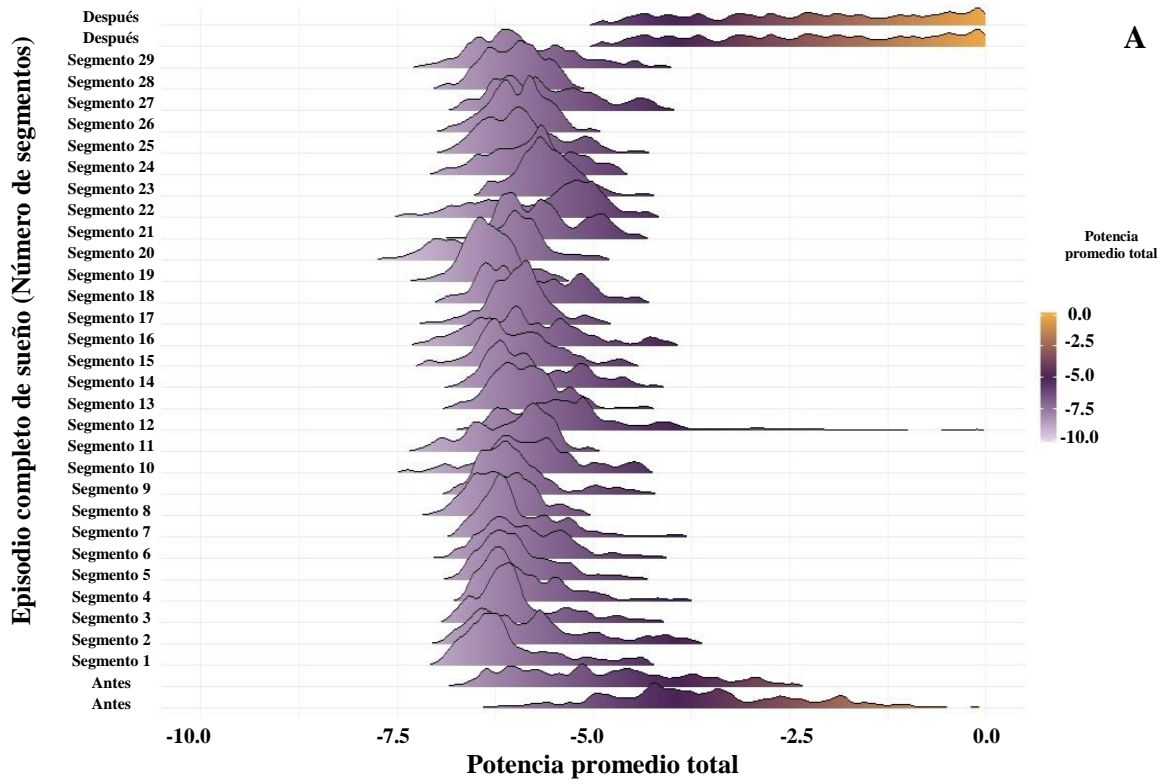




**Suplementario. (A)** Matriz de correlación de Pearson correspondiente a la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. La matriz despliega la evolución temporal del sueño a lo largo de un evento de cerca de 8.5 minutos. Cada segmento muestra el coeficiente de correlación de Pearson de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. La figura incluye también un minuto antes y uno después del episodio de sueño (cuadrados blancos). La correlación es codificada en color (correlación positiva-tonos rojos y correlación negativa-tonos azules). Cada grupo identificado cualitativamente es enmarcado con cuadrados de color: grupo 1 (cuadrado verde), grupo 2 (cuadrado rojo) y grupo 3 (cuadrado azul). **(B)** Análisis de agrupamiento con *k*-means correspondiente al mismo episodio de sueño mostrado en **A**; cada conjunto representa un patrón diferente durante el sueño y están delimitados por elipses de color. Cuadrados verdes-grupo 1, triángulos rojos-grupo 2 y diamantes azules-grupo 3. La visualización de los datos en el plano bidimensional es a través del análisis de componentes principales; PCA1 explica el 61.8 % de la varianza total y PCA2 el 17.8 %. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con un efecto tamaño medio ( $p < 0.05$ ;  $\epsilon^2 = 0.15$ ).



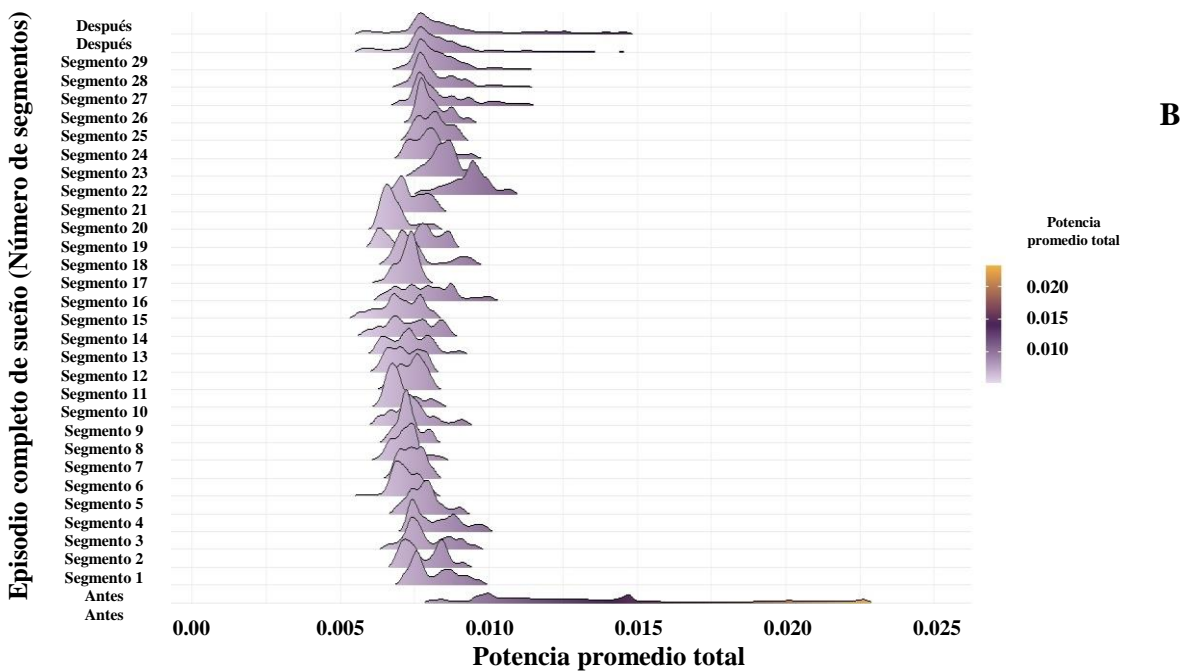
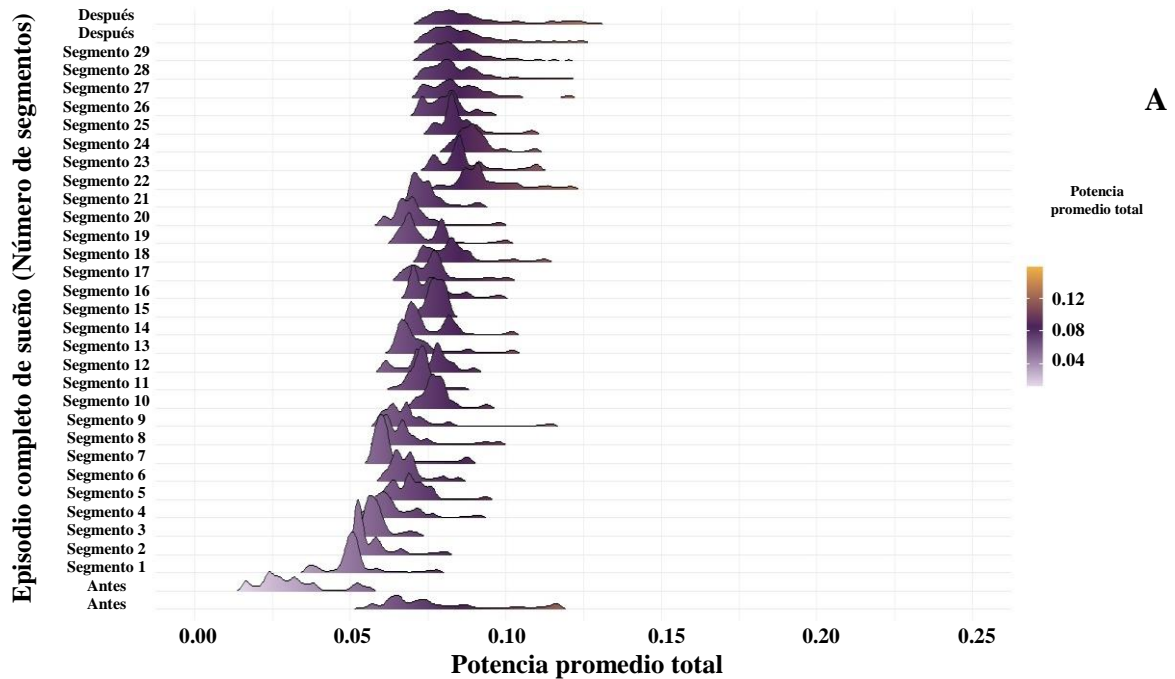
### Episodio completo de sueño 2 – acocil 2



**Suplementario.** Distribución de probabilidad de la potencia promedio total de la

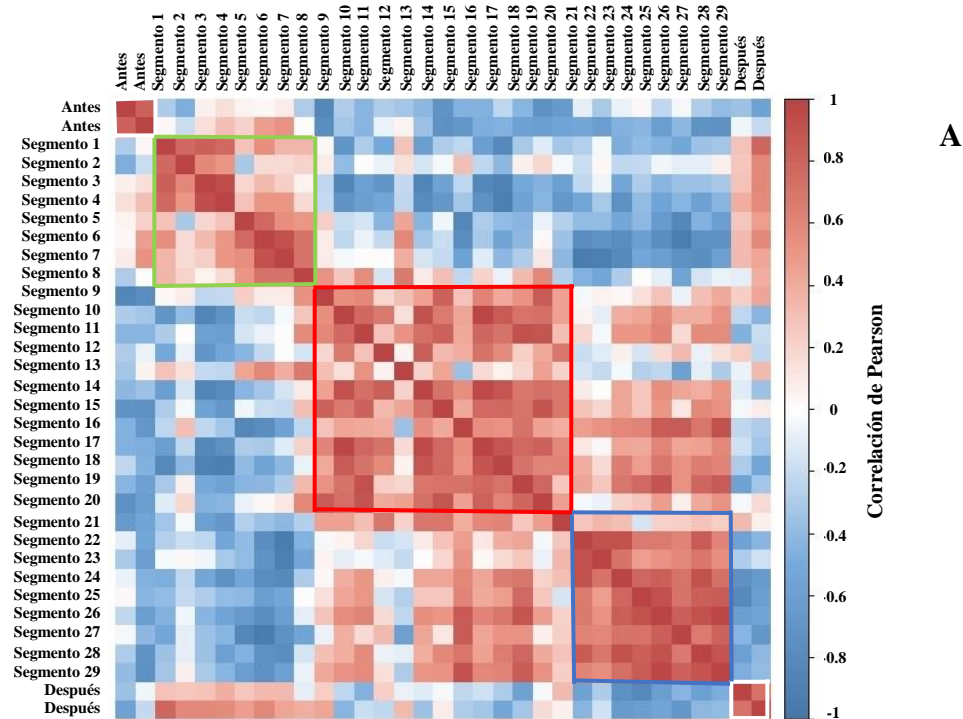
actividad eléctrica cerebral y cardiaca dentro de las bandas de frecuencia de 30-60 Hz y de 0-45 Hz, respectivamente. La gráfica despliega la evolución temporal de la potencia promedio total a través de un episodio completo de sueño de cerca de 14.5 minutos. Cada segmento muestra la distribución de probabilidad de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño está marcado con el segmento 1 y termina en el segmento 29. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de la potencia fueron obtenidos mediante la TW y son codificados en color (potencias altas-tonos claros y potencias bajas-tonos oscuros). (A) cerebro y (B) corazón.

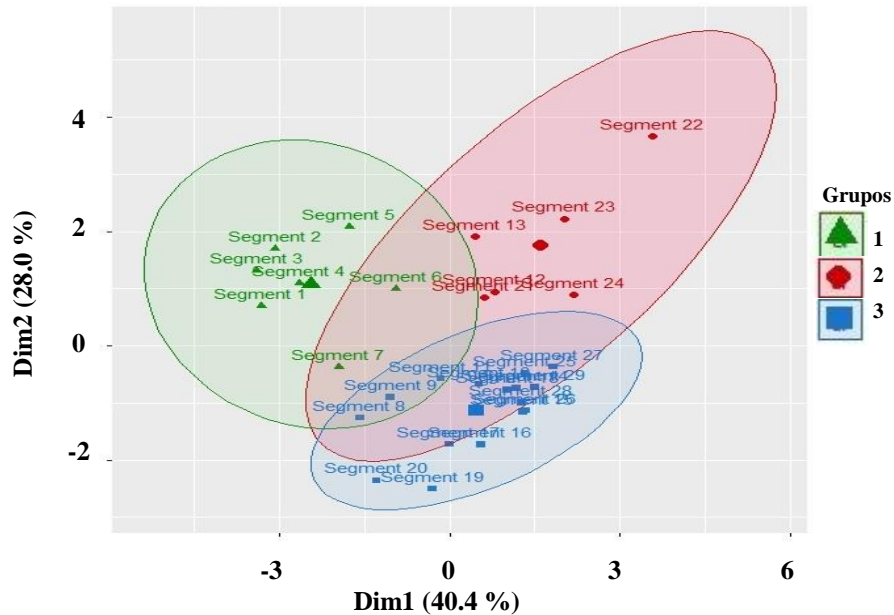
### Episodio completo de sueño 2 – acocil 2



**Suplementario.** Distribución de probabilidad de la potencia promedio total de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria dentro de las siguientes bandas de frecuencia: actividad cardiaca 0-45 Hz y respiratoria 0-12 Hz. La gráfica despliega la evolución temporal de la potencia promedio total a través de un episodio completo de sueño de cerca de 14.5 minutos. Cada segmento muestra la distribución de probabilidad de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño está marcado con el segmento 1 y termina en el segmento 29. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de la potencia fueron obtenidos mediante la TW y son codificados en color (potencias altas-tonos claros y potencias bajas-tonos oscuros). **(A)** cámara branquial 1 y **(B)** cámara branquial 2.

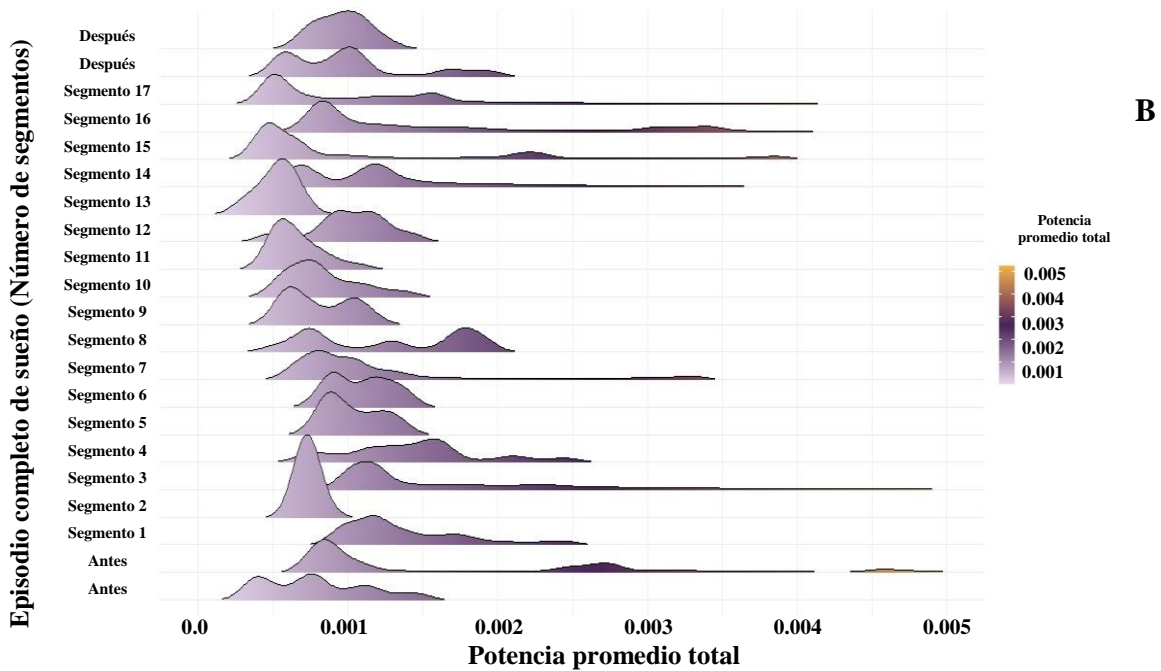
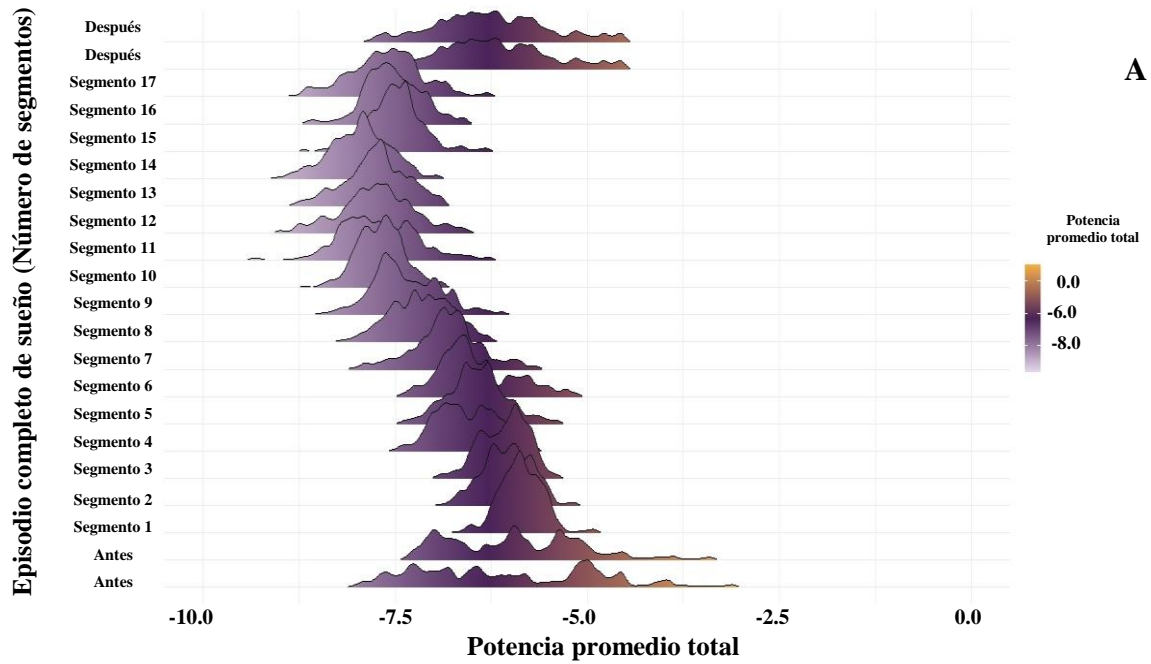
### Episodio completo de sueño 2 – acocil 2





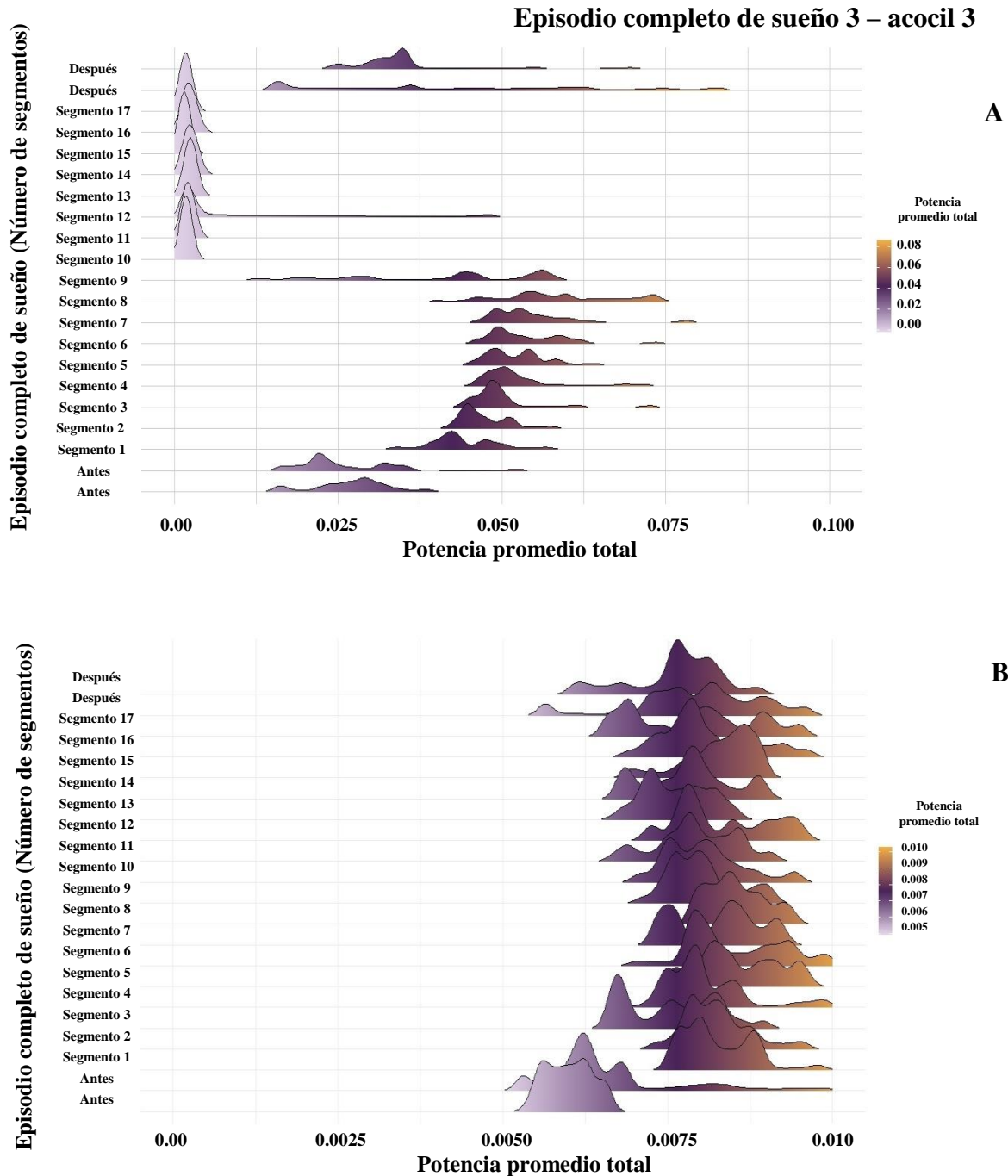
**Suplementario. (A)** Matriz de correlación de Pearson correspondiente a la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. La matriz despliega la evolución temporal del sueño a lo largo de un evento de 14.5 minutos. Cada segmento muestra el coeficiente de correlación de Pearson de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. La figura incluye también un minuto antes y uno después del episodio de sueño (cuadrados blancos). La correlación es codificada en color (correlación positiva-tonos rojos y correlación negativa-tonos azules). Cada grupo identificado cualitativamente es enmarcado con cuadrados de color: grupo 1 (cuadrado verde), grupo 2 (cuadrado rojo) y grupo 3 (cuadrado azul). **(B)** Análisis de agrupamiento con *k*-means correspondiente al mismo episodio de sueño mostrado en **A**; cada conjunto representa un patrón diferente durante el sueño y están delimitados por elipses de color. Triángulos verdes-grupo 1, diamantes rojos-grupo 2 y cuadrados azules-grupo 3. La visualización de los datos en el plano bidimensional es a través del análisis de componentes principales; PCA1 explica el 40.4 % de la varianza total y PCA2 el 28.0 %. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con un efecto tamaño medio ( $p < 0.05$ ;  $\epsilon^2 = 0.15$ ).

### Episodio completo de sueño 3 – acocil 3



**Suplementario.** Gráfica de densidad de la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiaca dentro de las bandas de frecuencia de 30-60 Hz y de 0-45 Hz, respectivamente. La gráfica despliega la evolución temporal de la potencia promedio total a través de un episodio completo de sueño de cerca de 8.5 minutos. Cada segmento muestra cómo se distribuyen los valores de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño está marcado con el segmento 1 y termina en el

segmento 17. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de la potencia fueron obtenidos mediante la TW y son codificados en color (potencias altas-tonsos claros y potencias bajas-tonsos oscuros). **(A)** cerebro y **(B)** corazón.

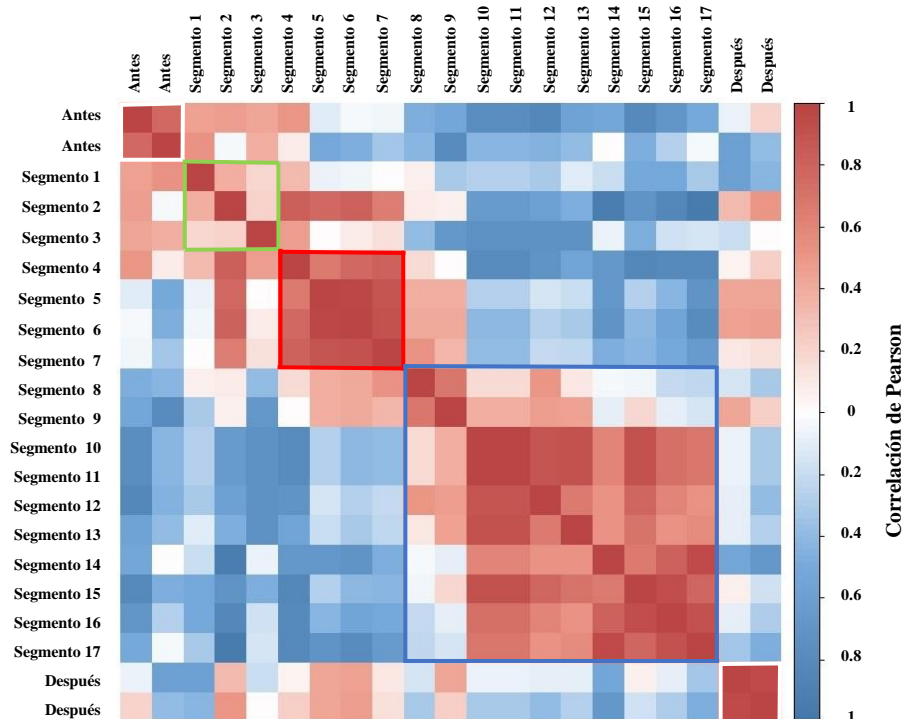


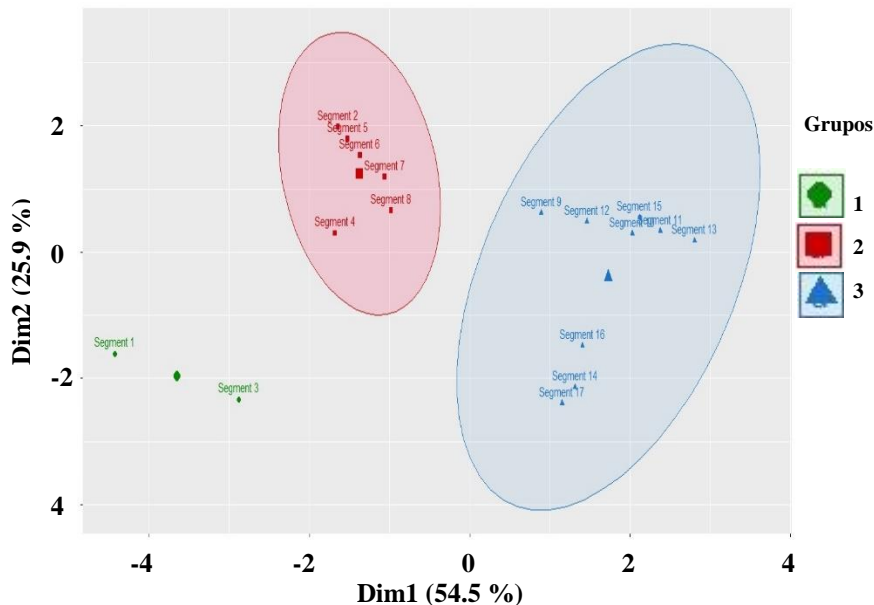
**Suplementario.** Gráfica de densidad de la potencia promedio total de la actividad eléctrica cardiorrespiratoria dentro de las siguientes bandas de frecuencia: actividad



cardiaca 0-45 Hz y respiratoria 0-12 Hz. La gráfica despliega la evolución temporal de la potencia promedio total a través de un episodio completo de sueño de cerca de 8.5 minutos. Cada segmento muestra cómo se distribuyen los valores de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. El inicio del episodio de sueño está marcado con el segmento 1 y termina en el segmento 17. La figura también incluye un minuto antes y uno después del episodio de sueño. Los valores de la potencia fueron obtenidos mediante la TW y son codificados en color (potencias altas-tonos claros y potencias bajas-tonos oscuros). **(A)** cámara branquial 1 y **(B)** cámara branquial 2.

### Episodio completo de sueño 3 – acocil 3





**Suplementario. (A)** Matriz de correlación de Pearson correspondiente a la potencia promedio total de la actividad eléctrica cerebral y cardiorrespiratoria. La matriz despliega la evolución temporal del sueño a lo largo de un evento de 8.5 minutos. Cada segmento muestra el coeficiente de correlación de Pearson de la potencia promedio total en ventanas de 30 s. La figura incluye también un minuto antes y uno después del episodio de sueño (cuadrados blancos). La correlación es codificada en color (correlación positiva-tonos rojos y correlación negativa-tonos azules). Cada grupo identificado cualitativamente es enmarcado con cuadrados de color: grupo 1 (cuadrado verde), grupo 2 (cuadrado rojo) y grupo 3 (cuadrado azul). **(B)** Análisis de agrupamiento con *k*-means correspondiente al mismo episodio de sueño mostrado en **A**; cada conjunto representa un patrón diferente durante el sueño y están delimitados por elipses de color. Diamantes verdes-grupo 1, cuadrados rojos-grupo 2 y triángulos azules-grupo 3. La visualización de los datos en el plano bidimensional es a través del análisis de componentes principales; PCA1 explica el 54.5 % de la varianza total y PCA2 el 25.9 %. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con un efecto tamaño medio ( $p < 0.05$ ;  $\epsilon^2 = 0.18$ ).



## **13. ANEXOS**

### **13.1 Anexo 1. Consideraciones éticas**

Los implantes quirúrgicos de este proyecto fueron realizados en acociles previamente anestesiados por frío, método comúnmente empleado para reducir el metabolismo y evitar así los posibles sufrimientos de estos animales.

El método de anestesia por frío consiste en mantener a los animales en agua a 0°C durante un tiempo aproximado de 50 minutos. Esto genera pérdida de las respuestas sensoriales de tipo mecánico, visual y químico. Además de un incremento en la viscosidad de la hemolinfa por lo que el sangrado se reduce.

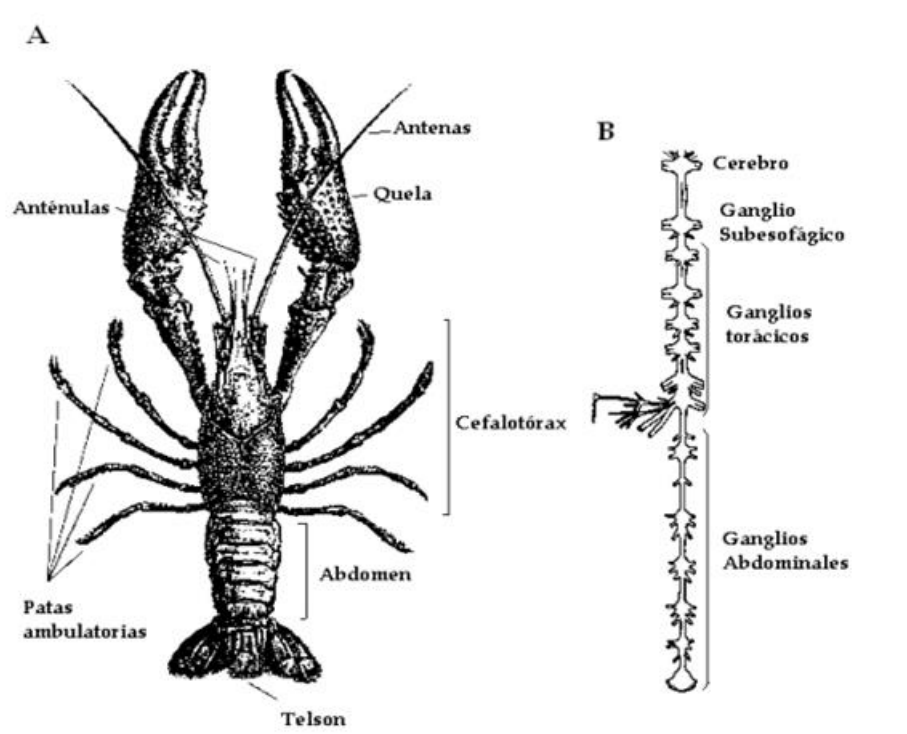
Los procedimientos mencionados fueron aprobados por la Comisión de Investigación y Ética de la División de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM con número de Dictamen 048/2015 a través del oficio FMED/CI/SPLR/056/2015.

## 13.2 Anexo 2. Anatomía del Acocil

Para la realización de este trabajo obtuve registros de la actividad electrofisiológica del acocil mediante electrodos implantados en deutocerebro, el seno cardiaco y en ambas cámaras branquiales. Debido a esto es conveniente hacer una explicación breve de la anatomía de este animal.

### 13.2.1 Sistema Nervioso del Acocil

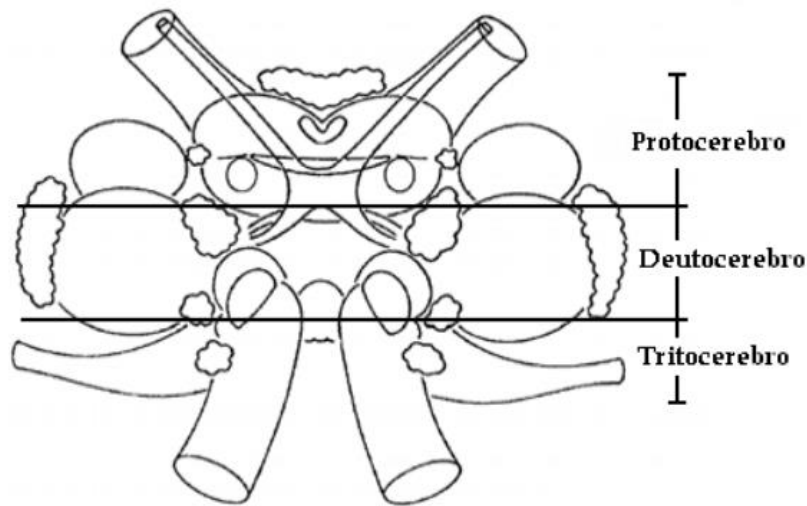
El acocil tiene un sistema nervioso distribuido compuesto por un cerebro un ganglio subesofágico, cinco ganglios torácicos y seis ganglios abdominales (**Figura 13.1**)



**Figura 13.1 (A)** Vista dorsal del acocil. **(B)** Sistema nervioso del acocil. Modificada de Cattaert y LeRay, 2001.

El cerebro del acocil está conformado por la fusión de tres ganglios embrionarios: el más rostral denominado protocerebro, le sigue deutocerebro y, por último, el más caudal, tritocerebro (**Figura 13.2**). Los nervios ópticos llevan la información visual al protocerebro, mientras que el deutocerebro contiene los lóbulos olfatorios, los

neuropilos de la antena I (mecanorreceptores y neuronas motoras) y los lóbulos accesorios. El tritocerebro forma un par de conectivos que se extienden alrededor del esófago hacia el ganglio subesofágico, los cuales permiten la comunicación entre el cerebro y el cordón nervioso central. Al tritocerebro también llegan algunos nervios antenulares, así como, nervios sensoriales de la región anterior de la cabeza.



**Figura 13.2.** Cerebro del acocil (Modificada de **Sandeman y cols., 1992**).

El ganglio subesofágico controla los movimientos de la mandíbula, la maxila y los maxilípedos. El primer ganglio torácico controla los quelíceros y los siguientes cuatro ganglios inervan los apéndices motores del cefalotórax. Los primeros cinco ganglios abdominales controlan los músculos y los apéndices asociados a cada segmento de la región abdominal. El sexto ganglio controla los urópodos, el telson, la musculatura anal y la parte posterior del tubo digestivo (**Sandeman y cols., 1992**).

### 13.2.2 Corazón

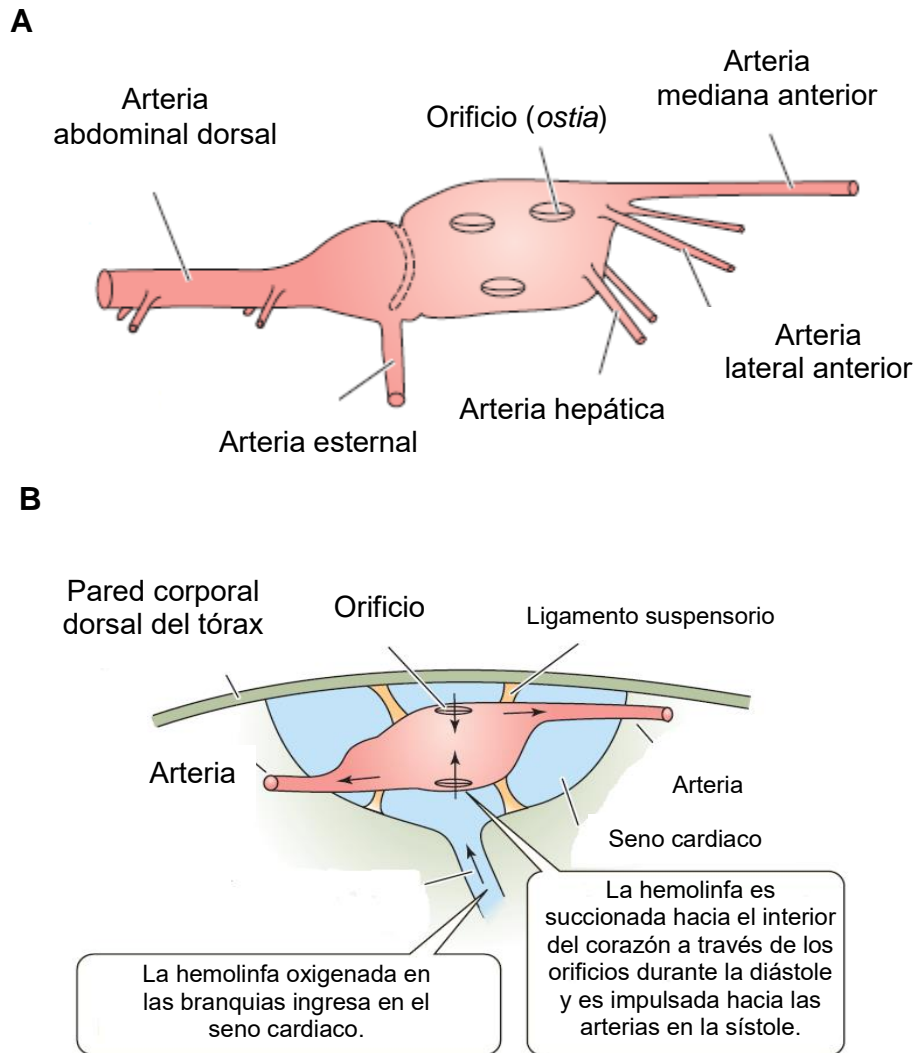
En los crustáceos decápodos adultos el corazón es una estructura sacular unicameral, ubicada en la porción dorsal del tórax, cuyo latido se desencadena por estímulos neurogénicos (la despolarización rítmica responsable del establecimiento de los latidos cardiacos se origina en tejido nervioso). Todos los vasos conectados con el corazón son arterias. Las arterias tienen válvulas en sus orígenes y salen del corazón

para dirigirse hacia diversas direcciones (**Figura 13.3A**). La sangre no ingresa al corazón a través de vasos sino de hendiduras en las paredes del corazón denominadas orificios (*ostias*). El corazón es sostenido por ligamentos suspensorios elásticos dentro de una cavidad limitada, el seno cardíaco (**Figura 13.3B**) (**Maynard, 1960**). Los únicos canales sanguíneos que ingresan en el seno cardíaco son “venas” que conducen la sangre desde las branquias o de otras superficies respiratorias.

Cuando el corazón se contrae durante la sístole los orificios se cierran por la tensión muscular, la acción de las válvulas o ambos; por ende, la sangre dentro del corazón no puede salir a través de los orificios hacia el seno cardíaco y se dirige a las arterias. La contracción del corazón estira los ligamentos suspensorios que se insertan en su pared. Cada célula muscular está inervada y se contrae solo cuando recibe el estímulo de un impulso nervioso. Hay un ganglio cardíaco, compuesto por nueve neuronas (cuatro células posteriores pequeñas y cinco células anteriores grandes) unido a la superficie dorsal del corazón que inicia y controla sus contracciones. Los nervios cardiorreguladores incluyen un par de inhibidores y un par de aceleradores que surgen del ganglio subesofágico (**Wiersma y Novitiski 1942, Maynard 1960, McMahon y Wilkens 1983**).

### **13.2.3 Branquias**

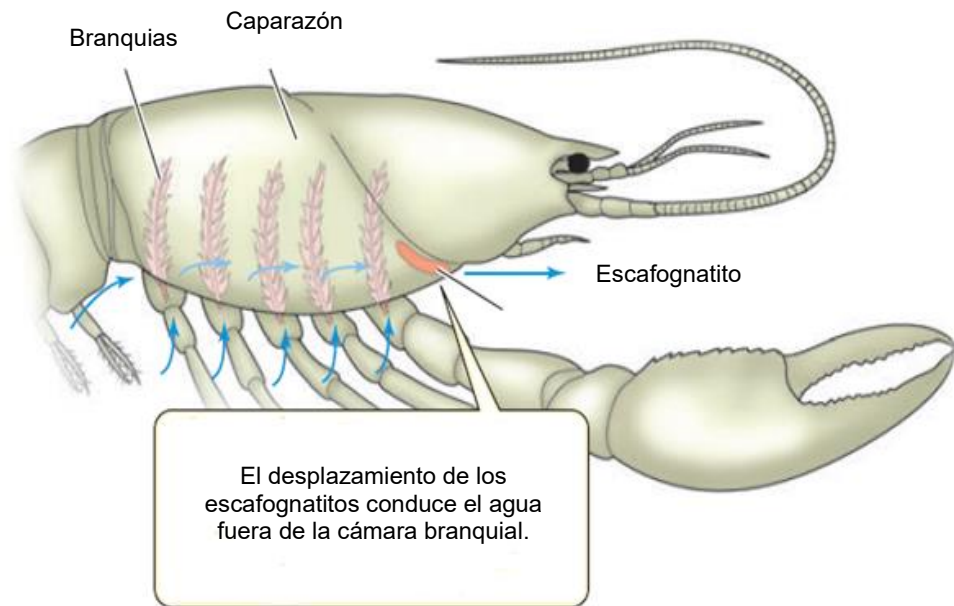
En los crustáceos decápodos, la cabeza y el tórax están cubiertos por una lámina continua de exoesqueleto (el caparazón), que sobresale del tórax a los lados y se adapta en forma más o menos estrecha alrededor de la base de las patas torácicas. El caparazón limita dos cámaras branquiales laterales en las que se encuentran las branquias (**Figura 13.4**).



**Figura 13.3.** Corazón de un crustáceo decápodo. **(A)** Corazón y arterias que salen de él (según **Wilkins, 1999**). **(B)** Posición del corazón en el seno cardiaco y patrón del flujo sanguíneo en la circulación central (Modificada de **Hills y cols., 2012**).

Las branquias se originan cerca de las bases de las patas torácicas y cada una está compuesta de un eje central al que se unen muchas placas laminares, filamentos o penachos ramificados en forma dendrítica con gran vascularización. La superficie de las branquias (como todas las superficies externas de los crustáceos) están cubiertas por una cutícula de quitina. La cutícula sobre las branquias es delgada y permeable a los gases. Cada cámara branquial es ventilada por un apéndice especializado ubicado hacia el extremo anterior denominado escafognatito (**Figura 13.4**) (**Decelle, J. y cols.,**

**2010).** El batido de este apéndice conduce el agua hacia el exterior a través de un orificio de salida anterior. Cada escafofnatito es controlado por impulsos nerviosos provenientes de un generador central de patrones, ubicado en el sistema nervioso central (**Wilkens JL and McMahon BR., 1972, 1975**).



**Figura 13.4.** Vista lateral que muestra las branquias debajo del caparazón. (Modificada de **Hill y cols., 2012**).

## REFERENCIAS

Cattaert, D., & le Ray, D. (2001). Adaptive motor control in crayfish. *Progress in Neurobiology*, 63(2), 199–240. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00030-7](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00030-7)

Decelle, J., Andersen, A. C., & Hourdez, S. (2010). Morphological adaptations to chronic hypoxia in deep-sea decapod crustaceans from hydrothermal vents and cold seeps. *Marine Biology*, 157(6), 1259–1269. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1406-8>

Hill, Richard W. *Animal physiology* / Richard W. Hill, Gordon A. Wyse, Margaret Anderson. -- 3rd ed.

McMahon, B. R., & Wilkens, J. L. (1972). Simultaneous apnea and bradycardia in the lobster *Homarus americanus*. *Canadian Journal of Zoology*, 50(2), 165–170. <https://doi.org/10.1139/z72-025>

McMahon, B. R., and Wilkens, J. L. (1975). Respiratory and Circulatory Responses to Hypoxia in the Lobster *Homarus Americanus*. *Journal of Experimental Biology*, 62(3), 637–655. <https://doi.org/10.1242/jeb.62.3.637>

McMahon, B.R., and J.L. Wilkens. 1983 . Ventilation, perfusion and oxygen uptake. Pages 290–372 in D.E. Bliss and L.H. Mantel , editor. *The biology of Crustacea*, Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press , New York.

Maynard , D.M. 1960 . Circulation and heart function. Pages 161–226 in T.H. Waterman, editor. *The physiology of Crustacea*. Academic Press , New York.

Sandeman, D., Sandeman, R., Derby, C., & Schmidt, M. (1992). Morphology of the Brain of Crayfish, Crabs, and Spiny Lobsters: A Common Nomenclature for Homologous Structures. *The Biological Bulletin*, 183(2), 304–326.

<https://doi.org/10.2307/1542217>

Wiersma, C. A. G., and Novitski, E. (1942). The Mechanism of the Nervous Regulation of the Crayfish Heart. *Journal of Experimental Biology*, 19(3), 255–265. <https://doi.org/10.1242/jeb.19.3.255>

Wilkens, J. L. (1999). Evolution of the Cardiovascular System in Crustacea. *American Zoologist*, 39(2), 199–214. <https://doi.org/10.1093/icb/39.2.199>